Změny ve struktuře lignocelulosní buněčné blány v průběhu humifikace

Die Veränderungen in der Struktur der verholzten
Zellwand im Verlaufe der Humifikation

VLADIMIR RYPÁČEK

Lignocelulosní blány buněčné jsou důležitým zdrojem humusu. Postupnou dekomposicí mění se nejen jejich chemické složení, ale charakteristickým způsobem mění se i jejich struktura.

V Československu je tento směr širěji rozvinut. Změnami ve struktuře a ultrastruktuře buněčných blan v procesu jejich rozkladu zabývá se Laboratoř pro fyziologii a anatomii rostlin university v Brně a Dřevárský výzkumný ústav v Bratislavě (V. Nečesaný a L. Jurášek). V této zprávě chci podat jiný pohled na tento rozkladný proces. Uvádím výsledky některých prací obou pracovišť, které ukazují, jak se mění struktura lignocelulosních buněčných blan v průběhu jejich rozkladu.

Jako materiálu bylo užito mladého dřeva smrku a borovice. Jeho rozklad byl vyvolán ve sterilních podmínkách dřevokaznými houbami, které se v lesích podílejí na humifikačních procesech. Změny ve struktuře buněčných blan byly sledovány normálním optickým mikroskopem, fázovým kontrastem a elektronovým mikroskopem.

Dřevokazné houby rozděluji se podle typu metabolismu a podle způsobu, jakým rozkládají lignocelulosní blány buněčné dřeva, do dvou hlavních skupin a to:

a) houby celulosovorní, které svými hydrolytickými enzymy rozkládají pouze celulosu a ostatní přístupnou polysacharidickou výstavbu buněčných blan. Ligninové impregnace jsou jejich činností uvolněny a zůstávají houbami nevyužity. Proto také dřevo jejich činností tmavne.

b) houby lignivorní, které vedle hydrolytických enzymů produkují i enzymy oxydační povahy. Jsou proto schopny využívat vedle polysacharidické výstavby i ligninové impregnace. Dřevo jimi napadené je obvykle světlejší. Podle toho je rozdílný i způsob a průběh rozkladu.

Rozklad celulosovorními houbami. První mikroskopickou známkou počínajícího rozkladu bývá praskání marga dvůrkatých

ztenčenin blány buněčné. To je dobře vidět na obr. 1, kde je zachycen počátek rozkladu borové tracheidy na radiálním řezu.

Jiným charakteristickým znakem rozkladu je to, že dochází k rozpuštění hmoty Saniových pásků. Tento stav je zachycen na obr. 2. Rozložené Saniovy pásy silně kontrastují, jsou-li vyplněny vzduchem.

Foto L. Juráček

Obr. 1. Praskání marga dvůrkatých ztenčenin zdřevnatělé buněčné blány na počátku rozkladu celulosovorní houbou *Poria sinuosa* Fr. Radiální řez bělí borovice

Abb. 1. Das Platzen des Margo der Hoftüpfel der verholzten Zellwand zu Beginn der Zersetzung durch den Zelluloseabbauenden Pilz *Poria sinuosa* Fr. Radialschnitt von Kiefern-splint

Dekompozice postupuje pak tak, že se nejdříve rozkládá nejméně lignifikovaná střední vrstva sekundární stěny buněčné blány. Na obr. 3 vidíme, že se v této střední vrstvě vytvářejí drobné dvůrky. Ty se postupně zvětšují a spojují. Nakonec jsou střední partie lignocelulosní buněčné blány zcela rozloženy a zůstávají vyplněny hnědou hmotou. Obvykle dlouho vytrvává silně lignifikovaná primární stěna a vnitřní vrstva sekundární stěny. Zvláště charakteristický je tento způsob rozkladu pro ty houby, které vyvolávají t.z.v. měkkou hnilobu.

Foto L. Jurášek

Obr. 2. Rozpuštění Saniových proužků na počátku rozkladu celulošovorní houbou *Coniophora puteana* (Fr.) Karst. Radiální řez bělí borovice

Abb. 2. Auflösung der Sanioschen Balken zu Beginn der Zersetzung durch den Zellulose-abbauenden Pilz *Coniophora puteana* (Fr.) Karst. Radialschnitt von Kiefernspint

Foto L. Jurášek

Obr. 3. Rozklad tracheid celulošovorní houbou, způsobující t.z.v. měkkou hnilobu.

Příčný řez dřevem smrku na počátku (a) a v pokročilém stupni rozkladu (b)

Abb. 3. Zersetzung der Tracheiden durch den die sogen. Moderfäule hervorruftenden Zellulose-abbauenden Pilz. Querschnitt von Fichtenholz zu Beginn (a) und im fortgeschrittenen Grade der Zersetzung (b)

Rozklad lignivorními houbami nelze charakterisovat jednoznačně. Jsou mezi nimi druhy, které rozkládají celulosu dřívě než lignin, nebo obě složky současně a konečně nejdříve lignin a pak celulosu. Proto i způsob rozkladu je značně mnohotvárný s řadou přechodů. Za typické lignivorní houby s charakteristickým způsobem rozkladu možno považovat poslední skupinu rozkládající nejdříve lignin systémem exoenzymů oxydasového typu.

Foto L. Scháněl

Obr. 4. Postupující rozklad borové tracheidy, pozorován fázovým kontrastem na příčném řezu. Rozklad způsobila lignivorní houba *Trametes versicolor* (Fr.) Pilát

Abb. 4. Fortschreitende Zersetzung von Kieferntracheide, mit Phasenkontrastmikroskop auf Querschnitt beobachtet. Die Zersetzung wurde durch den Lignin-abbauenden Pilz *Trametes versicolor* (Fr.) Pilát bewirkt

Rozklad, který způsobují, možno podle různých metod pozorování charakterisovat asi takto: Fázový kontrast umožňuje rozlišit jednotlivé vrstvy a lamely lignocelulosní buněčné blány. Blána buněčná působením lignivorní houby silně botná a postupně se do nitra buněčného odlupují svazky lamel i jednotlivé lamely. Ty mohou postupně zaplnit celé lumen buněčné (viz obr. 4). Tento stav se dá vyvolat i izolovanými exoenzymy hub. Nemusí však být charakteristický jen pro lignivorní houby tohoto typu.

Foto L. Juráček

Obr. 5. Postup delignifikace borové tracheidy, způsobené houbou *Pleurotus stipticus* (Bull.) Pilát. Delignifikovaná část blány buněčné je temně zbarvena chlorzinkjodem

Abb. 5. Verlauf der Delignifikation von Kieferntracheiden, hervorgerufen durch den Pilz *Pleurotus stipticus* (Bull.) Pilát. Der delignifizierte Teil der Zellwand ist mit Chlorzinkjod dunkelgefärbt

Charakteristický je však postup delignifikace. Ten byl sledován histochemicky za použití normálního optického mikroskopu. Na obr. 5 je to dobře viditelné. Delignifikace postupuje z vnitřku tak, jak postupně blána buněčná botná a jak se její lamely postupně oddělují. Delignifikovaná část blány buněčné je na obrázku temně zbarvena chlorzinkjodem. Na něm jsou zachyceny různé stupně rozkladu. V pozdějších fázích jsou pak rozloženy i střední lamely pektinové a delignifikované bunky jsou z pletiva uvolněny. To je dobře patrné na obr. 6. Delignifikované části buněčné blány

jsou zde nezbarveny, poněvadž bylo použito floroglucinu s HCl, který barví vedle středních lamel pouze zdřevnatělé části buněčné blány. Došlo-li k úplné delignifikaci, pak mohou být takto změněné buněčné blány ještě dále rozloženy a to hydrolytickými enzymy, které lignivorní houby také produkují. Celé soubory buněk mohou beze zbytku vymizet a v pletivu dřeva vznikají prázdné prostory.

Elektronová mikroskopie umožní nám pak přímo pozorovat změny, které způsobí houby v ultrastruktuře buněčné blány. Jako materiálu bylo

Foto L. Jurášek

Obr. 6. Totéž jako na obr. 5. Delignifikované blány buněčné jsou floroglucinem nezbarveny

Abb. 6. Desgleichen wie auf Abb. 5. Die delignifizierten Zellwände sind durch Floroglucin unverfärbt

použito rovněž mladého borového dřeva a rozklad byl vyvolán lignivorní houbou *Pleurotus stipticus*. Pozorovány byly změny na klenbě dvůrkaté ztenčeniny buněčné (viz obr. 7, chromem stíněná replika).

Povrch klenby dvůrkaté ztenčeniny je hladký nebo mírně zrnitý. Celulosní fibrily jsou jemné a hustě propleteny. Nejdříve je houbou rozložena tato vnitřní povrchová vrstva sekundární stěny. Její zbytky jsou na obr. 7 b ještě patrné. Objeví se střední vrstva sekundární stěny buněčné blány, která je velmi málo lignifikovaná. Svazky celulosových fibril jsou v ní

nápadně kruhovitě uspořádány. V další etapě pak po úplné delignifikaci silně botnají a mění se nápadně jejich dřívější tvarové ohraničení. V pokročilé fázi rozkladu pak vidíme, že se fibrily celulosy uvolnily a nabotnávají

Foto V. Nečešný

Obr. 7. Elektronmikroskopické snímky postupujícího rozkladu klenby dvůrkaté ztenčeniny borové tracheidy, způsobeného lignivorní houbou *Pleurotus stipticus* (Bull.) Pilát
 a — počátek rozkladu vnitřní vrstvy sekundární stěny, b — vnitřní vrstva zčásti rozložena a viditelná je střední, málo lignifikovaná vrstva sekundární stěny, c — delignifikované svazky celulosových fibril střední vrstvy silně botnají az částečnou hydrolysou se mění v růžencovité útvary (d)

Abb. 7. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der durch den Lignin-abbauenden Pilz *Pleurotus stipticus* (Bull.) Pilát hervorgerufenen fortschreitenden Zersetzung der Wölbung des Hoftüpfels von Kieferntracheide

a — Beginn der Zersetzung der inneren Schicht der sekundären Zellwand, b — die teilweise zersetzte innere Schicht und es ist die mittlere, wenig lignifizierte Schicht der sekundären Zällwand sichtbar, c — die delignifizierten Gruppen von Zellulosefibrillen der mittleren Schicht quellen stark auf bis sie sich durch teilweise Hydrolyse in rosenkranzförmige Gebilde vorwandeln (d)

váním a částečnou hydrolysou se změnily v růžencovité útvary. Konečné stadium je pak úplná hydrolysa celulosy.

Uvedené příklady změn ve struktuře lignocelulosních buněčných blan tedy ukazují, jak rozmanitým způsobem může probíhat jejich rozklad. Proto považujeme tyto mikroskopické metody za vhodný doplněk chemických a fysikálně-chemických metod, kterých se používá při studiu procesů humifikčních.

*Laboratoř pro fyziologii a anatomii rostlin
University v Breně, ČSR*

ZUSAMMENFASSUNG

Die verholzten Zellwände sind eine wichtige Humusquelle. Durch die fortschreitende Dekomposition verändert sich nicht nur ihre chemische Zusammensetzung, sondern auch ihre Struktur verändert sich auf charakteristische Art. In der Čechoslowakei hat sich diese Studiumsrichtung breiter entwickelt und mit diesen Fragen befasst sich das Laboratorium für Physiologie und Anatomie der Pflanzen, Universität Brno, und die Holz-Versuchsanstalt in Bratislava (V. Nečesaný, L. Jurášek). In diesem Bericht sind einige Arbeitsergebnisse aus diesen zwei Arbeitsstätten angeführt, welche zeigen, wie sich die Struktur der verholzten Zellwände im Verlaufe ihrer Zersetzung verändert.

Als Material wurde junges Fichten- und Kiefernholz verwendet. Seine Zersetzung wurde bei sterilen Bedingungen durch holzzerstörende Pilze hervorgerufen, die sich in den Wäldern in so hervorragender Art an den Humifikationsprozessen beteiligen. Die Veränderungen in der Struktur der Zellwände des Holzes wurden mit einem normalen optischen Mikroskop, mit einem Phasenkontrastmikroskop und einem Elektronenmikroskop beobachtet.

Die Zersetzung durch Zellulose-abbauende Pilze: Das erste Zeichen der Zersetzung ist das Platzen des Margo der Hof-tüpfel der Zellwand oder die Auflösung der Sanioschen Balkenmasse. Die Dekomposition schreitet fort, sodass die mindestens lignifizierte mittlere Schicht der sekundären Zellwand zersetzt wird. Es bilden sich in ihr kleine Höfe, die sich nach und nach vergrössern und vereinigen. Schliesslich sind die mittleren Partien der zersetzten Zellwand mit einer braunen Masse ausgefüllt. Die stark lignifizierte primäre Zellwand und die innere Schicht der sekundären Zellwand halten gewöhnlich lange aus. Besonders charakteristisch ist diese Art der Zersetzung für jene Pilze, welche die sogen. Moderfäule hervorrufen.

Die Zersetzung durch Lignin-abbauende Pilze lässt sich nicht eindeutig charakterisieren. Es gibt unter ihnen Arten, welche die Zellulose früher zersetzen als das Lignin, oder beide Bestandteile gleichzeitig, oder schliesslich zuerst das Lignin und dann die Zellulose. Deshalb ist auch die Art der Zersetzung vielgestaltig mit einer Reihe von Übergängen. Als typische Lignin-abbauende Pilze kann man jene betrachten, welche das Lignin zuerst durch ein System von Exoenzymen des Oxydasen-Typus zersetzen.

Die Zersetzung, welche diese Gruppe der Lignin-abbauenden Pilze bewirkt, verläuft so, dass die Zellwand stark quillt und sich ihre Schichten und Lamellen nach und nach in das Zellinnere ablösen. Dies muss jedoch nicht nur für die Lignin-abbauenden Pilze charakteristisch sein. Die Delignifikation dringt jedoch immer aus dem Innern der Zelle zu ihrer Oberfläche vor. In den späteren Zersetzungsphasen sind auch die Mittellamellen zersetzt und die völlig delignifizierte Zellen aus dem Gewebe gelockert. Durch die Zersetzung der Ligninimprägnation werden auch Gruppen von Zellulosefibrillen der Zellwand gelockert und quellen zu rosenkranzförmigen Gebilden auf. Die delignifizierte Zellwände sind dann in den Endphasen durch hydrolytische Enzyme Lignin-abbauender Pilze zersetzt, so dass sie restlos schwinden können und im Gewebe des Holzes leere Räume entstehen.

Die angeführten Beispiele der Veränderungen in der Struktur der verholzten Zellwände zeigen, auf wie mannigfache Art ihre Zersetzung verlaufen kann. Darum sind die mikroskopischen Methoden eine geeignete Ergänzung der chemischen und der physikalisch-chemischen Methoden, deren man sich beim Studium der Humifikationsprozesse bedient.

*Laboratorium für Physiologie
und Anatomie der Pflanzen,
Universität Brno, ČSR*