

Mrazové poškození ovocných dřevin

Frost damage of fruit trees

Alois Bilavčík, Jiří Zámečník, Miloš Faltus

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Abstrakt

Generativní orgány ovocných dřevin jsou často poškozovány jarními mrazíky. V posledních letech i u ovocných dřevin jako je jabloň. Byla sledována ledová krystalizační aktivita částí kvetoucího prýtu jabloně i její vývoj během ontogeneze generativního pupene v průběhu jarních měsíců. Nejvyšší ledová krystalizační aktivita byla v brachyblastu, především v jeho borce a tato aktivita souvisí se strukturální povahou. Během vývoje květních pupenů jabloní dochází k postupné ztrátě odolnosti květních orgánů k mrazu, v důsledku zmenšování, posléze až k vymizení bariér proti šíření ledu, které se nacházejí mezi květní stopkou a brachyblastem.

Klíčová slova: ovocné dřeviny, generativní orgány, mráz, poškození

Abstract

Generative organs of fruit trees often suffer from spring frosts. Even the apple trees can be damaged. Ice nucleation activity of parts of flowering apple tree shoots during spring development was evaluated. The highest ice nucleation activity was found in brachyblast, preferably in its bark part, and is probably of structural origin. During spring ontogenetic development, the frost resistance of apple flower buds diminishes due to disappearing of barriers against frost spreading located between flower pedicel and brachyblast.

Keywords: fruit trees, generative organs, frost, damage

Úvod

Teplotní meze a schopnost přežití rostlin

O přežití rostlin rozhodují jejich schopnosti snášet extrémní podmínky prostředí bez poškození nebo se po nich regenerovat. Nízké teploty jsou jedním z nejdůležitějších faktorů limitujících rozšíření a produktivitu rostlin. Zejména poškození mrazem je značným ekonomickým problémem nejen v oblastech mírného pásu, ale zasahuje až do subtropů. Podle odolnosti k nízkým teplotám rozlišujeme rostliny na tři kategorie; 1) citlivé na chlad, poškození již při teplotách nad bodem mrazu, tropické byliny a dřeviny, některé houby a řasy teplých oceánů, 2) citlivé na mráz, poškození tvorbou a růstem ledu ve svých

pletivech, chrání se před mrazovým poškozením osmotickým přizpůsobením nebo krátkodobým podchlazením, což jim umožňuje přežít teploty několik stupňů pod bodem mrazu, tropické a subtropické byliny a dřeviny, bentické řasy chladných oceánů, některé sladkovodní řasy a různé druhy rostlin teplých oblastí mírného pásma, 3) snášející mráz, jejich pletiva přežívají v chladném období dvěma způsoby: tolerancí extracelulárního vymrznání ledu a s tím spojeným odčerpáváním vody z buněk; dlouhodobým podchlazením buněk (vytrvalé suchozemské rostliny oblastí s chladnými zimami, mechy všech klimatických pásem, určité sladkovodní řasy, řasy přílivové zóny moří a aerofytické řasy). Určité druhy bylin a dřevin, mnohé lišejníky a některé řasy jsou schopny získat odolnost k extrémně nízkým teplotám. Bylo zjištěno, že ačkoliv u těchto rostlin dochází k vymrznutí vody během zimy, jsou schopny přežít v kapalném dusíku (-196 °C) (Sakai 1960).

Fyzikální účinky stresu vyvolaného nízkými teplotami

Nízké teploty ohraničují výskyt organismů podle toho, jak dlouho a intenzivně působí, jak jsou proměnlivé. Záleží také na stupni aktivity a fázi otužení rostlin. Mrazové poškození se může projevit jako mírný stres, který následně zvětší poškození rostlin jinými stresy nebo může působit přímé poškození generativních i vegetativních orgánů rostlin (Reisch 1991). Stres lze charakterizovat jako vystavení organismu nepříznivým podmínkám, které však nemusí nutně představovat ohrožení jeho života, ale navozují odpověď (obranné a adaptační reakce), pokud organismus není v klidovém stádiu. Klidová stadia organismů (suché spory a poikilohydrické rostliny) mohou přežít bez poškození všechny přirozené teploty vyskytující se na zemi (Larcher 1988). Stres mrznutí vzniká při teplotách pod bodem mrazu čisté vody při atmosférickém tlaku (Levitt 1980). Při teplotách pod tímto bodem dochází v rostlinných pletivech obvykle k tvorbě ledových krystalů. Dochází-li k velmi rychlému ochlazení, 10 i více stupňů Celsia za minutu, vytváří se ledové krystaly intracelulárně, což je pro buňku letální. V přirozených podmínkách však teplota klesá mírněji, čímž se vytváří podmínky pro vznik ledových krystalů extracelulárně. Redistribuce volné vody trvá v pletivu tak dlouho, dokud nenastane rovnovážný stav tenze vodní páry nad ledem v intercelulárách a roztokem v protoplastu (Weiser 1970). Teplota buněk může poklesnout pod bod mrazu bez vzniku ledových krystalů, což se označuje jako podchlazení. Malé objemy čisté vody lze podchladiť až k -40 °C, větší objemy na -10 až -20 °C (Ashworth a Abeles 1984). Aby voda začala mrznout, musí se určitý počet molekul vody uspořádat do krystalové mřížky ledu. Okolo -40 °C začíná tvorba ledu spontánním uskupením molekul do ledové mřížky, tzv. homogenní katalýzou tvorby ledu. Při teplotách blízkých se k 0 °C zmrzne voda až po přidání ledu, či vhodných cizorodých katalyzátorů, tzv. heterogenních ledových jader (Hobbs 1974). Mezi -8 až -15 °C

plní funkci heterogenních ledových jader anorganické látky, (např. jodid stříbrný, prachové částice), v rozmezí -5 až 0 °C látky organického původu v krystalické formě, (např. steroidy, aminokyseliny, proteiny aj.) (Parungo a Lodge 1965), nebo některé druhy organismů, např. bakterie rodu *Pseudomonas* (Luisetti *et al.* 1991) a *Erwinia* (Lindow 1983a).

Poškození rostlin nízkými teplotami

V případě poškození rostlin nízkými teplotami je třeba rozlišovat poškození způsobené poklesem teploty k bodu mrazu a poškození vyvolané tvorbou ledových krystalů v rostlinných pletivech vystavených teplotám pod nulou stupňů Celsia. Některé tropické rostliny a rostliny z chladnějších oblastí ve stádiu aktivního růstu, jsou poškozovány chladem i při teplotách několik stupňů Celsia nad nulou. Příčinou je poškození biomembrán a selhání metabolismu. Působením teplot pod 0 °C dochází u podchlazených buněk rostlin k intracelulárnímu zmrznutí vody, kromě parenchymatických buněk dřevních paprsků (Ristic a Ashworth 1994). K intracelulárnímu zmrznutí protoplastu dojde okamžitě po iniciaci tvorby ledu ledovým krystalizačním jádrem. Buňky, u kterých dochází k extracelulárnímu vymrzávání vody, jsou vystavovány mechanickému tlaku a dehydrataci protoplastu během růstu ledových krystalů. Odčerpávání vody z protoplastu do rostoucích ledových krystalů probíhá podobně jako při účincích sucha. Rozdíl je však mezi lokalizací a formou vody odčerpávané z buněk. Při působení sucha dochází ke ztrátě vody výparem z pletiva oproti výše popsanému extracelulárnímu vymrzání, kdy však zůstává voda uvnitř pletiva. V průběhu tání se voda pohybuje z extracelulárního prostoru zpět do buňky, přičemž lokalizace vody se v rámci pletiva nemění. Vliv dehydratace během extracelulárního mrznutí se paralelně projevuje jako snížení turgorového potenciálu, zmenšení objemu celých buněk (vedoucí až ke zborcení buněčné stěny), či jen protoplastu, změny v prostorových vztazích částí buněčné membrány, zvýšení koncentrace vnitrobuněčného roztoku, precipitace rozpuštěných látek, změny pH, snížení chemické aktivity vody, odnětí hydratační vody z makromolekul, vznik elektrického potenciálu v důsledku oddělení nábojů a vytváření plynových bublin. Tyto následky dehydratace se staly základem mnoha hypotéz mechanismu mrazového poškození buněk: hypotéza minimálního kritického objemu, toxického vlivu různých látek při vysoké koncentraci, konformačních změn makromolekul při jejich dehydrataci vymrznutím frakce tzv. vitální vody. Jednotlivé hypotézy však komplexně nevysvětlují mechanismus poškození buněk mrazem. Nyní se předpokládá, že v důsledku cyklu mrznutí a tání dochází k řadě potenciálně letálních poškození, z nichž každé se může stát limitujícím faktorem přežití rostliny v daných podmínkách a čase (Weiser 1970, Zámečník a Prášil 1989).

Mechanismy odolnosti rostlin

Odolnost rostlin k teplotám pod bodem mrazu můžeme charakterizovat jako schopnost přežít při extrémních teplotách či předcházet nebo oddalovat stadia termodynamické rovnováhy. Existují dva typy mechanismů odolnosti rostlin k teplotám pod bodem mrazu: Mechanizmy úniku či oddálení tvorby ledových krystalů a mechanismy tolerance extracelulárního vymrzání (Larcher 1988). Mezi mechanismy úniku či oddálení tvorby ledových krystalů patří 1) Izolace proti mrazu je účinná pouze krátkodobě. Např. u polštářovitých rostlin a v hustých korunách stromů jsou vnitřní hlouběji uložené části méně ohrožené než vnější a 2) Schopnost podchlazení rostlinných pletiv je závislá na jejich struktuře, ontogenetickém stadiu, ročním období, povětrnostních podmínkách aj. Ve velkých parenchymatických buňkách a v cévách xylému trvá tento stav maximálně několik hodin (Ashworth a Wisniewski 1991). Trvale lze podchladiť i na nižší teploty malé buňky a buňky s dělenými vakuolami, které se vyskytují v pletivech bez velkých extracelulárních prostorů (Ashworth a Abeles 1984). U mechanismu tolerance extracelulárního vymrzání dochází především ke snížení vodního potenciálu buňky před působením mrazu osmotickým přizpůsobením. Osmotické přizpůsobení redukuje rozsah mrazového poškození pouze při teplotách několik stupňů pod nulou (Yelenosky a Guy 1989). V průběhu extracelulárního vymrzání se tvoří led v apoplastu a ustaví se gradient vodního potenciálu mezi extracelulárním ledem a intracelulární vodou v protoplastu. Nižší vodní potenciál ledu v porovnání s vodním potenciálem intracelulární vody je příčinou přesunu vody v led. Tento proces závisí na teplotě, koncentraci buněčné šťávy a je ovlivněn dehydratací. Při ustavení rovnováhy mezi vodním potenciálem ledu a vody se proces dehydratace buňky zastaví. Pokud nyní dochází k poklesu nebo vzrůstu teploty, protoplast je dále dehydratován resp. rehydratován. Čím negativnější je osmotický potenciál, tím větší množství vody je v buňce osmoticky vázáno na složky protoplazmy ve formě molekulových sluků (strukturovaná voda). Jako osmotikum mohou působit hlavně cukry (Yelenosky a Guy 1989), některé aminokyseliny (hlavně prolin), organické kyseliny a bílkoviny (Yelenosky 1978, Witt *et al.* 1989). V průběhu vegetace dochází ke změně mrazové odolnosti pletiv. V souvislosti se snížením osmotického potenciálu (zvýšením obsahu glukózy a fruktózy) byl pozorován nárůst odolnosti po chladové aklimaci listů citrusů, špenátu a petúnie (Anderson *et al.* 1983, Yelenosky a Guy 1989). Tolerance rostlinných pletiv k mrazu je geneticky daná schopnost protoplazmy jejich buněk snášet teploty pod bodem mrazu, během kterých dochází k růstu ledových krystalů v extracelulárních prostorech a ke ztrátě vody z protoplastu. Redukce objemu vody v protoplastu je u parenchymatických pletiv bylin, či borky dřevin spojena s redukcí buněčného objemu (Ashworth *et al.* 1988). Diferenční termickou analýzou pletiv, u

kterých dochází k extracelulárnímu mrznutí vody, se zaznamená pouze jedna exoterma (teplota při které dojde k uvolnění tepla během mrznutí vody ve vzorku) a to při teplotách několik stupňů pod nulou. U prýtlů dřevin tato exoterma odpovídá zmrznutí vody v cévách xylému a extracelulárních prostorech borky a nesouvisí s mrazovým poškozením těchto pletiv (Burke *et al.* 1976). Některá pletiva vykazující extracelulární mrznutí mohou přežívat teploty pod $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a např. pletiva borky různých mrazuvzdorných dřevin vydržela až $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, pokud byla rychlost mrznutí do $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ relativně pomalá (Sakai 1960). Schopnost tolerance pletiv k extracelulárnímu mrznutí je v průběhu vývoje rostliny různá, v závislosti na ontogenetické fázi organismu, ročním období a celkovém zdravotním stavu rostliny. V oblastech, kde se střídají teplá období s obdobími, kdy teploty klesají pod bod mrazu (střídání ročních období), jsou rostliny cyklicky vystavovány nízkým teplotám. Tyto změny teplot bývají pozvolné, a proto dochází pravidelně k postupnému otužování rostlin. V období růstu, kdy se teplota pohybuje vysoko nad bodem mrazu, dochází po expozici rostlin poklesu teploty několik stupňů Celsia pod nulu bezprostředně k jejich zmrznutí (Yelenosky 1990). V tomto období rostliny nejsou schopny otužování. Po skončení období růstu následuje predormantní stadium. Jsou-li nyní rostliny vystaveny teplotám několik málo stupňů Celsia nad nulou po několik dnů až týdnů, dojde k indukci otužování. V této fázi dochází k hromadění cukrů v protoplasmě, snižuje se množství vody v buňkách, centrální vakuola se dělí na více menších vakuol (Yelenosky 1978, Levitt 1980). Zvýšená akumulace nízkou teplotou indukovaných bílkovin CAPs byla pozorována u citrusů (Witt *et al.* 1989), špenátu (Guy a Haskell 1987), pšenice (Zámečník a Bieblova 1994). Pravděpodobně by se mohly CAPs uplatňovat při stabilizaci buněčných struktur, či působit na růst ledových krystalů. Teploty nad bodem mrazu na konci zimy, či vyšší teploty uprostřed zimy po několik dnů mohou způsobit rychlou ztrátu odolnosti rostlin. Po období zimního klidu odolnost rostlin vůči nízkým teplotám i schopnost získat tuto odolnost rychle klesá. Existuje úzká souvislost mezi aktivitou rostliny při iniciaci nového růstu na jaře a snižováním odolnosti proti nízkým teplotám (Levitt 1980).

Odolnost generativních orgánů rostlin k mrazu

U dormantních květních pupenů dřevin dochází k iniciaci tvorby ledových krystalů v krycích šupinách a pletivech pod vyvíjejícím se květním orgánem (Ishikawa a Sakai 1985, Ashworth *et al.* 1989). Ledové krystaly se nešíří do květního meristému, ale zůstávají v krycích šupinách a spodní části osy květního pupene (receptákulu). Během mrznutí dochází k migraci vody z květního orgánu do rostoucích ledových krystalů v krycích šupinách a receptákulu. Segregaci ledových krystalů do určitých oblastí jevících se pro přežití pupene jako kritické nazvali Ishikawa a Sakai (1985) "extraorgánovým mrznutím". Ledové krystaly tvoří rozsáhlé

intercelulární prostory mezi epidermálními a ostatními buňkami krycích šupin a kolmo na podélnou osu v pletivech receptákula. Ačkoli jsou buňky v oblastech vzniklých intercelulárních prostor poškozeny, neprojevuje se to na životnosti pupene (Ashworth *et al.* 1989). Dormantní květní pupeny mnoha dřevin, včetně jabloně, jsou působením mrazu poškozovány pouze přílišnou dehydratací. V jejich květních meristémech se led netvoří ani při letálních teplotách (Sakai 1979). U jiných druhů dřevin, např. u broskvoní, pouze část vody květních meristémů vymrzá extracelulárně a zbytek se podchladí. Tyto typy květních pupenů jsou při letálních teplotách poškozovány zmrznutím podchlazených meristémů. U druhů dřevin s více květními meristémy v pupenu, např. u rybízu (Warmund *et al.* 1988), či rododendronu (Chalker-Scott 1992), mrznou podchlazená poupata jednotlivě. Mechanismem, který udržuje květní primordia u dormantních pupenů dřevin podchlazená, i za přítomnosti ledových krystalů v krycích šupinách a receptákulu, je souhrnem fyzikálních, strukturálních a morfologických vlastností. Chalker-Scott (1992) analyzovala bariéry proti šíření ledu u květních pupenů rododendronu jako oblasti buněk bohatých na fenolické látky v buněčných stěnách. Tyto oblasti prokázala ve květních stopkách jednotlivých poupat, receptákulu a v bazálních částech a na vnitřní straně krycích šupin. V průběhu vývoje generativních pupenů dřevin schopnost podchlazení jejich meristémů klesá (Warmund *et al.* 1988). Podle Ashworth *et al.* (1989) je tento pokles způsoben rozvojem xylému, čímž dochází k porušení bariér proti šíření ledu mezi květními orgány a prýtem. Pokud dojde ke tvorbě ledových krystalů v prýtu, led se může šířit diferencovaným xylémem až do květů. Rychlost šíření ledu v cévních elementech xylému broskvoní dosahuje hodnot okolo 7 cm/min (Andrews *et al.* 1986), ale např. u obilovin až ke 34 cm/min (Zámečník *et al.* 1995). Kritické teploty, na které lze podchladiť květy ovocných dřevin jsou závislé nejen na rostlinném druhu a délce mrazu, ale také na jejich vlhkosti. Vlhké květy hrušní jsou poškozovány při vyšších teplotách než suché (Strang *et al.* 1980). Podle Brennan *et al.* (1993) jsou hlavním důvodem zmrznutí květů ovocných dřevin poškození pestíku, který je k mrazovému stresu nejcitlivější. Bylo zjištěno, že oddělené květy různých druhů ovocných dřevin (Dostálek 1958), ale i bylin (Robberecht a Junttila 1992) vystavené teplotám pod bodem mrazu, jsou schopné podchlazení na teploty o několik stupňů Celsia nižší, než když jsou spojeny s částí prýtu.

Vliv INA⁺ bakterií při mrazovém poškození rostlin

Kromě fyzikálních faktorů (snížení teploty) se při mrazovém poškození uplatňují i biotické faktory. Je známo, že rozsah poškození působením stresových faktorů určují interakce mezi fyzikálními a biologickými podmínkami prostředí (bakterie, houby, viry, hmyz). Dříve se předpokládalo, že mrazové poškození je důsledek působení nízkých teplot. Dnes je známo, že

mrazové poškození souvisí nejen s mrazovým stresem, ale je také v interakci s bakteriemi žijícími na povrchu rostlin (Lindow a Connell 1984, Young 1987). Některé druhy bakterií jsou příčinou větší citlivosti k nízkým teplotám rostlin citlivých na mráz, neboť iniciují tvorbu ledových krystalů. Podle Klement *et al.* 1984 mohou INA⁺ bakterie po inokulaci do floému a kambia kmene, kosterních větví a prýtů meruněk zužitkovat 19 - 48 % cukerných rezerv. Během vystavení mrazu pak dochází k jejich poškození a tím k větší citlivosti pletiv inokulovaných k patogenním bakteriím způsobujícím apoplexiu (mrtvici) či rakovinu. Nejvýznamnější druhy bakterií, u nichž byla prokázána ledová krystalizační aktivita, jsou *Pseudomonas* a *Erwinia*, běžná složka epifytní mikroflóry na širokém okruhu rostlin po celém světě (Lindow 1983b). Většina rostlin je kolonizována rozsáhlými epifytními populacemi bakterií, z nichž jeden či více druhů může být ledově krystalizačně aktivní. Množství ledově krystalizačně aktivních bakterií na rostlinném povrchu kolísá jednak mezi druhy a dále v závislosti na čase u daných druhů. V průběhu ročních období dochází k dynamickým změnám v početnosti ledově krystalizačně aktivních bakterií na rostlinných površích. Především během několika týdnů po začátku prorůstání pupenů vzrůstá počet INA⁺ bakterií až tisícinásobně, poté populace INA⁺ bakterií s nástupem teplejšího a suššího počasí na konci května rychle klesá pod méně než 100 buněk/g č. hm. (Olive a McCarter 1988). Ne všechny bakteriální buňky výše uvedených druhů jsou ledově krystalizačně aktivní ve stejném čase a teplotním rozmezí. U rodu *Pseudomonas*, je při teplotě -1,5 °C ledově krystalizačně aktivní pouze velmi malá část buněk, (méně než jedna z 10⁸ buněk). Při -5 °C vzrůstá podíl ledově krystalizačně aktivních bakterií již asi na 10 %. Mezi -1,5 až -4 °C katalyzují tvorbu ledových krystalků podle Lindow (1983b) pouze intaktní, živé buňky, zatímco poškozené, či mrtvé od -5 do -10 °C. Obata a Kawahara (1994) však zjistili ledovou krystalizační aktivitu u extracelulární ledové krystalizační substance izolované z bakterií rodu *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas* nad -4 °C. Krystalizační aktivita bakterií *Pseudomonas syringae* a *Erwinia herbicola* je lokalizována na vnější straně plazmalemy. a souvisí s přítomností specifického proteinu (Zhao a Orser 1990). Od 0 do -5 °C je asi 95 % krystalizačních jader na listovém povrchu bakteriálního původu. Rozsah mrazového poškození při výše zmíněných teplotách pozitivně koreluje s velikostí populace INA bakterií např. na povrchu kukuřičných semenáčků, rajčat (Lindow *et al.* 1982), či oddělených prýtů mandloní (Lindow a Connell 1984). K iniciaci tvorby ledu a následnému mrazovému poškození neporušeného listu, květu, plůdku, dokonce i skupiny listů, či květů teplotami, při kterých dochází k endogenní iniciaci tvorby ledových krystalů, stačí pouze jediné krystalizační jádro. Jakmile se začne na povrchu orgánu tvořit led, začnou se krystaly ledu velmi rychle šířit průduchy, hydatodami,

lenticelami či poraněním dovnitř pletiva (Burke *et al.* 1976). Jednou z možností jak snížit populaci ledově krystalizačně aktivních bakterií a tím následně ovlivnit mrazové škody např. u citrusů (Yelenosky 1983) je aplikace baktericidních látek (Lindow 1983a). Další z možností jak odstranit ledová krystalizační aktivitu bakterií je použití inhibitorů katalýzy tvorby ledu. Ledová krystalizační aktivita INA⁺ bakterií je citlivá k různým fyzikálním a chemickým faktorům, jako je extrémní pH a ionty těžkých kovů, především mědi a zinku, v roztoku (Lindow 1983b, Obata a Kawahara 1994). Pouze 0,1-10,0 % bakterií žijících na rostlinných površích patří k druhům s ledovou krystalizační aktivitou, avšak v době rašení se velikost jejich populace značně zvýší, což významně ovlivňuje iniciaci tvorby ledových krystalů. Existuje přirozený antagonismus mezi INA⁺ bakteriemi a bakteriemi, které ledovou krystalizační aktivitu nevykazují. Tento přirozený antagonismus může být posílen a využit k zmenšení počtu INA⁺ bakterií (Lindow 1983a, Bilavčík *et al.* 1994).

Materiál a metody

Kvetoucí prýty jabloně *Malus x domestica* Borkh. ‘Spartan‘ byly odebrány v květnu ve stádiu růžových pupat ze sadu Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. v Praze - Ruzyni a uchovávány v klimaboxu při 5 °C a při 70% relativní vzdušné vlhkosti (RH). Prýty jabloně určené k analýze bariér proti šíření ledu byly odebírány ze sadu v den experimentu. Měření začátku tvorby ledových krystalů ve vzorku bylo prováděno pomocí diferenční termické analýzy (DTA) (Burke *et al.* 1976). DTA zaznamenává rozdíl teplot termočlánků, měřícího u vzorku a referenčního, vzniklý uvolněním latentního tepla krystalizující vody vzorku. Na křivce mrznutí se rozdíl teplot termočlánků projeví jako exoterma. Varianty oddělené borky a dřevního válce o hmotnosti v rozmezí 0,23 - 0,30 mg u borky a 0,14 - 0,26 mg u dřevního válce, korunních lístků, květních stopek a plůdků byly vystavovány řízenému poklesu teploty 1 °C/min v krabičce v lihové lázni (Lauda RUK). Krabička se skládala z měděné destičky a skleněného víčka s přilepenými distančními pásy z umělé hmoty a ze sady čtyř termočlánků propojených na zapisovač. Vzorky byly připevňovány izolační páskou na měděnou destičku potaženou vyměnitelnou polyetylenovou folií. Varianty květů oddělených od brachyblastu, květů s brachyblastem spojených a samotných brachyblastů byly vystaveny mrazovému stresu na tzv. termobaterii. Ta sestávala z 35 termočlánků (měřících, umístěných ve vrcholech špiček pro 20-200 µl automatické pipety) kam se umísťovaly vzorky a z 35 termočlánků (referenčních) ponechaných bez vzorku. Termočlánky byly sériově zapojeny na zapisovač. Oddělené květy a květy spojené s brachyblastem byly umístěny na termobaterii tak, že se semeník dotýkal termočlánku. Brachyblast, jehož hmotnost se pohybovala v rozmezí 0,10 -

0,45 mg, byl cca 1 mm podélně navrtán ve středu řezné plochy a nasazen na termočlánek. Po 35 vzorcích od jednotlivých variant umístěných na termobaterii a v mrazicím boxu bylo vystavováno poklesu teploty do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí průměrně $0,34\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Teplota, při které došlo ke zmrznutí vzorku, byla měřena pomocí DTA. Vyhodnocení křivky mrznutí bylo prováděno pomocí metody pozitivní variance detekující náběžné hrany jednotlivých exoterm. Z jednotlivých částí kvetoucího prýtu byla ručním lisem vylisována šťáva a bezprostředně měřena její ledová krystalizační aktivita ve vzorku třiceti $10\text{ }\mu\text{l}$ kapek pomocí DTA v krabičce v lihové lázni s poklesem teploty $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Z chocholičnatých hroznovitých květenství jabloně s přibližně 1cm brachyblastem, které byly odebírány v průběhu 21. 3. - 25. 4., byly odstříhány krycí šupiny a tolik poupát, aby ve vzorku zbyla dvě. Vzorky byly vystavovány mrazovému stresu v krabičce, která byla ponořená v programovatelně řízené lihové lázni s poklesem teploty $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Měřicí termočlánky byly izolepou připevněné k vzorku tak, že jeden byl umístěn mezi poupata a druhý přibližně 1mm do hloubky navrtaného středu brachyblastu. Teplota, při které došlo ke zmrznutí byla měřena pomocí DTA.

Výsledky

Nejvyšší průměrné ledové krystalizační teploty (MNT) oddělených částí květu, prýtu viz tab. 1 vykazují borka brachyblastu, nezávisle na tom je-li oddělená od brachyblastu, či nikoliv a dřevní válec neoddělený z brachyblastu. LT_{50} , letální teplota při které zmrzla polovina květů spojených s brachyblastem dosahovala k hodnotám $-4,3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Květ vykvetlý v klimaboxu má o více než o dva stupně Celsia nižší LT_{50} , než květ odebraný ze sadu, a to $-8,8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tab. 1. Ledová krystalizační aktivita jednotlivých oddělených částí kvetoucího prýtu jabloně

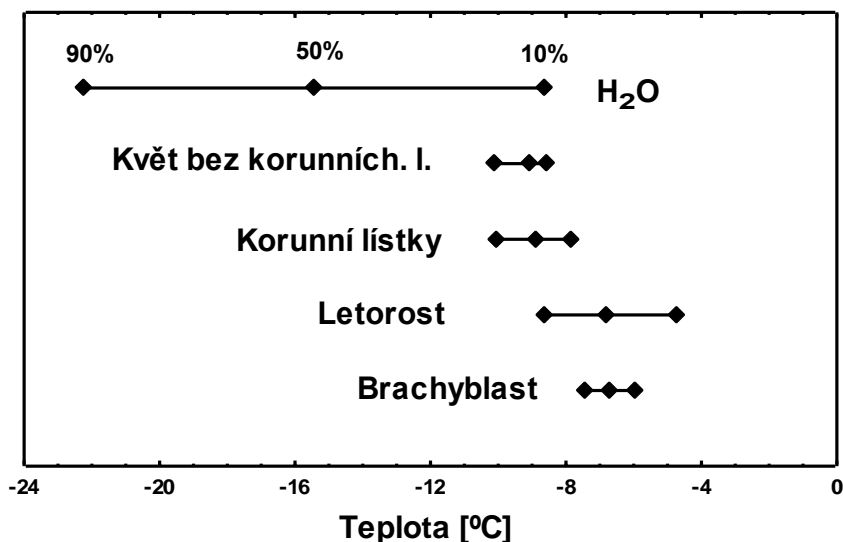
	Oddělená borka	Oddělený dřevní válec	Borka	Dřevní válec	Korunní lístek	Květní stopka	Plůdek
n	5	6	5	5	1	1	3
MNT [$^{\circ}\text{C}$]	$-3,9 \pm 1,52$	$-6,0 \pm 0,87^*$	$-4,4 \pm 2,43$	$-3,4 \pm 0,6$	$-10,5^*$	$-8,4^*$	$-7,7 \pm 0,45^*$

* Varianty statisticky průkazně se lišící od varianty borky na hladině 5 %.

Tab. 2. Ledová krystalizační aktivita květů oddělených od brachyblastu rozkvetlých v klimaboxu a v sadu, květů spojených s částí brachyblastu a samotných brachyblastů. Hmotnost brachyblastů se pohybovala od 0,10 do 0,45 mg.

Ledová krystalizační aktivita [°C]				
	Květ vykvetlý v klimaboxu	Květ vykvetlý v sadu	Květ spojený s částí brachyblastu	Brachyblast
n	35	35	35	35
LT 10	-5,1	-4,5	-3,2	-3,6
LT 50	-8,8	-6,1	-4,3	-4,9
LT 90	-10,0	-7,9	-6,5	-6,5

Průměrná ledová krystalizační aktivita lisované šťávy z různých částí kvetoucího prýtu jabloní nebyla vyšší, než -6,7 °C viz obr. 1.



Obr. 1 Ledová krystalizační aktivita šťávy lisované z částí kvetoucího prýtu jabloní.

Během vývoje květních pupenů docházelo k postupné ztrátě schopnosti podchlazení jednotlivých květních meristémů, až do stádia růžového poupěte, kdy jednotlivá poupata začínala mrznout přibližně při stejné teplotě, jako ostatní část vzorku viz tab. 3.

Tab. 3 Vývoj ledové krystalizační aktivity květních pupenů jabloně ‘Spartan‘ od 21. března do 18. dubna.

	Datum odběru vzorku a jeho stádium				
	Ledová krystalizační aktivita [°C]				
	21. 3. těsně uzavřený pupen	8. 3. těsně uzavřený pupen	14. 4. zelené poupě	18. 4. růžové poupě	18. 4. růžové poupě
Brachyblast	-4,3	-3,2	-2,5	-7,0/-7,0	-3,6
Voda celkového objemu	-4,4	-4,7	-4,7	--/--	-5,4
Jednotlivá poupata	11,6/-12,0	-12,0/-13,0	-8,7/-10,7	-7,0/-7,0	--
Průměrný ΔT mrznutí poupat proti brachyblastu	7,4	7,8	5	0/0	0

Diskuze

Působením mrazového může dojít v rostlinných pletivech ke tvorbě ledových krystalů. Pokud se ledové krystaly tvoří uvnitř rostlinných pletiv na endogenních ledových krystalizačních jádrech, mohou se šířit pletivy až do květních orgánů (jsou-li prosté bariér proti šíření ledu). Květy ovocných dřevin jsou vznikem ledových krystalů ve svých pletivech letálně poškozovány. Vytvoří-li se ledové krystaly na povrchu květu působením exogenních ledových krystalizačních jader, dojde k prorůstání ledových krystalů pletivy květů. Posouzením endogenní ledové krystalizační aktivity bylo možno rozdělit kvetoucí prýt na dvě skupiny. V první skupině, která byla schopna podchlazení na teplotu -6 °C a níže, byl květ nebo jeho části oddělené od brachyblastu a plůdek. V první skupině byl také dřevní válec, i když celý brachyblast, jehož je dřevní válec součástí, patřil ke druhé skupině, u které docházelo ke tvorbě ledových krystalů při teplotách pod $-4,9\text{ °C}$. V druhé skupině dále byla oddělená borka a květy neoddělené od brachyblastu. Z toho lze usoudit, že tvorba ledových krystalů ve květech byla ovlivněna brachyblastem nebo pouze jeho borkou. Zajímavý byl rozdíl $2,7\text{ °C}$ mezi mrznutím oddělených květů z klimaboxu ($-8,8\text{ °C}$) a květů odebraných v den měření přímo ze sadu ($-6,1\text{ °C}$). Tvorba ledových krystalů u květů vykvetlých v sadu při vyšší teplotě mohla být způsobena exogenními ledovými krystalizačními jádry. Proebsting a Gross (1988) uvádějí, že oddělené jabloňové květy mrzly při $-4,9\text{ °C}$. Pravděpodobnou příčinou vyšší MNT oddělených jabloňových květů oproti výsledkům této práce, mohla být přítomnost exogenních ledových krystalizačních jader aktivních při vyšší teplotě u květů, které výše zmínění autoři odebírali přímo ze sadu. Dalšími příčinami posunu mezi MNT zjištěných autory a Proebsting a Gross (1988) mohly být rozdíly vlastní rostlinnému materiálu

pocházejícího z různých lokalit či prostředí. Porovnáním ledové krystalizační aktivity xylémové šťávy (data neuvedena) a šťávy lisované z částí kvetoucího prýtu oproti neporušeným částem jabloně lze dojít k závěru, že ledová krystalizační jádra lokalizovaná v brachyblastu je strukturní povahy. K podobným výsledkům došli Andrews *et al.* (1986), kteří zjistili MNT homogenátu broskvoňových prýtů přibližně o 2 °C nižší než u neporušených prýtů. Podle laboratorních výsledků této práce může být zdrojem endogenních krystalizačních jader ledu u kvetoucího prýtu jabloně borka brachyblastu. U pupenů schopných podchlazování meristémů bylo na křivce mrznutí možné rozeznat tři typy exoterm. Exoterma vyskytující se při nejvyšší teplotě odpovídala mrznutí brachyblastu. Druhá v pořadí pravděpodobně reprezentovala vymrzání vody ve zbytcích krycích šupin a stopek po odstraněných poupatech. Třetí typ exoterm zaznamenaných při nejnižší teplotě odpovídal mrznutí jednotlivých pupat. Pokud byla při přípravě vzorků ke zmrazování poškozena strukturální integrita květních meristémů, nedocházelo k podchlazování jednotlivých pupat pupene. K podobným výsledkům došel Rajashekar (1989) u květních pupenů broskvoní. Z tabulky č. 3 je patrné, že u vyvíjejících se květních pupenů docházelo k postupné ztrátě schopnosti podchlazování meristémů. Při přechodu ze stádia zeleného poupěte do růžového se teplota, během níž docházelo ke tvorbě ledu u podchlazených květních meristémů, již nelišila od teploty, kdy začal vymrzat brachyblast. Zajímavý byl výsledek mrznutí vzorků květních pupenů ve fázi růžového poupěte (18. dubna) viz tab. 3, u kterých docházelo k pozdější iniciaci tvorby ledových krystalů v brachyblastu v porovnání se vzorky v jiných fázích vývoje. Dále zde bylo neobvyklé to, že se daly přesně určit exotermie obou pupat v celkové exotermě, i když začínaly mrznout hned po iniciaci ledem z brachyblastu. Poslední měřené pupeny ve stádiu růžového poupěte (25. dubna) již nevykazovaly větší schopnost podchlazování než ostatní části prýtu. Výše zmíněné nasvědčuje tomu, že u časných stádií květních pupenů jabloní existují bariéry proti šíření ledových krystalů, které však svou neprostupnost pro ledové krystaly postupně ztrácí a od stádia růžového poupěte již nejsou detekovatelné. Tyto bariéry zřejmě strukturní povahy se nacházejí mezi meristémem a brachyblastem. Bariéry proti šíření ledových krystalů nemusí být dané pouze neprostupností buněčných stěn (Chalker-Scott 1992), ale mohou se zde mohly uplatnit i jiné příčiny porušování diskontinuity vodní fáze vhodné pro šíření ledových krystalů. Cary (1985) u švestkových květů spojených s prýtem pozoroval podchlazování semeníku, i když byl přítomen led v květní stopce. Pomocí matematického modelu simultánního toku tepla, vody a roztoků dospěl k tomu, že se může díky vodnímu toku k rostoucím ledovým krystalům

vytvořit diskontinuita ve vodní fázi mezi květní stopkou a semeníkem, která vytvoří bariéru proti šíření ledu. Tato diskontinuita je předurčena nízkým obsahem vody v květním lůžku.

Závěr

Byla prokázána endogenní ledová krystalizační aktivita u kvetoucích prýtů jabloní při teplotách, kdy dochází ke zmrznání květů jabloní v přirozených podmínkách. Ledová krystalizační aktivita byla lokalizovaná v brachyblastu, především v jeho borce (-3,9 °C). Získané výsledky nasvědčují tomu, že endogenní ledová krystalizační jádra jsou strukturní povahy. Během vývoje květních pupenů jabloní dochází k postupné ztrátě odolnosti květních orgánů k mrazu, v důsledku zmenšování, posléze až k vymizení bariér proti šíření ledu. Tyto bariéry se nacházejí mezi květní stopkou a brachyblastem. Výše uvedené teplotní charakteristiky generativních orgánů jabloně je možné využít v predikci mrazového poškození a následně k ochraně proti němu.

Literatura

- Anderson JA, Gusta LV, Buchanan DW, Burke MJ (1983) Freezing of water in citrus leaves, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108(3):397-400.
- Andrews PK, Proebsting EL, Jr., Gross DC (1986) Ice nucleation and supercooling in freeze-sensitive peach and sweet cherry tissues, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111(2):232-236.
- Ashworth EN, Abeles FB (1984) Freezing behavior of water in small pores and the possible role in the freezing of plant tissues, Plant Physiol. 76:201-204.
- Ashworth EN, Davis GA, Wisniewski ME (1989) The formation and distribution of ice within dormant and deacclimated peach flower buds, Plant, Cell and Environment 12:521-528.
- Ashworth EN, Echlin P, Pearce RS, Hayes TL (1988) Ice formation and tissue response in apple twigs, Plant, Cell and Environment 11:703-710.
- Ashworth EN, Wisniewski ME (1991) Response of fruit tree tissues to freezing temperatures, ve sborníku z: Breeding fruit crops for cold climates, 85th ASHS Annual Meeting/33rd CSHS Annual Meeting East Lansing, Mich. 1988, HortScience 26:501-504.
- Brennan RM, Goodman BA, Chudek JA (1993) Freezing events in flowers of *Ribes nigrum* L. revealed by NMR microimaging, J. Hort. Sci. 68(6):919-924.
- Bilavčík A, Zámečník J, Kokošková B (1994) Decrease of frost damage of apple tree blossoms by antagonistic bacteria to INA⁺ bacteria, ve sborníku z: 7th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division, 7th International Congress of Mycology Division, Prague, Czech Republic, July 3rd - 8th, 1994, p. 258.

- Burke MJ, Gusta LV, Quamme HA, Weiser CJ, Li PH (1976) Freezing and injury in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 27:507-528.
- Cary JV (1985) Freeze survival in peach and prune flowers, *Plant Science Letters*, 37:265-271.
- Dostálek J (1957) Zmrzáni a přechlazování květů ovocných dřevin, *Rostlinná výroba* 8:983-998.
- Hobbs PV (1974) *Ice Physics* pp. 461-523, Oxford: Clarendon. 837pp, ve: Lindow S. E. (1983b): The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants, *Ann. Rev. Phytopatol.* 21: 383-384.
- Chalker-Scott L (1992) Disruption of an ice-nucleation barrier in cold hardy Azalea buds by sublethal heat stress, *Annals of Botany* 70:409-418.
- Ishikawa M, Sakai A (1985) Extraorgan freezing in wintering flower buds of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc., *Plant, Cell and Environment* 8:333-338.
- Klement Z, Rozsnay DS, Báló E, Pánczél M, Prileszky Gy (1984) The effect of cold on development of bacterial canker in apricot trees infected with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Physiol. Plant Pathol.* 24:237-246.
- Larcher W (1988): *Fyziologická ekologie rostlin*, Academia Praha.
- Levitt J (1980) *Responses of plants to environmental stresses*, Academic Press, New York, London.
- Lindow SE (1983a) Methods of preventing frost injury caused by epiphytic ice-nucleation-active bacteria, *Plant Dis.* 67: 327-333.
- Lindow SE (1983b) The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants, *Ann. Rev. Phytopatol.* 21:383-384.
- Lindow SE, Connell JH (1984) Reduction of frost injury to almond by control of ice nucleation active bacteria, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109:48-53.
- Lindow SE, Hirano SS, Barchet WR, Army DC, Upper CD (1982) Relationship between ice nucleation frequency of bacteria and frost injury, *Plant Physiol.* 70:1090-1093.
- Luisetti J, Gaignard JL, Devaux M (1991) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* as one of the factors affecting the ice nucleation of grapevine buds in controlled conditions, *J. Phytopathology* 133:334-344.
- Obata H, Kawahara H (1994) Characterization of extracellular ice - nucleating matter from ice - nucleating bacteria, ve:7th Int. Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division, 7th Int. Congress of Mycology Division, Prague, Czech Republic, July 3rd - 8th, 1994, p. 258.
- Olive JV, McCarter SM (1988) Occurrence and nature of ice nucleation - active strains of *Pseudomonas syringae* on apple and peach trees in Georgia, *Plant Disease* 72:837-847.

Parungo FP, Lodge JP (1965) Molecular structure and ice nucleation of some organics, J. Atmos. Sci. 22:309-313, ve: Lindow S., E. (1983b):The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants, Ann. Rev. Phytopatol. 21:383-384.

Proebsting EL, Jr, Gross DC (1988) Field evaluations of frost injury to deciduous fruit trees as influenced by ice nucleation-active *Pseudomonas syringae*, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113(4):498-506.

Rajashekar CB (1989) Supercooling characteristic of isolated peach flower bud primordia, Plant. Physiol. 89:1031-1034.

Reisch BI (1991) Breeding fruit crops for cold climates: Introduction to the colloquium, ve sborníku: Breeding fruit crops for cold climates, 85th ASHS Annual Meeting/33rd CSHS Annual Meeting East Lansing, Mich. 1988, HortScience 26:500-501.

Ristic Z, Ashworth EN (1994) Response of xylem ray parenchyme cells of red osier dogwood (*Cornus sericea* L.) to freezing stress, Plant Physiol. 104:737-746.

Robberecht R, Junttila O (1992)The freezing response of an arctic cushion plant, *Saxifraga caespitosa*: acclimation, freezing tolerance and ice nucleation,Annals of Botany 70: 129-135.

Sakai A (1979) Freezing avoidance mechanism of primordial shoots of conifer buds. Plant Cell Physiol 20:1381-1390

Sakai A (1960) Nature 185:393, ve: Weiser C. J. (1970) Cold resistance and injury in woody plants, Science 169:1269-1278.

Strang JG, Lombard PB, Westwood MN, Weiser CJ (1980) Effect of duration and rate of freezing and tissue hydration on "Bartlett" pear buds, flowers, and small fruit, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105:102-107.

Warmund MR, George MF, Cumble BG (1988) Supercooling in "Darrow" blackberry buds, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113(3): 418-422.

Weiser CJ (1970) Cold resistance and injury in woody plants, Science 169:1269-1278.

Witt W, Mauk CS, Yelenosky G (1989) Glycoproteins in citrus foliage and callus tissue as affected by cold-hardening temperature and abscisic acid, J. Plant Physiol. 134:716-721.

Yelenosky G (1978) Cold hardening "Valencia" orange trees to tolerate -6,7 °C without injury, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103: 449-452.

Yelenosky G (1983) Ice nucleation active (INA) agents in freezing of young citrus trees, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108: 1030-1034.

Yelenosky G (1990) Survival of young cold - hardened "Hamlin" orange trees at -6,7 °C, Hortscience 25(1):98-99.

Yelenosky G, Guy CL (1989) Freezing tolerance of citrus, spinach, and petunia leaf tissue, *Plant. Physiol.* 89:444-451.

Zámečník J, Bieblová J, Grospietsch M (1995) Safety zone as a barrier to root-shoot ice propagation, ve: F. Baluška *et al.* (eds.) *Structure and function of roots* 311-317. Cluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

Zámečník J.,Prášil I. (1989):ve:Naučný slovník zemědělský, písm. V:316-318, Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství v SZN.

Zámečník J, Bieblová J (1994) Antifreeze proteins detected in triticale genotypes with different frost tolerance, *Biologia Plantarum* 36(suppl.):325.

Zhao Ji-liang, Orser CS (1990) Conserved repetition in ice nucleation gene *inaX* from *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*, *Mol Gen Genet* 223:163-166.

Poděkování

Vzniklo za podpory Institucionálního projektu VÚRV, v.v.i. RO0417 a NAZV QJ1630301.

Kontakt:

RNDr. Alois Bilavčík, Ph.D.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Drnovská 507, 16106 Praha 6 – Ruzyně

233022433, bilavcik@vurv.cz