

ALINA KACPERSKA-PALACZ, EWA DŁUGOKĘCKA

## METODYKA PRZEPROWADZANIA OCENY ODPORNOŚCI ROŚLIN NA ZAMARZANIE

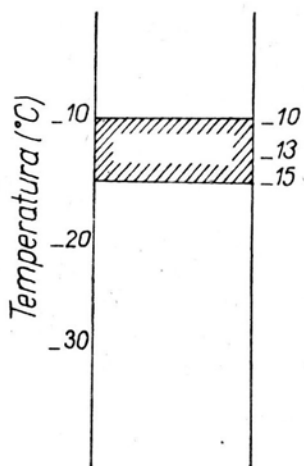
Znanym, od dawna obserwowanym zjawiskiem jest różna wrażliwość roślin klimatu umiarkowanego na działanie mrozu. Wrażliwość ta jest nie tylko cechą gatunkową, czy odmianową, ale również jest właściwością zmienną w czasie, uzależnioną od warunków środowiska. Współczesne poglądy na istotę tego zjawiska zostały omówione przez autorkę w specjalnym artykule (Kacperska-Palacz, 1970). Istotnym zagadnieniem dla botanika, jak również dla rolnika, lub hodowcy nowych odmian, staje się dobrane właściwej metody oceny uszkodzeń mrozowych w celu ustalenia poziomu odporności mrozowej badanej rośliny czy tkanki.

### Wpływ warunków testowania na rozmiar uszkodzeń

Uszkodzenia wywołane przez mróz spowodowane są krystalizacją lodu w tkance. Wielkość uszkodzeń i ich skutek zależą głównie od miejsca, w jakim zachodzi krystalizacja. I tak — powstanie lodu na terenie komórki, w jej cytoplazmie, prowadzi nieuchronnie do śmierci komórki. Natomiast krystalizacja lodu w przestrzeniach międzykomórkowych może nie pociągnąć za sobą śmiertelnych dla komórki skutków, o ile nie nastąpi nadmierne odwodnienie protoplastu prowadzące do nieodwracalnych zmian w strukturze białek (m. i. Levitt, 1962). O miejscu powstania lodu decyduje przede wszystkim szybkość schładzania tkanki: przy powolnym schładzaniu lód krystalizuje w przestrzeniach międzykomórkowych, natomiast gwałtowne ochłodzenie tkanki może wywołać krystalizację wewnątrzkomórkową. Gwałtowne tajanie powstałego w przestrzeniach lodu może również spowodować powstanie uszkodzeń wywołanych napierającą na protoplast wodą.

Na istnienie takiej właśnie zależności między tempem schładzania i tajania a wielkością powstałych uszkodzeń wskazuje wielu badaczy, chociaż wyniki przeprowadzonych przez nich doświadczeń czasami świadczą o braku podobnej zależności, szczególnie, jeśli chodzi o porównywanie wrażliwości różnych tkanek. Fakt

ten tłumaczy Levitt (1966), wskazując na istnienie trzech zakresów ujemnej temperatury, w stosunku do których tkanka wykazuje różną wrażliwość (ryc. 1). Jeśli roślina poddana zostaje działaniu temperatury znacznie niższej niż wynosi temperatura jej zabicia, tkanka zostaje całkowicie zniszczona, niezależnie od tego jak wolno została zamrożona i odtajana. Jeśli natomiast podziela się na roślinę temperaturą wyższą niż temperatura zabicia, tkanka jej przeżyje, pomimo nawet bardzo gwałtownego schładzania i tajania. Pomiędzy tymi dwoma zakresami temperatury leży strefa pośrednia, mniej lub bardziej szeroka, rozciągająca się trochę ponad i prawdopodobnie nieco poniżej temperatury zabicia tkanki poddanej wolnemu zamrażaniu



Ryc. 1. Wpływ tempa zamrażania i tajania na roślinę o umiarkowanej odporności (wg Levitta, 1966). 10. Zabita przy szybkim zamarzaniu i szybkim tajaniu; 13. Zabita przy szybkim zamarzaniu i powolnym tajaniu; 15. Zabita przy powolnym zamarzaniu i szybkim tajaniu

i powolnemu ocieplaniu. Wewnątrz tej strefy stopień uszkodzenia zależy bezpośrednio od szybkości zamrażania i tajania, przy czym wydaje się, że szybkość zamrażania jest czynnikiem bardziej istotnym dla przeżycia tkanki niż szybkość tajania. Wynika to ze wspomnianego już faktu powstawania lodu w protoplasmie na skutek gwałtownego zamarzania, co prowadzi do śmierci komórki nawet wtedy, gdy stosowana temperatura mogłaby być zupełnie nieszkodliwa, o ile lód wykrystalizowałby w przestrzeniach międzykomórkowych. Należy tu jednak zdać sobie sprawę z tego co oznacza termin wolne lub gwałtowne schładzanie lub schładzanie ultraszybkie. To ostatnie jak wiadomo, z powodzeniem stosowane jest w celu zachowania nienaruszonej struktury żywych komórek i nosi nazwę witrifikacji lub inaczej — zeszklenia treści komórkowej. W tym przypadku nie dochodzi do powstawania kryształów lodu widzialnych pod normalnym mikroskopem. Badania Luyeta (1954) przeprowadzone przy użyciu promieni Rentgena wykazały, że w rzeczywi-

stości dochodzi do powstania kryształów lodu, ale rozmiary ich są submikroskopowe. Nazwę wityfikacji zachowano dla odróżnienia tego procesu od poprzednio omówionego, w którym powstają kryształy lodu o wymiarach mikroskopowych.

W tabeli I zestawiono stosowane terminy określające różne tempa schładzania wycinków tkanki lub całych roślin.

Z tabeli tej wynika, że tempo schładzania skrawków może być znacznie szybsze niż całych roślin. Ogólnie biorąc tempo to musi być 60 razy większe, aby spowodować wewnątrzkomórkową krystalizację lodu w komórkach skrawków, w porównaniu do całych roślin. Wynika to ze sprawniejszego przemieszczania się cząsteczek wody z komórki skrawka do jego części powierzchniowych, gdzie ma miejsce krystalizacja lodu. W całych roślinach drogą dyfundujących cząsteczek wody do miejsc

Tabela I

Przybliżone tempo schładzania przy różnych szybkościach schładzania (wg Levitta 1966)

Szybkość schładzania	Skrawki tkanek	Cała roślina
Wolne	1—2°C/min. lub mniej	1—2°C/godz. lub mniej
Szybkie	5—20°C/min.	5—20°C/godz.
Ultraszybkie dla stosunkowo suchej tkanki	100°C/sek. lub więcej	
Ultraszybkie dla uwodnionej tkanki	10 000°C/sek. lub więcej	

krystalizacji lodu (np. do naczyń przewodzących) jest znacznie dłuższa i fakt ten zwiększa niebezpieczeństwo powstawania lodu w samych komórkach, o ile zabraknie czasu na usunięcie zdolnej do krystalizacji wody.

Mechanizm uszkodzeń spowodowanych gwałtownym tajaniem lodu nie jest jeszcze zupełnie znany. Być może wchodzi tu w grę zdolność komórki do regeneracji plazmolemy (Tumanow 1967) uszkodzonej zamrażaniem, a więc sprawa szybkiego zabezpieczenia komórki przed wymywaniem jej zawartości przez wnikałą gwałtownie wodę.

Wielokrotnie dyskutowane w literaturze było zagadnienie czy uszkodzenia powstają przy zamrażaniu, czy też przy tajaniu tkanki. Często bowiem obserwuje się pierwsze objawy uszkodzeń dopiero po pewnym czasie po odtajaniu. Zjawisko to występuje głównie przy krystalizacji lodu w przestrzeniach międzykomórkowych, ponieważ krystalizacja lodu wewnątrz komórki zawsze prowadzi do jej śmierci, co zostało już omówione. Obecnie przyjmuje się, że istnieją cztery momenty, w czasie których mogą wystąpić uszkodzenia w przypadku krystalizacji lodu na zewnątrz komórki (Levitt, 1966):

1. W momencie zamrażania. Bezpośrednie dowody na ten rodzaj uszkodzeń są bardzo nieliczne. Niektóre rośliny zmieniają kolor w warunkach dla nich śmier-

telnych, np. biała orchidea staje się niebieska, a czerwone glony pomarańczowieją. U innych roślin zaczyna wydobywać się z tkanki nowy zapach np. kumaryny. Takie właśnie zjawiska obserwowano przy zamarzaniu tych roślin. Zjawiska te spowodowane są prawdopodobnie wejściem enzymu w bezpośredni kontakt z substratem, od którego enzym ten był przestrzennie rozdzielony w żywej komórce.

2. Po ustaleniu się równowagi właściwej dla danej temperatury zamarzania. Na ten moment uszkodzeń wskazuje zwiększenie się uszkodzeń w miarę przedłużania czasu ekspozycji tkanki na daną temperaturę zamarzania.

3. Podczas tajania. Jak to już zostało wykazane, uszkodzenia mrozowe mogą być większe jeśli tajanie było gwałtowne. Wskazuje to na powstawanie dodatkowych uszkodzeń w trakcie tajania.

4. Po odtajaniu. Wielu badaczy np. Parker (1953), Larcher i Eggarter (1960) wykazało, że jeśli badany obiekt przetrzymano po odtajaniu w niskiej, ale plusowej temperaturze, wówczas uszkodzenia są mniejsze niż w przypadku przeniesienia próby od razu do temperatury pokojowej. Również obserwacje mikroskopowe przeprowadzane zaraz po odtajaniu wykazały, że komórki mogą być jeszcze wtedy żywe i wydawać się normalne, ale cała roślina może zginąć po paru dniach.

Zdawanie sobie sprawy z tych czterech momentów uszkodzeń jest nieodzownym warunkiem poprawnego przeprowadzenia testu odporności mrozowej. Z góry można bowiem przewidzieć konieczność ustandaryzowania warunków przemrażania i tajania.

### **Metody pomiarów odporności mrozowej roślin**

Od dawna obserwowane różnice w odporności mrozowej roślin klimatu umiarkowanego wyrażano początkowo jakościowo, posługując się terminami: rośliny wrażliwe lub odporne, w odniesieniu do szkód spowodowanych zimą. Nieco później wprowadzono określenia pośrednie: rośliny bardzo odporne, umiarkowanie odporne, mało odporne. Określenia te stosowano po ustaleniu procentowego przeżycia w warunkach polowych tzw. zimy testowej, a więc zimy wystarczająco surowej, aby zabić odmiany najbardziej wrażliwe i uszkodzić odmiany o pośredniej wrażliwości. Podobne warunki klimatyczne występują przeciętnie raz na dziesięć lat i dlatego taki sposób oceny bezpośredniego przeżycia wymagał wielu lat doświadczeń zanim można było wyciągać jakieś wnioski. Spowodowało to rozwój poszukiwań takiego narzędzia pomiaru, które by pozwoliło ocenić odporność roślin pośrednio, bez ich przemrażania. Narzędziem tym stały się dla wielu badaczy różne czynniki występujące w samej roślinie np. cukry redukujące, woda związana, których zawartość w wielu wypadkach wykazywała dobrą korelację z odpornością tkanki na mróz. Do dziś dnia poszukuje się cech roślinnych dobrze skorelowanych z mrozoopornością. Wiele z nich, początkowo bardzo obiecujących, nie wytrzymało próby dalszych badań. Ostatnio, dosyć obiecujące wyniki dają pomiary zawartości grup sulfhydrylowych (Schmutz, 1962), decydujących wg Levitta (1962)

o elastyczności protoplastu w czasie zamarzania i tajania. Jednak za mało jeszcze przebadano roślin, aby metodę tę dokładnie ocenić.

Dużym usprawnieniem w przeprowadzaniu oceny odporności roślin są komory zamrażające, po raz pierwszy zastosowane przez Harveya w 1918 roku (Harvey, 1918). Dają one możliwość przeprowadzenia szybkiej i ilościowej oceny odporności roślin. Badane rośliny różnych odmian przemraża się w określonej temperaturze, co pozwala na uszeregowanie ich w zależności od stopnia odporności na tę temperaturę. Badacze szwedzcy (Åkerman, 1927) zastosowali umowną skalę odporności od 1—10 i tą skalą posługiwali się przy uszeregowaniu różnych odmian pszenicy w zależności od ich odporności na mróz. Dużym minusem tej metody jest to, że nie pozwala ona na bezpośrednie porównanie odporności odmian i gatunków wymagających zastosowania zupełnie różnej temperatury zamrażania do oceny ich odporności.

Najlepszym, jak się wydaje, sposobem wyrażania odporności mrozowej różnych roślin jest podanie ich punktu zabicia mrozem (tzw. killing point), tzn. temperatury, która powoduje zabicie 50% tkanki roślinnej (Levitt, 1956). Czasami podaje się „ostateczny punkt zabicia mrozem“, dający 100% zabicie tkanki lub „początkowy punkt zabicia mrozem“, czyli temperaturę, która zaczyna powodować uszkodzenia (Pisek 1958, Larcher i Eggarter, 1960). Ten ostatni sposób wyrażania jest wg Larchera (Larcher i Eggarter, 1960) najbardziej odpowiednią miarą odporności na mróz u liści i gałązek, ponieważ daje się wymierzyć z największą dokładnością. Jednakże daje się on zastosować do oceny tylko delikatnych gatunków. Natomiast badacze szwedzcy wielokrotnie wykazali, że najłatwiejszym do określenia i najbardziej wartościowym jest punkt 50% zabicia, czyli temperatura średniej szkody wg terminologii Larchera (Larcher i Eggarter, 1960). Ten sposób wyrażania odporności jest obecnie szeroko stosowany.

Mrozowy punkt zabicia powinien być określany w warunkach standardowych. Nie istnieje jednak jeden, przez wszystkich przyjęty, ustandaryzowany sposób wyznaczania tego punktu. Levitt (1966) zaleca stosowanie następującej procedury. Z roślin genetycznie czystej linii, wyrosłych w identycznych warunkach środowiska, pobiera się serię pędów lub liści. Zawiesza się je w komorze zamrażającej w temperaturze 0°C i po wyrównaniu się temperatury ucięte powierzchnie przysypuje się śniegiem, aby zapobiec znacznemu przechłodzeniu tkanki. Następnie obniża się temperaturę z szybkością 1°C/godz. Z każdej serii temperaturowej leżącej w pobliżu spodziewanego punktu zabicia tkanki pobiera się po kilka pędów lub liści i przenosi szybko do pomieszczenia o temperaturze tuż powyżej 0°C, gdzie przechodzą one tajanie i mogą się zregenerować w ciągu 24 godzin. Po tym czasie przenosi się je do pomieszczenia o temperaturze pokojowej i zanurza uciętymi końcami do wody. Określa się procent uszkodzeń zaraz po wyraźnym ich wystąpieniu, tzn. po 2—7 dniach, zależnie od gatunku. Poszukiwaną temperaturą jest ta, po której wystąpiło 50 procentowe uszkodzenie badanych tkanek. Oczywiście, przedstawiony tu tok postępowania nie zawsze się daje zastosować we wszystkich szczegółach.

Zależy to głównie od możliwości technicznych każdej pracowni. Jednakże koniecznym warunkiem poprawnego przeprowadzenia testu jest ustandaryzowanie wszystkich jego etapów.

W większości przypadków, ustalenie mrozowego punktu zabicia tkanki jest wszystkim czego, wymaga się dla oceny odporności. Jednakże w przypadku bardziej teoretycznych rozważań zaproponowano (Levitt, 1966) określanie odporności jako różnicy pomiędzy punktem zabicia a punktem zamarzania soku:  $H = -(T_{K50} - T_{\Delta})$ , gdzie  $H$  = odporność,  $T_{K50}$  mrozowy punkt zabicia przy 50 procentowym uszkodzeniu tkanki,  $T_{\Delta}$  punkt zamarzania. Pozwala to na uzyskanie wartości 0 dla roślin zabijanych przy najlżejszym nawet mrozie oraz wzrastających wartości dla roślin bardziej odpornych. Poza tym eliminuje się tu ewentualny wpływ różnego stężenia soku komórkowego na obniżenie punktu krzepnięcia i w rezultacie — na zawyżenie wartości charakteryzujących odporność.

### Metody oceny stopnia uszkodzeń

Przy wyznaczaniu mrozowego punktu zabicia tkanki istotną bardzo sprawą staje się znalezienie szybkiej i obiektywnej metody oceny stopnia uszkodzeń. Ujawnienie się uszkodzeń wymaga okresu czasu, w którym roślina może kontynuować wzrost i trwa czasami parę tygodni. Bezpośrednie obserwacje uszkodzeń nie zawsze są możliwe np. w przypadku tkanek głębiej położonych lub nawet pąków. Dlatego szuka się metod pośrednich.

W użyciu znajduje się obecnie kilka takich metod, które można z grubsza podzielić na trzy zasadnicze grupy:

**Metody plazmolityczne.** Do plazmolizy zdolne są tylko żywe, nieuszkodzone komórki. Obserwacje mikroskopowe, wykonane na skrawkach przemrożonej uprzednio tkanki pozwalają dokładnie ocenić jaki procent komórek pozostał żywy. W niektórych jednak wypadkach może mieć miejsce zjawisko tzw. pseudoplazmolizy mrozowej: odwodniony na skutek krystalizacji lodu w przestrzeniach protoplast uległ skurczeniu i zabiciu i nie powrócił już do swojej poprzedniej objętości po powtórnym wniknięciu wody do komórki. Dlatego wielu badaczy (Scarth i Levitt, 1937; Siminovitch i Levitt, 1941; Siminovitch i Briggs, 1953; Sakai, 1955;) stosuje metodę deplazmolizy, obserwując pod mikroskopem ilość komórek zdolnych do całkowitej deplazmolizy. Metoda ta jednak tylko wtedy daje rezultaty, jeśli plazmoliza trwa wystarczająco długo np. parę godzin.

**Pomiary konduktometryczne.** Przeprowadzane są one albo w roztworze wodnym, w którym znajduje się badana tkanka, albo też w samej tkance.

Metodę pomiaru przewodnictwa elektrolitycznego wody, w której umieszczono badaną, uprzednio przemrożoną tkankę wprowadził w 1930 r. Dexter (Dexter, 1932) i do dziś stosowana jest ona regularnie przez wielu badaczy (Wilner, 1961; Bula i Smith, 1954; Hodgson i Bula, 1956; Kacperska-Palacz et al, 1969).

Zawartość zabitych mrozem komórek, na skutek zaniku półprzepuszczalnych właściwości błon cytoplazmatycznych wylewa się do przestrzeni międzykomórkowych, skąd dyfunduje do wody, w której pogrążona jest tkanka. Przewodnictwo elektrolityczne takiej wody wzrasta proporcjonalnie do ilości wnikażącego do niej elektrolitu, a ta z kolei zależy od ilości uszkodzonych tkanek. Zmiany przewodnictwa oblicza się w stosunku do przewodnictwa wody, w której znajdowała się tkanka nieprzemrażana, przechowywana w temperaturze powyżej 0°C przez okres równy okresowi przemrażania. Operując podobną masą tkanki i objętością wody można w ten sposób ocenić wielkość uszkodzenia spowodowanego daną temperaturą. Dexter (1932) stosuje jedną temperaturę testującą, za pomocą której porównuje odporność różnych roślin uprawnych. Jednakże można przy użyciu tej metody oznaczyć również punkt zabicia tkanki przemrażając próbki w różnych odpowiednio dobranych gradientach temperatury. Hodgson (1964) zmodyfikował nieco metodę Dextera określając zimoodporność jako procentową zawartość elektrolitów uwolnionych z tkanki na skutek działania mrozu, w stosunku do ogólnej ilości elektrolitów zawartych w badanej tkance. Tą ostatnią wartość ustalał przez pomiar przewodnictwa elektrolitycznego wody, w której zagotowano przemrożoną tkankę po uprzednim wykonaniu normalnych pomiarów przewodnictwa. Ten sposób przeprowadzenia testu umożliwi uniknąć błędów spowodowanych różną ewentualnie ilością i jakością elektrolitów zawartych w tkance i daje możliwość porównywania odporności różnych tkanek u różnych gatunków. Jednakże i ten sposób nie eliminuje wpływu bardzo ważnego czynnika jakim jest zmiana właściwości półprzepuszczalnych błon cytoplazmatycznych pod wpływem np. hartowania w temperaturze bliskiej 0°C.

Pomiary konduktometryczne przeprowadzane w tkance roślinnej polegają na pomiarze oporu stawianego przez tkankę przy przepływie prądu słabego prądu zmiennego. W tkance, w której pewna ilość komórek uległa zabiciu i zawartość ich wylała się do przestrzeni międzykomórkowych, wartość mierzonego oporu będzie niższa od wartości charakteryzującej nieuszkodzoną tkankę kontrolną i może nawet spaść do 5% tej ostatniej (Olien, 1964). Tego rodzaju pomiary zastosowane zostały już przez Osterhouta (1918) do oceny uszkodzeń spowodowanych przez różne czynniki, np. przez trucizny, szoki elektryczne, stężone roztwory soli. Polegają one na wprowadzeniu do liścia dwóch cienkich elektrod (lub przyłożenie elektrod w postaci blaszek do powierzchni liścia) i pomiarze przewodnictwa roztworu, który zwilża lub wypełnia przestrzenie międzykomórkowe, przy użyciu konduktometru zbudowanego na zasadzie mostku Wheatston'a. Elektrody w postaci blaszki mają tę przewagę nad igłowymi, że nie kaleczą tkanki i nie wywołują dodatkowego wycieku soku do przestrzeni międzykomórkowych. Jednakże użycie ich wymaga dodatkowego zabezpieczenia w postaci pasty uszczelniającej miejsca styku elektrod z powierzchnią liścia. Olien (1961, 1964), który używał takich właśnie elektrod, stosował odpowiednio przyrządzoną pastę z węgla drzewnego i agaru. Katz i Reinhold (1964) stosowali jako elektrody zwykłe igły iniekcyjne do zastrzyków

podskórnych. W naszych doświadczeniach metodycznych zastosowaliśmy igły platynowe, umieszczone na specjalnej „łapce“ zapewniającej stały i równy docisk ich do powierzchni liścia (Kacperska-Palacz, 1970). Stwierdziliśmy, że odstęp między elektrodami nie powinien być mniejszy niż 4 mm. Ponieważ wartość przyłożonego napięcia może mieć wpływ na błony cytoplazmatyczne, podawane są następujące ograniczenia: Olien podaje górną, dopuszczalną granicę dla stosowanego napięcia 3 volty (Olien, 1961), Katz i Reinhold (1964) stosowali prąd o częstotliwości 2 kHz i różnicę potencjałów 7 voltów w oparciu o pracę Höbera (1945), Teske (1965) stosował napięcia nawet wyższe niż 10 V, natomiast wg naszych badań przeprowadzonych na rzepaku i kapuście, wartość przyłożonego napięcia nie powinna przekraczać 6 voltów (Kacperska-Palacz, 1970 a). Częstotliwość prądu zmiennego powyżej 1 kHz nie ma wpływu na mierzoną wielkość.

Pomiary konduktometryczne przeprowadzane w tkance dają możliwość rejestrowania zmian w przepuszczalności błon cytoplazmatycznych zachodzących w trakcie schładzania lub pod wpływem innych czynników. Dają też możliwość szybkiego rozpoznania miejscowego, nieodwracalnego uszkodzenia tkanki (Kacperska-Palacz, 1970 a), natomiast nie bardzo nadają się do oceny stopnia uszkodzenia całej tkanki.

Metody oparte na przyżyciowym barwieniu komórek. Żywa cytoplazma w przeciwieństwie do martwej, ma zdolność akumulowania takich barwników jak eozylna, erytrozyna, chryzoidyna, rodamina (Höfler, 1953). Stosuje się również podawanie fluorochromu np. fluoresceiny. Żywa tkanka fluoryzuje żółto-zielono, natomiast martwa odmawia przyjęcia fluorochromu (Höfler, Ziegler i Luhan, 1956).

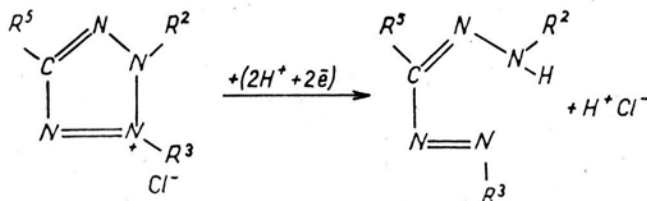
Do oceny poziomu aktywności życiowej komórek zastosowano również zmianę właściwości optycznych niektórych barwników np. błękitu metylowego lub związków tetrazoliowych po przejściu ich na inny stopień utlenienia. Istniejące w żywej tylko komórce układy enzymatyczne powodując utlenienie lub redukcję związku wprowadzonego do komórki wywołują zmianę barwy. Metodę tą stosowano początkowo w nasiennictwie w celu oceny zdolności nasion do kiełkowania, używając różnych związków. Ostatecznie Lakon (1954) zalecił stosowanie chlorku 2,3,5-trójfenylo-tetrazoliowego w celu wykazania aktywności enzymatycznej w nasionach pozostających w stanie spoczynku. Badacze tacy jak Parker (1953, 1955), Torsell i Hellstron (1955), Larcher i Eggarter (1960), Larcher (1969), z powodzeniem zastosowali ten związek do oceny uszkodzeń mrozowych.

Chlorek 2,3,5, trójfenylo-tetrazoliowy (w skrócie TTC) jest związkiem bezbarwnym, łatwo rozpuszczalnym w wodzie. W środowisku alkalicznym łatwo ulega redukcji do formazanu (ryc. 2), którego kryształy mają barwę karminowo-czerwoną i są w wodzie nierozpuszczalne. Natomiast dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych i olejkach eterycznych. Dehydrogenazy żywej komórki łatwo redukują TTC do formazanu, który już z tkanki nie dyfunduje. Martwe części

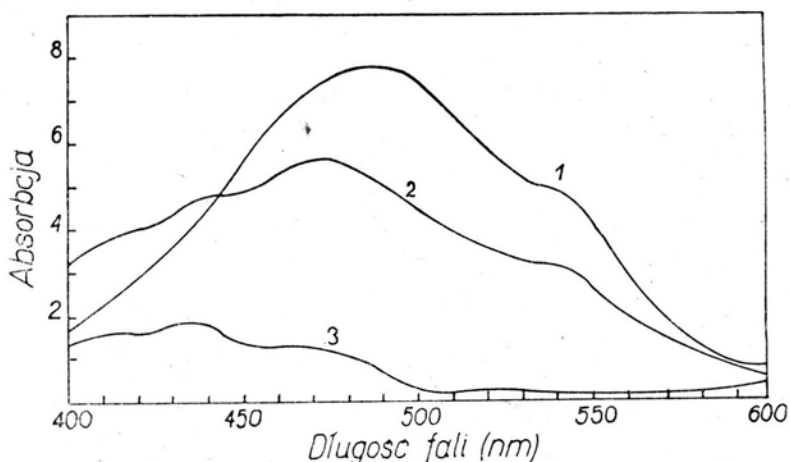


tkanki wyraźnie odróżniają się od żywych brakiem zabarwienia i pozostają takie całymi dniami, ponieważ proces redukcji TTC jest odwracalny tylko w specjalnych warunkach (Jerchel i Möhle 1944), które nie występują w żywej tkance.

Przy stosowaniu TTC dużą rolę odgrywa zarówno stężenie tego związku, jak i pH buforu, w którym zachodzi reakcja. Wg Marré i Arrigoni (1954) najlepsze



Ryc. 2. Redukcja chlorku trójfenylotetrazoliowego do formazanu

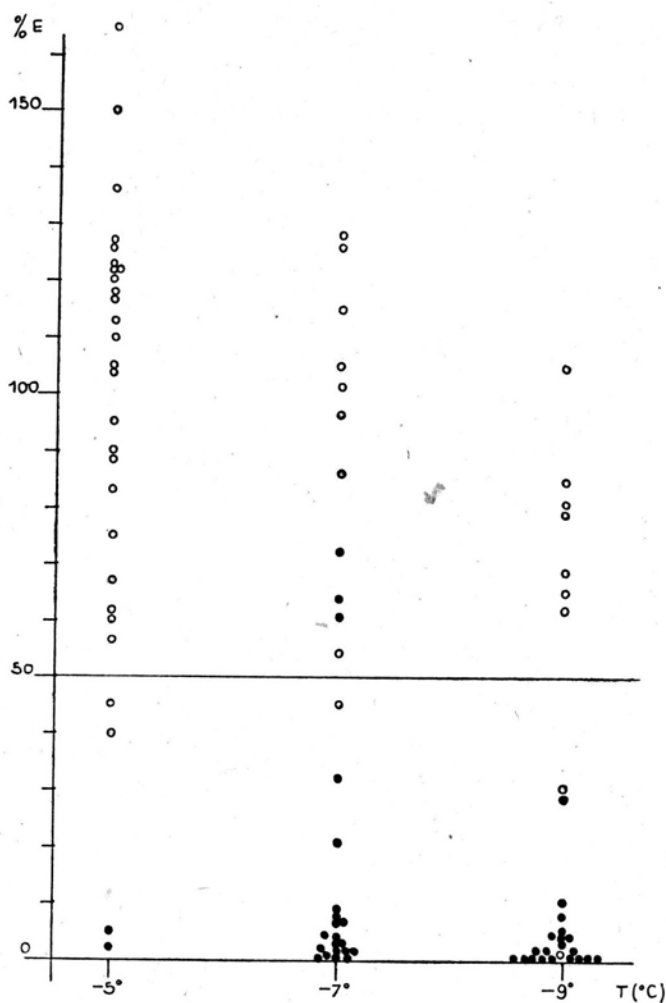


Ryc. 3. Widmo absorbcyjne 1) zredukowanego TTC, 2) 95% ekstraktu etanolowego z krążków liści inkubowanych w roztworze 0,6% TTC w 0,05 M  $NaH_2PO_4 - KH_2PO_4$  buforze przez 15 godz., 3) 95% ekstrakt etanolowy z krążków liści inkubowanych w 0,05 M  $Na_2PO_4 - KH_2PO_4$  buforze przez 15 godz. (wg Steponkusa i Lanpheara, 1967)

rezultaty uzyskuje się przy stosowaniu stężeń TTC w zakresie 1—1,5%. Wyższe stężenia mogą być dla tkanki szkodliwe. Przy niskich stężeniach poziom TTC w tkance może być za niski w stosunku do całej mocy redukcyjnej tkanki. Nietrwałość TTC w roztworze alkalicznym powyżej pH 9 w obecności środków redukujących takich, jak: pył metaliczny, siarczki, białka zawierające grupy sulfhydrylowe, z góry wykluczają pracę z roztworami o pH powyżej 8. Z kolei niższe wartości pH wpływają na przenikanie TTC do komórek (Parker 1953). Marré i Arrigoni

(1954) ustalili, że optymalnym pH, w którym zachodzi maksymalna redukcja TTC jest pH bliskie 7.

Larcher i Eggarter (1960) stosowali TTC głównie do zlokalizowania i jakościowego ustalenia szkód mrozowych w gałązkach drzew. W 1967 ukazała się praca



Ryc. 4. Zależność między faktycznym przeżyciem zamrażania przez liść a procentową redukcją TTC.  
1 — tkanka zabita, 2 — tkanka żywa

Steponkusa i Lanpheara (Steponkus i Lanphear 1967), która dała możliwość precyzyjnego, kolorymetrycznego pomiaru odporności mrozowej w oparciu o redukcję TTC. Badacze ci, pracując z liśćmi i gałązkami *Hedera helix*, inkubowali przemrożoną tkankę o masie  $100 \text{ mg} \pm 10$  w 0,6% roztworze TTC w 0,05 M buforze  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4) + 0,05% czynnika zwilżającego, w tempe-

raturze 30°C w ciemności. Powstały w tkance formazan ekstrahowali 95% etanolem w temperaturze wrzącej wody i oznaczali ekstynkcję roztworu przy 530 nm. Ta długość fali umożliwiała wg tych autorów uniknięcia zakłóceń spowodowanych absorpcją światła przez endogenne barwniki roślinne (ryc. 3). Aby określić stopień uszkodzenia mrozowego tkanki, ilość wytworzonego przez przemrożoną tkankę formazanu wyraża się jako procent w stosunku do ilości formazanu wytworzonego przez tkankę kontrolną, przetrzymaną w temperaturze 5°C. Miarą ilości formazanu jest wartość ekstynkcji. Zmniejszenie ekstynkcji o 50% w stosunku do kontroli wyznacza 50% punkt zabicia tkanki. Metoda Steponkusa i Lanpheara została sprawdzona w naszej pracowni. Podobnie jak i oni otrzymaliśmy dużą zgodność między otrzymanymi danymi a faktycznym przeżyciem tkanki (ryc. 4). Stosowaliśmy 0,4% stężenie TTC i inkubację 22 godzinną. Ze względu na stosunkowo dużą jeszcze absorpcję światła przez chlorofil przy 530 nm zdecydowaliśmy się na oznaczanie tej absorpcji przy każdej próbie i odejmowanie tej wartości od wartości ekstynkcji otrzymanej dla badanych próbek.

Pomiar redukcji TTC może być obarczony dużym błędem, jeśli dojdzie do zakażenia próbki roślinnej bakteriami lub grzybicą. Jeśli jednak test przeprowadza się na zdrowych, świeżo pobranych tkankach, redukcja TTC wywołana przez bakterie w czasie inkubacji w 30°C nie przekracza 2% ogólnej wartości ekstynkcji (Steponkus i Lanpheara 1967). Ogólnie biorąc, technika zaproponowana przez tych badaczy ma duże walory szybkiej, dokładnej i obiektywnej metody pomiaru.

*Instytut Botaniki Uniwersytetu Warszawskiego  
Zespół Badania Wzrostu i Rozwoju Roślin*

#### LITERATURA

- Åkerman, Å., 1927. *Studien über den Kältetod und die Kältresistenz der Pflanzen*. 232 pp. Lund, Sweden Berlingska Boktryckeriet.
- Bula R. J., Smith Dale, 1954. *Cold resistance and chemical composition in overwintering alfalfa, red clover and sweetclover*. *Agron. J.*, 46: 397—401.
- Dexter S. T., Tottingham W. E., Graber L. G., 1932. *Investigation of hardiness of plants by measurement of electrical conductivity*. *Plant Physiol.* 7: 63—78.
- Harvey R. B., 1918. *I. Agric. Res.* 15: 83—112.
- Hodgson H. J., Bula R. J., 1956. *Hardening behaviour of sweet clover Melilotus Spp. varieties in a sub-arctic environment*. *Agron. J.* 48: 157—160.
- Hodgson H. J., 1966. *Effect of photoperiod on development of cold resistance in alfalfa*. *Crop Science*. 4: 302—305.
- Höber R., 1945. *Physical Chemistry of Cells and Tissues*. Philadelphia, Blakiston.
- Höfler K., 1953. *Zur Vital- und Fluoreszenzfärbung*. *Ber. dtsh. Bot. Ges.* 66: 453—462.
- Höfler K., Ziegler A., Luhan M., 1956. *Fluorochromierungsstudien mit Uranin*. *Protoplasma*. 46: 322—325.
- Jerchel D., Möhle W., 1944. *Die Bestimmung des Redoxpotentials von Tetrazoliumverbindungen*. *Ber. dtsh. Bot. Ges.* 77: 591.
- Kacperska-Palacz A., 1970 a. *Application of electric conductivity measurements to the estimation of frost injury in plant tissues*. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 39: 469—475.

- Kacperska-Palacz A., 1970 b. *Mrozoodporność roślin — współczesne poglądy na istotę tego zjawiska*. Przegląd Nauk Roln., nr 1/2: 107—120.
- Kacperska-Palacz A., Błaziak M., Wciślińska B., 1969. *The effect of growth retardants CCC and B-9 on certain factors related to cold acclimation of plants*. Bot. Gaz. 130: 213—221.
- Katz., Reinhold L. 1964. *Changes in the electrical conductivity of Coleus tissue as a response to chilling temperatures*. Israel J. Bot. 13: 105—114.
- Lakon G., 1954. *Neuere Beiträge zur topograpischen Tetrazoliummethode*. Ber. dtsh. Bot. Ges., 67: 146.
- Larcher W., 1969. *Anwendung und Zuverlässigkeit der Tetrazoliummethode zur Feststellung von Schäden in pflanzlichen Geweben*. Mikroskopie, 27: 207—218.
- Larcher W., Eggarter H., 1960. *Anwendung des Triphenyltetrazoliumchlorids zur Beurteilung von Frostschäden in verschiedenen Achsengeweben bei Pirus-Arten, und Jahresgang der Reistenz*. Protoplasma 51; 595—619.
- Levitt J., 1956. *The Hardiness of Plants*. New York. Academic Press.
- Levitt J., 1962. *A sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants*. J. Theoretical Biol. 3. 355—391.
- Levitt J., 1966. *Winter Hardiness in Plants*. Cryobiology, London and New York. Academic Press. rozdz. 11. 495—563.
- Luyet B. J., 1954. 8th Int. Congr. Bot. 11. 259—267 (cyt. wg Levitta J. Winter Hardiness in Plants. Cryobiology. London and New York. Academic Press.).
- Marré E., Arrigoni O., 1954. *Determinazione „in vivo“ dell' attività deidrogenasica mediante la tecnica al tetrazolio*. N. Giorn. Bot. Ital. 61. 21—28.
- Olien C. R., 1961. *A method of studying stresses occurring in plant tissue during freezing*. Crop Science. 1. 26—28.
- Olien, C. R., 1964. *Freezing processes in the crown of Hudson barley, Hordeum vulgare (L., emend. Lam.) Hudson*. Crop Science. 4. 91—95.
- Osterhout W. J. V., 1918. *A method of measuring the electrical conductivity of living tissues*. Journ. Biol. Chem. 36. 557—568.
- Parker J., 1953. *Some applications and limitations of tetrazolium chloride*. Science. 118. 77—79.
- Parker J., 1955. *Tetrazolium salts as viability indicators: Radiationcatalysed Reactions*. Nature. 176. 674.
- Pisek A., 1958. *Versuche zur Frostresistenzprüfung von Rinde, Winterknospen und Blüten einiger Arten von Obsthölzern*. Die Gartenbauwiss. 23. 54.
- Sakai A., 1955. *A method of testing the survival of twig*. Low Temp. Sci (Hokkaido Univ.) B 13. 43.
- Scarth G. W. Levitt J., 1937. *The frost-hardening mechanism of plant cells*. Plant Physiol. 12. 51—78.
- Siminovitch D., Levitt J., 1941. *The relation between frost resistance and the physical state of protoplasm*. Can. Journ. Res. C. 19. 9—20.
- Siminovitch D., Briggs D. R., 1953. *Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness. III. The validity of plasmolysis and dessication tests for determining the frost hardiness of bark tissue*. Plant Physiol. 28: 15—34.
- Schmutz W., 1962. *Acker-u. PflBau*. 115: 1—11, (cyt. wg Levitta 1966).
- Steponkus P. L., Lanpheera F. O., 1967. *Refinement of triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury*. Plant Physiol., 42: 1423—1426.
- Teske A. A., 1965. *Investigation on plant tissue impedance. Results of experiments with Daucus carota L.* Acta Soc. Bot. Pol., 34: 249—259.
- Torszell B., Hallstrom N., 1955. *Acta agric. Scand.*, 5: 31—38 (cyt. wg Levita, 1966).
- Tumanow I I., 1967. *O fizjologiczeskom mechanizme morozostoikosti rastenii*. Fizjologija Rastenii, 14: 521—536.
- Wilner J., 1961. *Relationship between certain methods and procedures of testing for winter injury of outdoor exposed shoots and roots of apple trees*. Can. J. Plant Sci., 41: 309—315.