

PAWEŁ PUKACKI

## Laboratoryjne metody oceny odporności roślin drzewiastych na niskie temperatury<sup>1</sup>

### WSTĘP

W badaniach nad introdukcją drzew i krzewów ozdobnych konieczne jest szybkie poznanie ich odporności na niskie temperatury. Prowadzone nad tym zagadnieniem prace zmierzają do znalezienia najlepszego sposobu oceny odporności roślin pomijając oczekiwanie na skutki selekcji, jakie stwarzają surowe zimy występujące u nas prawie co 11 lat. W badaniach odporności roślin na mrozy poddaje się pędy i pączki działaniu niskich temperatur w kontrolowanych warunkach. Zmiany, jakie zachodzą we właściwościach tkanek i komórek na skutek działania niskich temperatur można, stosując odpowiednią metodę laboratoryjną, z pewnym prawdopodobieństwem oznaczyć i określić stopień ich uszkodzenia.

Jedną z metod stosowaną w tym celu jest pomiar zdolności przemrożonej tkanki do redukcji TTC (chlorku 2,3,5 trójfenylo-tetrazoliowego). Opiera się ona na barwieniu żywej cytoplazmy komórek. Metodę tę używał do oznaczania zdolności kiełkowania nasion Lakon (1954), natomiast w badaniach nad mrozoodpornością zastosował ją Larchen i Eggarter (1960), Purcell (1963), Holubowicz i Boe (1970), Białobok, Bogacz i Pukacki (1971). Chlorek 2,3,5 trójfenylo-tetrazoliowy ulega w żywej komórce pod wpływem dehydrogenaz redukcji do formazanu, związku nierozpuszczalnego w wodzie, a dobrze rozpuszczalnego w rozpuszczalnikach organicznych. Martwe części tkanek wyraźnie różnią się od żywych brakiem karminowoczerwonego zabarwienia, jakie daje formazan. Wykonując pomiar ekstynkcji wyekstrahowanego etanolem formazanu, można określić stopień redukcji TTC. Metoda ta pozwala wyznaczyć temperaturę krytyczną (Steponkus i Lanphear, 1967), tj. temperaturę, która powoduje zabicie 50% tkanki roślinnej. Z metod biofizycznych nabiera ostatnio większego znaczenia metoda pomiaru dyfuzji elektrolitu z pędów zanurzonych w wodzie oraz metoda pomiaru impedancji względnie przewodnictwa elektrycznego tkanki pędów.

Dyfuzja elektrolitu z uszkodzonych tkanek jest znacznie większa

<sup>1</sup> Badania te były częściowo finansowane w ramach umowy FG-PO-238 z Departamentem Rolnictwa USA, US Public Law 480.

w porównaniu z nie uszkodzonymi tkankami. Można to łatwo stwierdzić doświadczalnie umieszczając przemrożone w różnych temperaturach odcinki pędów w wodzie destylowanej, a następnie przez zmierzenie przewodnictwa elektrycznego tych roztworów. Ilość wyzwolonego elektrolitu wzrasta wraz ze wzrostem uszkodzenia tkanek przez niskie temperatury. Praktyczne wykorzystanie tego zjawiska w badaniach nad mrozoodpornością roślin podał Dexter i inni (1932) i Swingle (1932). W późniejszych latach z zastosowaniem tej metody spotykamy się w wielu pracach, (Emmert i Howlat, 1953; Wilner, 1959; Lapins, 1961; Carpenter i inni, 1963). W Polsce w swoich badaniach metodę tę używali Pieniążek i Wiśniewska (1961), Jackiewicz (1968), Tomaszewski i Koczowska (1969).

Pomiar impedancji względnie przewodnictwa elektrycznego tkanek roślinnych wykonuje się przez wprowadzenie do nich dwóch elektrod i utworzenie obwodu elektrycznego. Opór jaki stwarza obwód elektryczny, do którego włączony jest odcinek pędu, określa się oporem omowym i zależnym od częstości prądu oporem pojemnościowym. Sumaryczną wartość oporu omowego i pojemnościowego nazywamy impedancją elektryczną (Svejda 1966, Beier 1968). W elektrotechnice za impedancję uważa się sumaryczną wartość wyżej wspomnianych oporów i dodaną do tego wartość oporu indukcyjnego. Ponieważ w obwodach biologicznych indukcyjności nie stwierdzono (Beier 1968), dlatego w tym przypadku jest ona pomijana. Do pomiarów impedancji elektrycznej stosuje się przeważnie mostki Wheatstone'a, pracujące na prąd zmienny.

Większość badaczy uważa, że pomiary powinny być wykonywane przy użyciu prądu o bardzo niskim napięciu, np. Hayden i inni (1969) stosowali napięcie 0,1, V. Olien (1961) jako najwyższe dopuszczalne napięcie podaje 3 volty, natomiast Kacperska-Palacz (1970) ustaliła 6 voltów napięcia za górną granicę. Oprócz określonego napięcia w tych badaniach wymaga się również odpowiedniej częstości prądu. W większości badań używana częstość prądu wynosiła 1000 Hz. Teske (1965), Glerum i Krencigłowa (1970) wykazali, że przy częstościach niskich w granicach 100 Hz różnice w impedancji między tkanką żywą a martwą były znacznie większe aniżeli przy jej pomiarach prądem o częstości 1000 Hz. Dla stwierdzenia zmian w błonach komórkowych Hayden i inni (1969) zalecają stosować częstość prądu 60 - 100 Hz.

Z dotychczasowych wyników badań wiadomo już, że w komórkach największą wartość impedancji mają błony cytoplazmatyczne. Uszkodzenie tkanki roślinnej przez niskie temperatury między innymi objawia się rozluźnieniem błon komórkowych, zwiększa się ich przepuszczalność dla jonów, a zmierzona impedancja jest znacznie niższa od tej jaka charakteryzuje tkankę nieuszkodzoną, (Wilner, 1960, 1961; Glerum, 1962. 1970; Machia i Campbell, 1963; Evert i Weiser, 1970; Białobok, Pukacki i Wnuk, 1972).

#### MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń użyto jednorocznych pędów zebranych z drzew i krzewów w rodzaju *Hydrangea*, *Magnolia* i *Malus* zarówno odmian wytrzymałych, jak i wrażliwych na mróz. Pędy zbierano w czasie spoczynku zimowego.

Sztuczne przemrażanie przeprowadzano w zamrażarkach w warunkach kontrolowanego ochładzania 3°C na godzinę. Zapakowane w polietylenowe woreczki pędy włożono do steropianowych pudełek, a następnie umieszczono w zamrażarce. Po obniżeniu się temperatury w pudełkach do pierwszej z wyznaczonych temperatur przemrażania, np. -25°C, przenoszono jedno pudełko do drugiej zamrażarki o tej samej temperaturze i trzymano w niej przez 24 godziny. Czynności te powtarzano przy każdej następnej temperaturze mrożenia. Rozmrażanie pędów odbywało się stopniowo w tych samych zamrażarkach, które po zakończonym mrożeniu wyłączono.

Ocenę uszkodzeń jednorocznych pędów przeprowadzano przy użyciu następujących metod:

- 1) pomiaru zdolności tkanki do redukcji TTC,
- 2) pomiaru dyfuzji elektrolitu,
- 3) pomiaru impedancji względnie przewodnictwa elektrycznego.

Przy użyciu testu TTC wzorowano się na opisie podanym przez Stoponkusa i Lanpheara (1967). Badane odcinki pędów krojono na plastry o grubości do 1 mm omijając miejsca z pąkami. Następnie odważano 100 mg ± 2 tych plasterków i przenoszono do wykalibrowanych na 10 ml probówek 160×15 mm. Tak przygotowaną tkankę roślinną zalewano 3 ml 0,6-procentowym roztworem TTC w 0,05M buforze Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4) + 0,05% Tween 80 i po 15-minutowej infiltracji pod pompą próżniową inkubowano ją w termostacie przy temperaturze 30°C przez 15 godzin, po czym roztwór zlewano a skrawki przepłukiwano wodą destylowaną. Powstały w tkankach formazan ekstrahowano siedmioma mililitrami 96-procentowego etanolu na gorącej łaźni wodnej, a następnie po uzupełnieniu probówek etanolem do 10 ml oznaczano ekstynkcję przy 530 nm.

Stopień uszkodzenia tkanek przez niską temperaturę był wyrażony stosunkiem ilości wytworzonego formazanu w przemrożonej tkance do ilości powstałego formazanu w tkance kontrolowanej (nie mrożonej), według wzoru:

$$\% \text{ redukcji TTC} = \frac{E \text{ dla tkanki mrożonej w danej temperaturze}}{E \text{ tkanki kontrolnej}} \times 100$$

Obniżenie się ekstynkcji o 50% w stosunku do kontroli uznawano za stan krytyczny związany z nieodwracalnymi uszkodzeniami w tkance.

Analiza pomiaru dyfuzji elektrolitu miała następujący przebieg. Przemrożone jednoroczne pędy krojono na odcinki 1,5 cm, następnie ważono je z dokładnością ± 5 mg, a po umieszczeniu w probówkach zalano wodą destylowaną w ilości 1 ml wody na 10 mg wagi odcinka pędu. Po 15-minutowej infiltracji pędów pod pompą próżniową pozostawiano je na 24 godziny w temperaturze pokojowej w celu umożliwienia swobodnej dyfuzji elektrolitu z tkanek. Następnie mierzono przewodnictwo elektryczne tego roztworu za pomocą konduktometru. Dla określenia pozostałej ilości elektrolitu w próbkach, przepłukano je 3-4 razy wodą destylowaną i ponownie zalano pierwotną ilością wody destylowanej, a następnie wstawiono na 30 minut na gotującą łaźnię wodną. Po dyfuzji elektrolitu trwającej 15 godzin dokonano powtórnego pomiaru przewodnictwa elektrycznego roztworu.

Uszkodzenie pędów w tych badaniach określa procent wyzwolonego elektrolitu z przemrożonych tkanek. Obliczano go w następujący sposób:

$$\frac{a}{a+b} \times 100 = \text{procent wyzwolonego elektrolitu,}$$

gdzie:

a — przewodnictwo elektryczne roztworu z przemrożonych tkanek,

b — przewodnictwo elektryczne roztworu z zabitych przez zagotowanie tkanek.

Pomiary przewodnictwa elektrycznego pędów wykonywano przy użyciu węgierskiego konduktometru typu OK-102/1. Pomiarowe napięcie prądu wynosiło

0,2V przy częstotliwości 80 Hz. Do pomiarów przewodnictwa używano specjalnych szczyptec zaopatrzonych w dwie stalowe poniklowane elektrody o średnicy 0,5 mm, długości 3,2 mm. Elektrody osadzone były w płytce z pleksiglasu w odstępach 6,8 mm. Ze skali przyrządu wartość przewodnictwa odczytywano w jednostkach Simensa (czyli  $\text{ohm}^{-1}$ ).

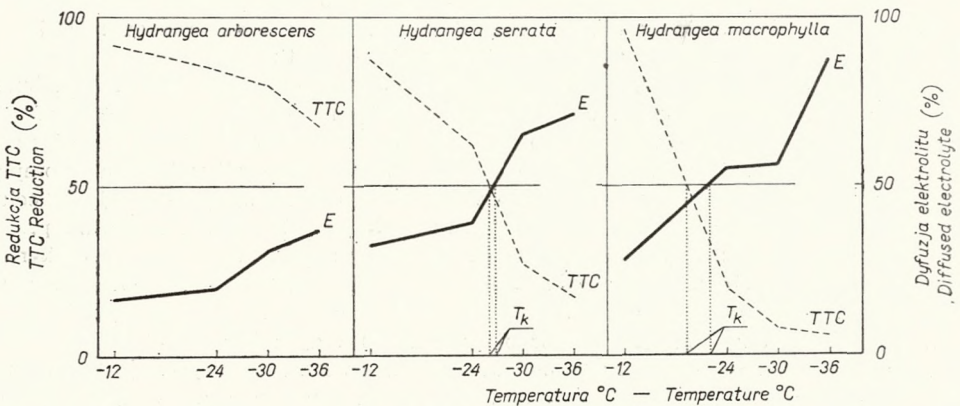
Przewodnictwo elektryczne pędów mierzono w trzech miejscach, w części wierzchołkowej, środkowej i dolnej. Pomiaru te wykonywano przed i po sztucznym mrożeniu doprowadzając temperaturę tkanek przed każdym pomiarem do temperatury pokojowej 19 - 21°C. Podane w tabelach i na rysunku liczby są średnimi wartościami z pomiaru 10 pędów.

Dla skontrolowania pomiarów stopnia uszkodzenia tkanek przez niskie temperatury wyżej opisanymi metodami, przemrożone pędy wstawiano w doniczki z wilgotnym sterylnym piaskiem do komory w fitotronie o temperaturze 25°C, a następnie obserwowano zmiany w zabarwieniu tkanek (tab. 1, rys. 3). Zmiana barwy tkanek pędów na kolor brązowy oznaczała ich zabicie. Czas tych obserwacji wyniósł do 20 - 30 dni.

## WYNIKI

### POMIAR ZDOLNOŚCI TKANKI DO REDUKCJI TTC

Wpływ przemrażania jednorocznych pędów hortensji na redukcję TTC przedstawiono na rysunku 1. Dane dla *Hydrangea arborescens* ukazują zachowanie się krzewu odpornego, natomiast wyniki dla *H. serrata* i *H. macrophylla* odnoszą się do gatunków wrażliwych na niskie temperatury. Inny jest wpływ niskich temperatur na stopień redukcji TTC u odmian odpornych, a inny u odmian wrażliwych. Redukcja TTC u hor-



Ryc. 1. Średnie procenty redukcji TTC i dyfuzji elektrolitu jednorocznych pędów hortensji przemrożonych w czterech temperaturach w celu wyznaczenia temperatury krytycznej (średnie z 5 pędów)

TTC — redukcja TTC, E — dyfuzja elektrolitu,  $T_k$  — temperatura krytyczna  
 Fig. 1. Mean percentage TTC reduction and electrolyte diffusion for one year old shoots of *Hydrangea* frozen at four temperatures in order to determine the critical temperature (means from 5 shoots)

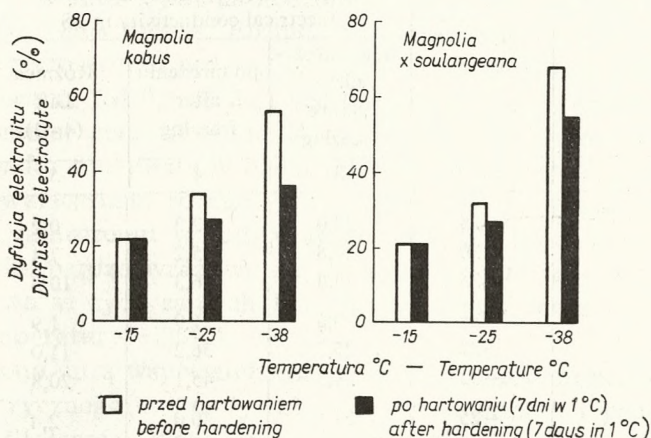
TTC reduction, E — diffused electrolyte,  $T_k$  — critical temperature

tensji odpornej na niskie temperatury utrzymuje się prawie na jednym poziomie w trzech pierwszych temperaturach ( $-12$ ,  $-24$  i  $-30^{\circ}\text{C}$ ), a wyraźne obniżenie następuje dopiero przy temperaturze  $-36^{\circ}\text{C}$  (68% redukcji). U krzewów hortensji wrażliwych na mrozy wyraźne obniżenie się redukcji TTC obserwujemy już od temperatury  $-12^{\circ}\text{C}$ . Najniższą wartość redukcji TTC przy temperaturze  $-36^{\circ}\text{C}$  z tych dwóch okazów posiada *Hydrangea macrophylla* 6% redukcji. Na rysunku 1 przedstawiono również sposób wyznaczania temperatury krytycznej ( $T_k$ ). Temperatura krytyczna wyznaczona testem TTC dla *Hydrangea serrata* wynosi  $-26,0^{\circ}\text{C}$ , a dla najwrażliwszej *H. macrophylla* —  $19,2^{\circ}\text{C}$ .

#### POMIAR DYFUZJI ELEKTROLITU

Zmiany w ilości wyzwolonego elektrolitu z uszkodzonych pędów pod wpływem niskich temperatur dla trzech gatunków hortensji wykazują wyraźne różnice w dyfuzji w zależności od ich odporności na mrozy. Najwyższe wskaźniki dyfuzji otrzymano dla *Hydrangea macrophylla*, a najniższe u *H. arborescens* (ryc. 1). Temperatura krytyczna wyznaczona tą metodą wykazała stosunkowo dużą zgodność z testem TTC, chociaż wartości jej są nieco niższe i wynoszą dla *Hydrangea macrophylla*  $-22,0^{\circ}\text{C}$ , a dla *H. serrata*  $-26,4^{\circ}\text{C}$ .

Wpływ hartowania pędów na zmianę ilości wyzwolonego elektrolitu w trzech temperaturach mrożenia przedstawiono na rycinie 2. Stwierdzono, że pod wpływem przebywania pędów magnolii przez siedem dni w temperaturze  $1^{\circ}\text{C}$  następuje zmniejszenie się dyfuzji elektrolitu



Ryc. 2. Wpływ hartowania jednorocznych pędów magnolii na ilość wyzwolonego elektrolitu w trzech temperaturach mrożenia. Średnie z 10 powtórzeń

Fig. 2. The effect of hardening one year old shoots of magnolias on the amount of electrolyte released in three freezing temperatures. Means from 10 replicates

z przemrożonych pędów w porównaniu z wartościami jakie otrzymano przed hartowaniem. Wpływ hartowania pędów wyraźniej zaznaczył się u odpornej *Magnolia kobus*. W przypadku tej magnolii dyfuzja elektrolitu z pędów przemrożonych w temperaturze  $-36^{\circ}\text{C}$  obniżyła się z 56 do 36%. Zjawisko to wystąpiło nieco słabiej u wrażliwej *Magnolia x soulangeana*. Wpływu hartowania nie zanotowano przy temperaturze  $-15^{\circ}\text{C}$ .

Doświadczenia porównawcze (tab. 2) wykazały dużą współzależność tej metody z pomiarami zdolności tkanek do redukcji TTC (ekstynkcją), zarówno w przypadku dyfuzji wyrażonej w  $\mu\text{S}$  ( $r = -0,828$ ), jak i między procentem dyfuzji, gdzie współczynnik korelacji  $r = -0,852$ .

POMIAR IMPEDANCJI WZGLĘDNE PRZEWODNICTWA ELEKTRYCZNEGO

Zastosowanie metody pomiaru impedancji lub przewodnictwa elektrycznego pędów przy ocenie wytrzymałości na mróz przedstawiono w tabeli 1 i 2 oraz na rysunku 3. Z tabeli 1 wynika, że wartości pomiarów przewodnictwa elektrycznego w nie mrożonych pędach różnych magnolii są w małym stopniu zróżnicowane i mieszczą się w granicach od 21,0 do 30,2  $\mu\text{S}$ . Po przemrożeniu pędów w danych temperaturach

Tabela 1

Ocena odporności jednorocznych pędów magnolii na niskie temperatury przy użyciu pomiaru przewodnictwa elektrycznego

Estimate of resistance to low temperature in one year old shoots of magnolias using the method of electrical conductivity

Odmiana Variety	Temperatura Temperature $^{\circ}\text{C}$	Przewodnictwo elektryczne w $\mu\text{S}$ Electrical conductivity in $\mu\text{S}$			Ocena przeżywalności* Estimated survival
		przed mrożeniem before freezing	po mrożeniu after freezing	Różnica Diff (4 - 3)	
1	2	3	4	5	6
<i>M. acuminata</i>	-25	22,0	22,2	0,2	+
	-30	27,8	35,2	7,4	+
	-35	25,8	36,3	10,5	+
<i>M. tripetala</i>	-25	20,0	21,9	1,9	+
	-30	25,2	36,2	11,0	+
	-35	24,3	45,1	20,8	-
<i>M. x soulangeana</i>	-25	27,6	30,0	2,4	+
	-30	30,0	49,3	19,3	-
	-35	30,2	64,3	34,1	-

\* Przemrożone pędy obserwowano przez 20-30 dni w fitotronie.

\* Frozen shoots observed for 20-30 days in a phytotron.

+ pędy żywe - live shoots; pędy martwe - dead shoots.

Tabela 2

Pomiary impedancji elektrycznej, dyfuzji elektrolitu oraz redukcji TTC w pędach jabłoni w zależności od ich położenia w koronie i temperatury traktowania

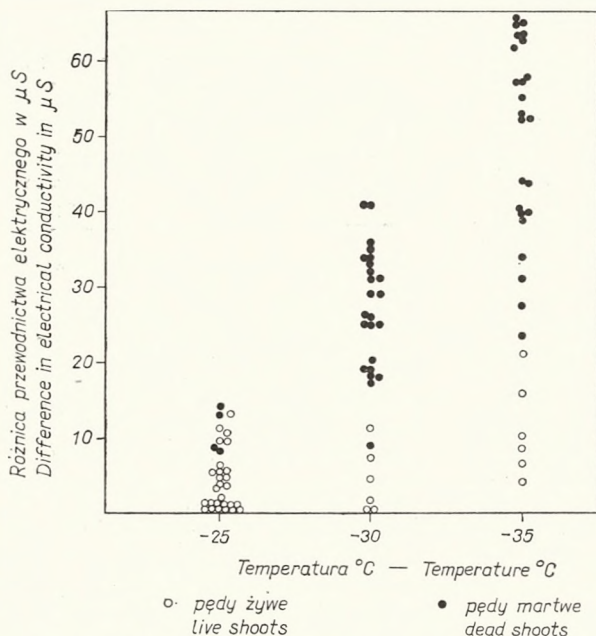
Measurements of electrical impedance, electrolyte diffusion and TTC reduction in shoots of apple trees depending on the position in the crown and on the treatment temperature

Numer drzewa i położenie pędów w koronie No. of tree and position in crown	Temperatura Temperature °C	Impedancja Impedance ohm × 1000	Dyfuzja elektrolitu Diffused electrolyte		Redukcja TTC Reduction A <sub>530</sub>	
			w μS in μS	procent percent of total		
Drzewo nr 1 Tree No 1	N	5	27,3	66,8	28	0,634
		-15	22,2	80,6	32	0,766
		-30	12,6	178,0	64	0,432
Drzewo nr 2 Tree No 2	S	5	29,4	59,5	24	0,786
		-15	20,4	83,6	27	0,772
		-30	13,3	168,5	60	0,482
Drzewo nr 2 Tree No 2	N	5	28,5	71,6	27	0,526
		-15	24,3	89,0	31	0,750
		-30	14,3	198,0	65	0,500
Drzewo nr 2 Tree No 2	S	5	32,2	62,9	26	0,768
		-15	29,4	57,7	28	0,726
		-30	16,6	178,0	63	0,420

następuje wyraźny wzrost przewodnictwa u badanych magnolii. Przewodnictwo pędów rośnie wraz z obniżaniem się temperatury mrożenia, wobec czego im silniej jest uszkodzona tkanka roślinna tym ma większe przewodnictwo elektryczne. Różnice przewodnictwa uzyskane z pomiarów przed i po mrożeniu pędów, jak widać z tabeli 1, dają znacznie większe zróżnicowanie (od 0,2 do 34,1 μS) aniżeli wartość pomiarów przewodnictwa po przemrożeniu (21,9 do 64,3 μS). Przewodnictwo przemrożonych pędów *Magnolia acuminata* w badanych temperaturach charakteryzowało się małymi wartościami różnic. Pędy tej magnolii nie zostały uszkodzone nawet po przemrożeniu w temperaturze -35°C. Natomiast dwie pozostałe magnolie bardzo wrażliwe na mrozy mają znacznie wyższe różnice przewodnictwa w tych samych temperaturach mrożenia i pędy ich nie przeżyły temperatury -35°C.

Stwierdzono dużą współzależność między wartościami różnic przewodnictwa elektrycznego, a przeżywalnością przemrożonych pędów umieszczonych w fitotronie. Wraz ze wzrostem różnicy przewodnictwa elektrycznego tych pędów zmniejsza się ich przeżywalność (tab. 1 i rys. 3). Największe zróżnicowanie badanych pędów pod względem wartości różnic przewodnictwa elektrycznego występuje przy temperaturze -35°C. W tabeli 2 zamieszczono wyniki badań wskazujących na współzależność

między pomiarami impedancji, dyfuzji elektrolitu i redukcji TTC dla pędów zebranych z dwóch okazów *Malus coronaria* i potraktowanych trzema temperaturami. Przeprowadzona analiza statystyczna wyników tego doświadczenia wykazała silną korelację między wartościami impe-



Ryc. 3. Zależność między różnicą w przewodnictwie elektrycznym pędów magnolii a ich przeżyciem po przemrożeniu. Każdy punkt odpowiada jednemu osobnikowi Fig. 3. Relation between the difference in electrical conductivity of magnolia shoots and their survival after freezing. Each point represents one specimen

dancji, a procentem dyfuzji ( $r = -0,901$ ). Im większa jest impedancja w danej temperaturze, tym mniejszy jest procent wyzwolonego elektrolitu. Również w wysokim stopniu korelują pomiary impedancji z wartościami ekstynkcji dla testu TTC ( $r = 0,705$ ). Nie ma natomiast korelacji między impedancją pędów, a dyfuzją wyrażoną w  $\mu\text{S}$  ( $r = -0,372$ ).

#### DYSKUSJA I WNIOSKI

Wyniki wyżej podanych doświadczeń pozwalają określić przydatność przedstawionych metod oceny mrozoodporności. Pomiary zdolności tkanki do redukcji TTC i dyfuzji elektrolitu przyjęte jako wskaźniki wytrzymałości hortensji na niskie temperatury, wyraźnie zróżnicowały badane krzewy (rys. 1). Podany sposób wyznaczania temperatury krytycznej ( $T_k$ ) wydaje się być przydatny, ponieważ ustala się w ten sposób temperatury, przy których następuje nieodwracalne uszkodzenie tkanek pę-



dów, co przy ocenie odporności jest bardzo ważne. Na uwagę zasługuje duża zgodność testu TTC z pomiarami dyfuzji elektrolitu (rys. 1 i tab. 2). Wysokie procenty dyfuzji elektrolitu oraz niskie wartości redukcji TTC świadczą o istotnym uszkodzeniu komórek. Wobec tego można wysunąć przypuszczenie, że dla uzyskania pełnego obrazu powstałych w komórkach uszkodzeń, wskazane by było stosowanie tych dwu metod równocześnie. Stwierdzenie przy pomocy metody dyfuzji efektu hartowania pędów w okresie wczesnej jesieni jest kolejnym przykładem przydatności tej metody. Wynik hartowania nie uwidocznił się przy temperaturze  $-15^{\circ}\text{C}$  zarówno magnolii wrażliwej, jak i odpornej. Można to przypisać temu, że w tej temperaturze nie powstały wyraźne uszkodzenia tkanek. Różnice, jakie otrzymano między badanymi gatunkami przy użyciu testu TTC i pomiarów dyfuzji elektrolitu są całkowicie zgodne z wieloletnimi obserwacjami uszkodzeń tych okazów w czasie surowych zim.

Pomiary impedancji lub przewodnictwa elektrycznego pędów dały również wiarygodne wyniki. Na podstawie tych pomiarów ustalono kolejność odporności magnolii na niskie temperatury (tab. 1). Zjawisko to zostało potwierdzone obserwacjami przeżywalności mrożonych pędów. Przeprowadzone tą metodą badania pozwoliły stwierdzić, że różnica przewodnictwa znacznie lepiej charakteryzuje odporność drzew i krzewów na niskie temperatury aniżeli bezwzględne pomiary przewodnictwa pędów przed i po mrożeniu. Wydaje się, że obliczając różnicę zmniejsza się ewentualny wpływ na impedancję lub przewodnictwo różnych czynników mniej istotnych dla samej odporności, ale wpływających na wartość impedancji. Po przemrożeniu pędów wpływ tych czynników nie zmienia się, a obliczona różnica odzwierciedla rzeczywiste zmiany, jakie zaszły w tkankach pod wpływem działania niskiej temperatury. Potwierdzają to wyniki otrzymane przez Białoboką i innych (1972). Wysoka zależność przeżywalności mrożonych pędów z różnicami przewodnictwa elektrycznego wykazana na przykładzie 30 egzemplarzy magnolii (ryc. 3) jest potwierdzeniem wysuniętego wyżej wniosku.

Z wzajemnego porównania badanych metod (tab. 2) wynika, że są one zgodne w ocenie uszkodzenia pędów spowodowanego działaniem niskich temperatur. Pełną zgodność otrzymano między pomiarami impedancji a dyfuzją wyrażoną w procentach. Jest to zrozumiałe, ponieważ uszkodzone na skutek działania niskich temperatur błony komórkowe ułatwiają przenikanie wolnych jonów z komórek do przestrzeni międzykomórkowych powodując wzrost dyfuzji lub zwiększone przewodnictwo jonowe, czyli zmniejsza się impedancja. Wartość współczynnika korelacji dla tych metod jest znacznie wyższa od współczynnika, jaki otrzymał Wilner (1961). Natomiast brak korelacji między impedancją a dyfuzją wyrażoną w  $\mu\text{S}$  potwierdza wniosek, jaki wysunął Lapiński (1961), aby odczyty dyfuzji odnosić do ogólnej ilości zawartych elektrolitów w tkance i wyrażać je w procentach.

Wydaje się, że z podanych metod najbardziej przydatną do celów selekcyjnych będzie metoda pomiaru impedancji względnie przewodnictwa elektrycznego. O tym zdecydowało oprócz wyżej wspomnianych faktów również to, że jest ona bardzo prosta w użyciu, a wyniki otrzymuje się znacznie szybciej niż przy pozostałych dwóch metodach. Metoda dyfuzji oraz test TTC można szczególnie polecać do badań, kiedy dysponujemy małą ilością tkanki roślinnej, jak również przy określaniu temperatury krytycznej.

Zakład Dendrologii i Arboretum Kórnickie  
Kórnik k. Poznania

#### LITERATURA

1. Białobok S., Bogacz B., Pukacki P. — 1971. Laboratory studies on the resistance of woody plants to low temperatures. Second annual report. 1 : 58 - 77 Kórnik.
2. Białobok S., Pukacki P., Wnuk B. — 1972. Investigation on the frost resistance of trees and shrubs in the laboratory. Third annual report. 1 : 17 - 98 Kórnik.
3. Beir W. — 1968. Biofizyka. PWN, Warszawa.
4. Carpenter J. W. G., Mc Guire J. J., Shutak V. G. — 1963. Comparison of autoclaving and boiling as methods for obtaining release of electrolytes from *Ilex crenata* 'Convexa' Mak. shoots and roots. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 83 : 782 - 785.
5. Dexter S. T., Tottingham W. E., Graber L. F. — 1932. Investigations of hardiness of plants by measurement of electrical conductivity. Plant Physiol. 7 : 63 - 79.
6. Emmert F. H., Freeman S., Howlett N. — 1953. Electrolytic determinations of the resistance of fifty - five apple varieties to low temperatures. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 62 : 311 - 318.
7. Fensom D. S. — 1966. On measuring electrical resistance in situ in higher plants. Can. J. Plant Sci. 46 : 169 - 175.
8. Glerum C. — 1969. Temperature injury to conifers measured by electrical resistance. Forest Sci. 8 : 303 - 308.
9. Hayden R. I., Moyse C. A., Calder F. W., Crawford D. P. and Fensom D. S. — 1969. Electrical impedance studies on potato and alfalfa tissue. J. Exp. Bot. 20 : 177 - 200.
10. Holubowicz T., Boe A. A. — 1970. Correlation between hardiness and free amino acid content of apple seedlings treated with gibberellic acid and abscisic acid. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 95 : 85 - 88.
11. Jackiewicz A. — 1968. Badanie odporności pąków kwiatowych drzew pestkowych na mróz. Prace Inst. Sad. 12 : 67 - 87.
12. Kacperska - Palacz A. — 1970. Application of electric conductivity a measurements to the estimation of frost injury in plant tissues. Acta Soc. Bot. Pol. 39 : 469 - 475.
13. Lapins K. — 1961. Artificial freezing of 1 — year — old shoots of apple varieties. Can. J. Plant. Sci. 41 : 381 - 393.
14. Lakon G. — 1954. Neuere Beiträge zur topograpischen Tetrazolimmethode. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 67 : 146.

15. Larchen W., Eggarter H. — 1960. Anwendung des Triphenyltetrazolium chlorids zur Beurteilung von Frostschäden in verschieden Achsengeweben bei *Pirus* Arten, und Jahresgang der Reistenz. *Protoplasma*. 51 : 593 - 619.
16. Machia B., Campbell R. W. — 1963. Methods to determine low temperature injury to peach trees. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 82 : 120 - 124.
17. Pieniążek J., Wiśniewska J. — 1961. Przydatność metod laboratoryjnych do określania wytrzymałości na mróz i głębokości spoczynku zimowego drzew owocowych. *Prace Inst. Sad.* 4 : 103 - 122.
18. Purcell A. E., Young R. H. — 1963. The use of tetrazolium in assessing freeze damage in citrus trees. *Amer. Hort. Sci.* 83 : 352 - 358.
19. Steponkus P. L., Lanphear F. O. — 1967. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol.* 42 : 1423 - 1426.
20. Swingle C. F. — 1932. The exosmosis method of determining injury, on applied to apple rootstock hardiness studies. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 29 : 380 - 383.
21. Svejda F. — 1970. Further observations on the relationship between winter-hardiness in roses and the electric impedance of uninjured tissues. *Can. J. Plant Sci.* 50 : 493 - 497.
22. Teske A. A. — 1965. Investigation on plant tissue impedance. Results of experiments with *Daucus carota* L. *Acta. Soc. Bot. Pol.* 34 : 249 - 259.
23. Tomaszewski Z., Koczowska I. — 1969. Wstępne badania nad mrozoodpornością żyta, jęczmienia i rzepaku przy zastosowaniu metody konduktometrycznej. *Zesz. nauk. WSR Olsztyn.* 25 : 985 - 999.
24. Wilner J. — 1959. Note on an electrolytic procedure for differentiating between frost injury of roots in woody plants. *Can. J. Plant. Sci.* 39 : 512 - 513.
25. Wilner J. — 1960. Note on two electrolytic methods for determining frost hardiness fruit trees. *Can. J. Plant. Sci.* 40 : 563 - 565.
26. Wilner J. — 1961. Relationship between cartian methods and procedures of outdoor exposed shoots and roots of apple trees. *Can. J. Plant.* 41 : 309 - 315.
27. Wilner J. — 1964. Seasonal changes in electrical resistance of apple shoots as a criterion of their maturity. *Can. J. Plant. Sci.* 44 : 329 - 331.

PAWEŁ PUKACKI

### *Laboratory methods of evaluating the resistance of woody plants to low temperatures*

#### Summary

The resistance of ornamental trees and shrubs to low temperatures has been determined with the help of the following methods: the measurement of electrical impedance or conductivity, the measurement of electrolyte diffusion and the measurement of the ability of the tissues to reduce TTC (TTC test). As material for the study use was made of one year old shoots of trees and shrubs from the genus *Hydrangea*, *Magnolia*, and *Malus* collected in a state of winter rest. It was found that each of these methods permits a relatively accurate determination of the resistance to low temperatures. However the most useful one in conducting a quick screening of varieties with respect to frost resistance is the method based on the measurement of electrical conductivity or impedance. In the studies conducted with this method one should use the difference in impedance (or conductivity) obtained

from the measurements before freezing and after freezing of the shoots. These differences indicate the actual resistance better than the measurements by themselves and also they differentiate the studied varieties more clearly. A considerable agreement was obtained between the estimates of frost damage to shoots using the method of measuring impedance and the diffusion method. The method of measuring the diffusion of electrolytes and the TTC test may prove useful in determining the critical temperature, i.e. the one that causes a 50% damage to tissues.

ПАВЕЛ ПУКАЦКИЙ

*Лабораторные методы оценки устойчивости древесных растений  
к низким температурам*

Резюме

Устойчивость декоративных деревьев и кустарников к низким температурам определялась следующими тремя методами: 1) измерением электрического сопротивления (соответственно электропроводности), 2) измерением диффузии электролитов, 3) измерением способности тканей к редукции TTC (тест TTC). Материалом в опытах служили однолетние побеги деревьев и кустарников из родов *Hydrangea*, *Magnolia*, *Malus*, собранные в состоянии зимнего покоя. Установлено, что каждый из этих методов позволяет относительно точно определить морозостойкость растений. Однако наиболее пригодным для проведения быстрого отбора морозостойких форм признан метод измерения электропроводности (сопротивления). В исследованиях, проводимых с применением указанного метода, следует использовать различия в величинах сопротивления, полученные при измерениях до и после замораживания побегов. Эти различия лучше отражают фактическую морозостойкость и более четко характеризуют исследуемые формы. Выявлено большое совпадение результатов, полученных при определении степени повреждения побегов методами сопротивления и диффузии. Метод измерения диффузии электролитов и использование теста TTC могут быть применены с целью определения критической температуры, т.е. такой, которая вызывает повреждение 50% тканей.