

ALINA KACPERSKA-PALACZ  
*Instytut Botaniki Uniwersytetu Warszawskiego*

## MROZOODPORNOŚĆ ROŚLIN — WSPÓŁCZESNE POGLĄDY NA ISTOTĘ TEGO ZJAWISKA

Pojęciem „odporność roślin na działanie mrozu” obejmuje się zwykle zarówno te cechy, które pozwalają roślinie uniknąć zamarznięcia tkanki, jak również takie jej właściwości, które umożliwiają jej przetrzymanie ujemnych skutków zamarzania. Są to jednak dwa zupełnie różne zjawiska. W pierwszym przypadku rośliny wykształcają np. dodatkowe elementy okrywowe (np. okrywy zimujących pąków), dzięki którym temperatura tkanki nie spada poniżej jej punktu zamarzania. Może też czasami mieć miejsce wytwarzanie ciepła przez zimującą tkankę (Levitt, 1966). Tego rodzaju przystosowania nie zabezpieczają jednak tkanki przed tak dużymi spadkami temperatury, jakie mają miejsce w warunkach naturalnych. Dlatego dużo większe znaczenie w przyrodzie i dla rolnictwa mają takie mechanizmy, które zabezpieczają tkankę przed skutkami zamarzania, a więc przede wszystkim przed skutkami powstawania w tkance lodu. O tym właśnie rodzaju odporności będzie mowa w obecnym artykule.

Powstanie lodu w tkance może prowadzić do różnorodnych skutków. Obserwacje badaczy XVII i XVIII wieku doprowadziły do sformułowania teorii uszkodzeń znanej pod nazwą „teorii pęknięć” („rupture theory” — Levitt, 1956), która długo egzystowała, gdyż opierając się na znanym zjawisku zwiększania objętości wody w czasie krystalizacji, wydawała się bardzo logiczna. Według tej teorii tworzący się lód miał rozsadzać tkanki, powodując nieodwracalne szkody. W ten sposób tłumaczono głównie pęknięcie grubych pni w czasie silnych mrozów. Jednak nie potrafiono wytłumaczyć znacznie częstszego powstawania uszkodzeń w młodych i cienkich organach roślinnych, w których nie dochodziło do rozszczepienia tkanki, mimo że ich temperatura była znacznie niższa niż temperatura grubych pni (Schübler, 1827). Szczegółowe obserwacje mikroskopowe nie wykazały śladów mechanicznych uszkodzeń ścian komórkowych (Göppert, 1830), chociaż stwierdzono, że sok komórkowy daje się łatwiej wycisnąć z tkanki uprzednio przemrożonej. Nie potrafiono wytłumaczyć dlaczego ściany komórkowe nie wytrzymują nacisku spowodowanego lodem, mimo że na ogół zdolne są do wytrzymywania znacznie większych napięć niż te, które mogłyby spowodować lód powstały z całej nawet wody zawartej w tkance. Ostateczny cios teorii zadało stwierdzenie, że pod wpływem niskiej tem-

peratury komórki nie tylko nie zwiększają objętości, ale się kurczą (Müller-Thurgau, 1880).

W wyniku bardziej nowoczesnych badań można przyjąć, że skutki spowodowane powstaniem lodu zależą od miejsca jego krystalizacji. I tak, w przypadku gwałtownego schładzania tkanki (np. z szybkością  $-5^{\circ}$  do  $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) lód może powstać na terenie samej komórki: między ścianą komórkową a protoplastem, w protoplaście lub wreszcie w wakuoli. Jedynie w pierwszym przypadku i tylko wtedy, gdy tajanie lodu zachodzi wolno, komórka ma szansę przeżycia. Natomiast wykryształizowanie lodu na terenie protoplastu powoduje porozrywanie delikatnych struktur cytoplazmatycznych i w efekcie zawsze powoduje śmierć komórki. Wywołane lodem uszkodzenia mają w tym wypadku charakter wyraźnie mechaniczny. Wykryształizowanie lodu w wakuoli jest ostatnim etapem zamarzania komórki i zachodzi już po uszkodzeniu protoplastu.

Stosowane w laboratoriach ultraszybkie schładzanie, w czasie którego temperatura spada z szybkością 100 i nawet  $10\,000^{\circ}\text{C}/\text{sek.}$ , daje inny efekt: lód powstaje na terenie protoplastu w postaci mikroskopijnych kryształów, które mieszczą się w oczkach endoplazmatycznego reticulum i nie powodują rozerwania struktury. W tym wypadku komórka ma prawie 100% szansę przeżycia.

Zarówno szybkie, jak i ultraszybkie schładzanie zachodzi głównie w warunkach laboratoryjnych, kiedy to mamy do czynienia z fragmentami rośliny i z wymuszonym schładzaniem. W warunkach naturalnych zachodzi stosunkowo powolne schładzanie, którego szybkość rzadko kiedy przekracza  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{godz.}$  W takich warunkach tkanka najpierw ulega zwykle przechłodzeniu, a dopiero później — w miarę dalszego schładzania — zaczyna się tworzyć lód. Najwcześniej lód powstaje w naczyniach, których duża objętość uniemożliwia wydajne przechłodzenie, a następnie — w przestrzeniach międzykomórkowych. Drobne wymiary komórek, a także fakt, że w skład błony komórkowej wchodzi związek zawierający tłuszcze powodują, że zawartość komórki ulega przechłodzeniu i nie dochodzi do powstawania lodu w jej wnętrzu. Lipidowe składniki błon uniemożliwiają również przenikanie kryształów lodu do wnętrza komórki.

Tworzenie się lodu w przestrzeniach międzykomórkowych powoduje tam spadek prężności pary wodnej. Ponieważ jednak para wodna, zawarta w przestrzeniach, znajduje się w dynamicznej równowadze z wodą znajdującą się w komórkach, powoduje to wydzielanie się wody z komórki do przestrzeni. W miarę, jak temperatura spada, coraz większe ilości wody odciągane są z komórki, co doprowadza z kolei do zateżenia soku komórkowego, obniżenia jego punktu krzepnięcia i w efekcie chroni zawartość komórki przed zamrożeniem. Dowiedziono, że spadki tempera-

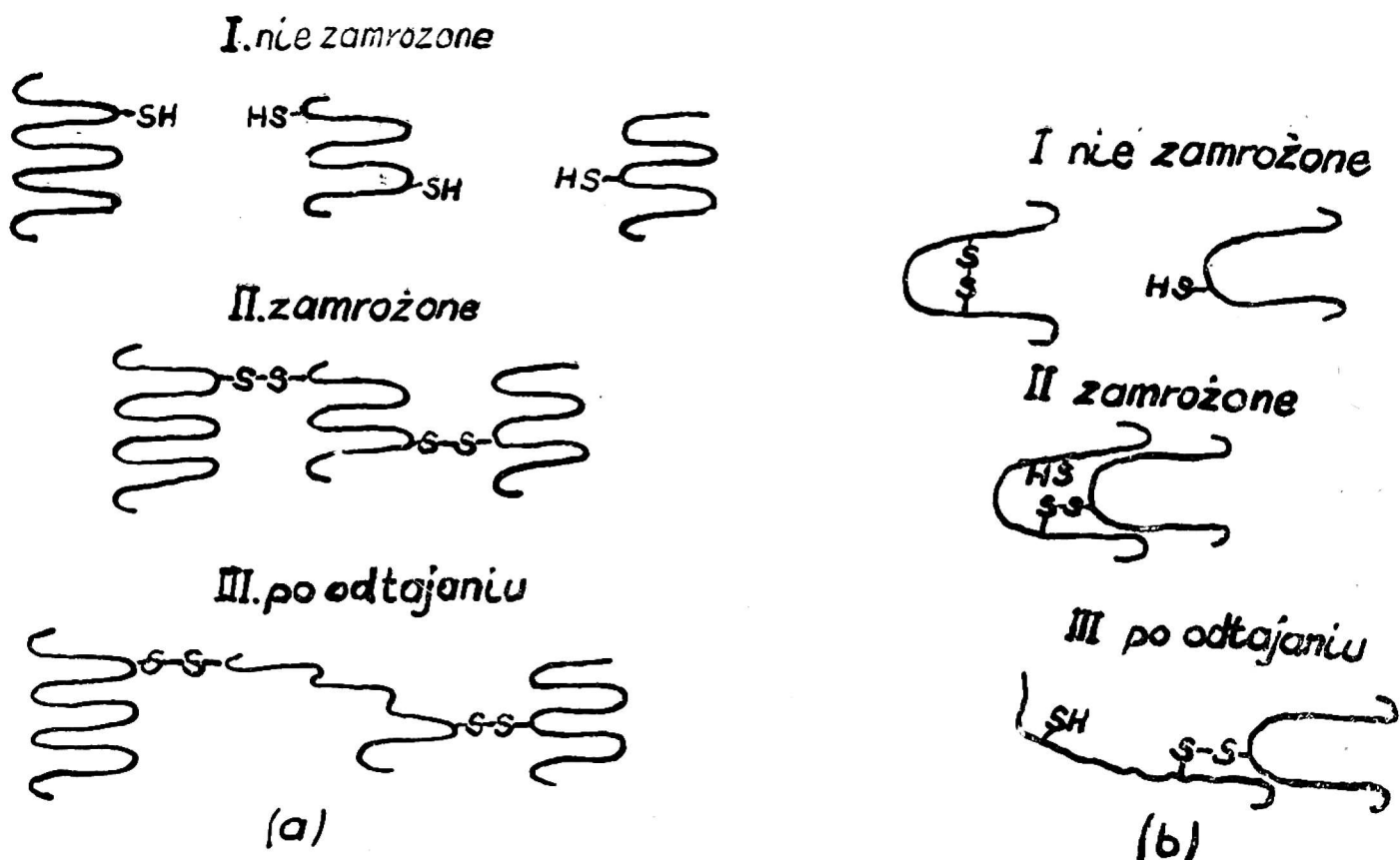
tury nawet poniżej 20 i 30°C nie powodują zamrożenia treści komórki (Sakai, 1965).

Na czym więc polega mechanizm uszkodzeń spowodowanych lodem krystalizującym w przestrzeniach międzykomórkowych? Na ten temat istnieje kilka teorii, z których jedynie teoria Iljina (1933), której rozwinięciem i uzupełnieniem jest hipoteza Levitta (1962), tłumaczy najwięcej obserwowanych zjawisk. Inne, jak np. teoria bezpośrednich uszkodzeń spowodowanych ilością lodu czy też teoria strąceń spowodowanych zbyt- nym zasoleniem („the salt precipitation theory” — Gorke, 1906), mają obecnie znaczenie raczej historyczne. Teoria strąceń zakładała, że bezpośrednią przyczyną uszkodzeń mrozowych jest wytrącenie białek przez zbyt- nio stężony sok komórkowy.

Teoria stworzona przez Iljina, zwana inaczej teorią napięć mechanicz- nych, zakłada, że uszkodzenia mrozowe spowodowane są zarówno dużym odwodnieniem protoplastu, jak również szybkim jego uwadnianiem w czasie tania lodu. Odwodnienie protoplastu nie przebiega z jednakową szybkością dla różnych jego elementów, co powoduje powstawanie ol- brzymich napięć w komórce. Wektory tych napięć mają bardzo zmienny i przypadkowy kierunek i w rezultacie mogą spowodować rozerwanie mniej wytrzymałych struktur. Jeszcze większe niebezpieczeństwo zagraża wg. Iljina komórce w czasie tania lodu: woda, zgromadzona w przestrze- niach międzykomórkowych w postaci lodu, w czasie szybkiego tania wnika gwałtownie do komórki i powoduje rozerwanie włókien cytoplazma- tycznych w tkankach nieodpornych. Tkanki roślin bardziej odpornych charakteryzują się większą zdolnością do szybkiej reabsorpcji uwolnionej z lodu wody.

Teoria Iljina tłumaczy wiele znanych z badań nad mrozoodpornością faktów. I tak np. w jej świetle zrozumiałe staje się znane zjawisko więk- szej odporności komórek o mniejszych rozmiarach (większa specyficzna powierzchnia = mniejsze napięcie) lub korelacja odporności z zawartością cukrów w komórce (większe stężenie cukrów zabezpiecza przed zbyt- ną utratą wody i zmniejsza przez to możliwość występowania dużych napięć w czasie migracji wody) lub wreszcie znaczenie wody tzw. „związanej”, o czym będzie dalej mowa.

Teoria Iljina nie tłumaczy jednak obserwowanych często faktów zamie- rania przemrożonej tkanki dopiero w jakiś czas po przemrożeniu i odtaja- niu, już w czasie trwania na nowo podjętych procesów metabolicznych. To właśnie zjawisko zdaje się tłumaczyć najnowsza teoria Levitta (1962), która w dużym skrócie wygląda jak następuje. W oparciu o współczesne wiadomości dotyczące budowy białek zarówno strukturalnych, jak i enzy- matycznych Levitt twierdzi, że największe znaczenie dla normalnego prze- biegu wielu procesów życiowych w protoplaście mają białka zawierające



Rys. Postulowany mechanizm denaturacji białek spowodowanej utworzeniem międzycząsteczkowych mostków siarczkowych podczas zamarzania (wg Levitta, 1962)

w swoich łańcuchach wolne grupy sulfhydrylowe ( $-\text{SH}$ ). W trakcie przemrażania tkanki, które pociąga za sobą duże odwodnienie komórki, następuje zbliżenie łańcuchów polipeptydowych (rys.). W takich warunkach wolne grupy sulfhydrylowe mogą ulec utlenieniu, co prowadzi do powstania mostków siarczkowych między poszczególnymi łańcuchami. Siła tego wiązania wynosi 50—60 Kcal i przekracza wielokrotnie siłę uprzednio istniejącego wiązania wodorowego (2—9 Kcal). W czasie tajania woda wnika między poszczególne łańcuchy peptydowe i powoduje ich rozsuwanie. W tych warunkach silne wiązania siarczkowe przytrzymują jak kotwice rozsuwające się łańcuchy białek, a słabsze wiązania wodorowe ustępują pod wpływem napierającej wody. Prowadzi to do zniszczenia struktury białek i w rezultacie — do ich denaturacji. Jeśli są to białka enzymatyczne, to w wyniku ich denaturacji mogą wystąpić duże zakłócenia w normalnym przebiegu procesów metabolicznych i w dalszym etapie — śmierć komórki.

Levitt podkreśla uodparniające znaczenie wszystkich tych czynników, które mogą zabezpieczyć wolne grupy sulfhydrylowe przed utlenieniem (Levitt, 1964). Uważa np., że temperatura  $5^{\circ}\text{C}$  ma dlatego znaczenie uodparniające ponieważ hamuje szybkość ciemniowych (enzymatycznych) procesów fotosyntezy i w rezultacie doprowadza do gromadzenia się

w tkance takich produktów reakcji świetlnych jak  $\text{NADPH}_2$ . Związek ten, zwiększając moc redukcyjną tkanki, nie dopuszcza do powstawania mostków siarczkowych.

Teoria Levitta jest teorią bardzo atrakcyjną i poza odpornością mrozową znajduje również zastosowanie do interpretacji uszkodzeń spowodowanych suszą. Ostatnio ukazuje się wiele prac, w których badacze zajmują się ustaleniem korelacji między zawartością grup sulfhydrylowych w tkance a jej odpornością mrozową. Tym nie mniej jednak teoria ta nie tłumaczy znaczenia takich zjawisk obserwowanych w czasie hartowania jak zmiana przepuszczalności błon cytoplazmatycznych dla wody, czy też zwiększenie sił utrzymujących wodę w cytoplazmie.

Odporność roślin na mróz jest z jednej strony ich cechą genetyczną (odmiany tego samego gatunku różnią się stopniem odporności), a z drugiej strony właściwość ta ma charakter dynamiczny, zmienny w czasie, zależny od fazy rozwojowej samej rośliny, a także, i to w pierwszym rzędzie, od warunków środowiska. Ogólnie można przyjąć, że te wszystkie czynniki, które stymulują wzrost rośliny, przede wszystkim jej wzrost elongacyjny, zmniejszają jej odporność mrozową. I tak, czynnikiem zmniejszającym odporność będzie zasilenie rośliny azotem lub duża wilgotność siedliska (Levitt, 1956). Natomiast czynnikami hartującymi są na pewno temperatura bliska  $0^\circ\text{C}$  i światło.

Na ogół, spadkowi temperatury do około  $5^\circ\text{C}$  towarzyszy bardzo ściśle zwiększenie odporności na mróz, rejestrowane przez bardzo wielu badaczy. Przyjęta nawet została standardowa procedura hartowania roślin przez ekspozycję ich na działanie temperatury  $5^\circ\text{C}$  (Kohn i Levitt, 1965, Kacperska-Palacz et al., 1969). W niektórych wypadkach utrzymywanie temperatury hartującej stale na tym samym poziomie jest prawie tak efektywne jak stosowanie na zmianę temperatury niskiej i wysokiej (Tumanow, 1931, Tysdal 1933, Angelo et al., 1939). Jednakże efektywność bodźca temperaturowego jest wyraźnie uzależniona od pory roku i od fazy rozwojowej rośliny. Świadczą o tym wyniki badań Piska (1953), który stwierdził, że największe efekty hartowania otrzymuje się na jesieni i na początku zimy. Ponadto, roślina w stadium rozwoju wegetatywnego może osiągnąć większy stopień zahartowania niż roślina w stadium rozwijania części generatywnych (Levitt, 1956). Jaryzacja osłabia zdolność do zahartowania i mimo, że sama temperatura jaryzacji ma pewien wpływ hartujący, to odmiany niejaryzowane poddane hartowaniu rozwijają znacznie większą odporność niż jaryzowane (Levitt, 1966).

Jeszcze bardziej skomplikowany i do dziś nie zupełnie wyjaśniony wpływ na zahartowanie roślin wywiera światło. Wymagania świetlne roślin są bardzo różne i zależą od gatunku. I tak np. wiadomo, że zimujące rośliny jednoroczne nie są zdolne do hartowania w ciemności (Tumanow

1931, Dexter 1933). Rośliny, zrzucające liście na zimę, mogą być wystarczająco zahartowane w ciemności, o ile w okresie poprzedzającym działanie temperatury hartującej zapewniono im dostęp światła (Steponkus i Lanphear, 1968a). U roślin zielnych wielu badaczy stwierdziło obniżenie odporności po przetrzymaniu tych roślin w ciemności (Angelo et al 1939).

Na podstawie zebranych danych można przypuszczać, że działanie światła ma dwojaki aspekt: fotosyntetyczny lub fotoperiodyczny. Niewątpliwie, fotosynteza jest tym procesem fizjologicznym dzięki któremu roślina zdobywa niezbędne rezerwy węglowodanowe i dzięki któremu może mieć miejsce akumulacja cukrów, o których znaczeniu była i będzie jeszcze mowa. Ponadto, jeśli Levitt ma rację — reakcje świetlne fotosyntezy dostarczają roślinie czynnika redukującego, który zapobiega utlenianiu grup sulfhydrylowych i powstawaniu mostków siarczkowych. Jednocześnie jednak, ostatnie doświadczenia Steponkusa i Lanpheara (1968a), dotyczące wpływu różnej intensywności światła i różnej długości okresu świetlnego, wskazują, że do zaspokojenia zapotrzebowania rośliny na światło w procesie hartowania wystarczająca jest zarówno niska jego intensywność jak i krótki okres działania. Ponadto, pozbawienie roślin dostępu dwutlenku węgla dało w wyniku pewne osłabienie ich odporności, ale nigdy do poziomu roślin kontrolnych z ciemności. Fakty te wskazywałyby na inny aspekt działania światła — aspekt fotoperiodyczny, a więc na podobną zależność stanu fizjologicznego rośliny od światła jaka występuje przy kiełkowaniu lub zakwitaniu roślin. Tego typu regulacja odporności przez światło spowodowana byłaby zmianami w poziomie endogennych regulatorów wzrostu: hormonów roślinnych. I rzeczywiście — badania z ostatnich lat amerykańskiej grupy uczonych z pracowni prof. Lanpheara (Mac Irving i Lanphear 1967a, b, 1968) wydają się wskazywać, że krótki dzień, dający lepsze efekty w trakcie hartowania temperaturą, powoduje w roślinie zmniejszenie poziomu takich stymulatorów wzrostu jak gibereliny. Jednocześnie badacze ci obserwowali pojawienie się w roślinie w trakcie hartowania jakiegoś inhibitora wzrostu, którego poziom był skorelowany z mrozoodpornością. Działanie długim dniem (16 godz.) dało efekty zupełnie odwrotne.

Wyniki tych badań muszą jeszcze zostać potwierdzone na innych roślinach i ewentualnie w innych warunkach. Tym nie mniej już w tej chwili można by na ich podstawie wytłumaczyć różną efektywność hartowania w lecie i na jesieni.

Zahartowaniu rośliny towarzyszy szereg zmian w jej właściwościach zarówno morfologicznych jak i fizjologicznych. W zasadzie większość prac nad mrozoodpornością roślin dotyczy poszukiwania takich jej cech, które są najlepiej z tą odpornością skorelowane. Ten kierunek poszukiwań ma podwójny cel: po pierwsze cecha taka może służyć jako narzędzie

pomiaru, przy pomocy którego łatwo wyselekcjonować odmiany bardziej odporne, lub bardziej podatne na hartowanie od odmian mało odpornych, a po drugie — poznanie tych cech może zbliżyć badaczy do wyjaśnienia mechanizmów regulujących odporność roślin.

Na ogół dosyć dobrą korelację z mrozoodpornością wykazują takie cechy morfologiczne rośliny, jak długość i grubość liści i ogonków liściowych, długość międzywęzli, wielkość i kształt komórek. Cechy te są wynikiem mniej lub bardziej bujnego wzrostu rośliny i jeśli wskazują na zahamowanie wzrostu elongacyjnego — istnieje duże prawdopodobieństwo, że roślina jest bardziej odporna. Na odwrotną zależność odporności

1

i wzrostu wskazuje Levitt (1966) wzorem:  $\text{odporność} = \frac{1}{\text{wzrost}}$ . Może

się jednak zdarzyć, że roślina zakończyła wzrost wcześniej niż podziałały czynniki hartujące. W takim wypadku efektem hartowania może być podwyższona jej odporność mimo, że wymiary jej na to nie wskazują. Ponadto, ostatnie wyniki doświadczeń Levitta (Cox i Levitt, 1969) świadczą, że wskaźnikiem odporności nie może być zahamowanie wzrostu w sensie przyrostu masy i ilości liści. Stwierdził on bowiem, że liście i całe rośliny kapusty były tym bardziej odporne im dłużej i im intensywniej zachodził ich wzrost w warunkach temperatury 5° i 0°C. Levitt sugeruje, że w tym wypadku o odporności tkanki decydowała ukierunkowana niską temperaturą intensywna synteza białek.

Związek pomiędzy odpornością mrozową rośliny a jej cechami morfologicznymi nie jest bezpośredni i zależy przede wszystkim od zmian w jej właściwościach fizjologicznych.

Do czynników fizjologicznych należy między innymi zawartość wody w tkance. Na ogół obserwuje się w trakcie hartowania spadek ogólnej zawartości wody (Levitt, 1956). Fakt ten komentowany jest przez wielu badaczy jako przejaw działania mechanizmów ograniczających zawartość wolnej, łatwej do wykryształizowania wody w komórce. Jednakże badania przeprowadzone w naszej pracowni (Kacperska-Palacz, Egierszдорff, 1970) wskazywałyby na inną przyczynę tego zjawiska, a mianowicie na ograniczoną dostępność wody zawartej w glebie dla korzeni roślin poddanych działaniu temperatury bliskiej 0°C. Jeśli hartowanym roślinom zabezpieczono dobre zaopatrzenie w wodę przez hodowlę ich w hydroponikach, wykazały one większą zawartość wody niż rośliny kontrolne, niehartowane. Rośliny hartowane charakteryzowały się przy tym sprawniejszym oddawaniem wody w warunkach działania dużej siły ssącej powietrza, zwiększoną przepuszczalnością błon komórkowych dla wody, co na pewno zabezpieczało je przed wykryształizowaniem lodu wewnątrz komórek.

Wielu badaczy (Levitt, 1956) obserwowało, że rośliny hartowane lub

zahartowane charakteryzują się wyższą zawartością tej frakcji wody komórkowej, która pozostaje w równowadze z określoną, niską prężnością pary wodnej w otoczeniu. Wodę tę określono nazwą „wody związanej”. Siły, odpowiedzialne za utrzymywanie tej wody w komórce mają charakter wyraźnie osmotyczny lub koloidalny.

Hartowanie powoduje wyraźny wzrost potencjału osmotycznego soku wakuoli. Zjawisko to było i jest obserwowane przez bardzo wielu badaczy, między innymi i przez nas (Kacperska-Palacz et al., 1969). Jak analizy soku wykazały, wzrost potencjału osmotycznego następuje na skutek gromadzenia się w nim przede wszystkim cukrów prostych (Steiner, 1933). Co więcej, można dodatkowo podnieść odporność tkanek już zahartowanych lub z natury bardziej odpornych przez infiltrację ich roztworami cukrów (Perkins i Andrew, wg Levitta 1966). Natomiast duże nawet stężenie cukrów w komórce nie zwiększy jej odporności o ile podziałamy jakimś czynnikiem naruszającym strukturę półprzepuszczalnych błon komórkowych, np. chloroformem.

Przyczyną gromadzenia się cukrów w czasie hartowania mogą być różne zjawiska fizjologiczne. I tak np. temperatura 5°C bardzo wyraźnie hamuje oddychanie, natomiast mniej wpływa na szybkość fotosyntezy, co w rezultacie prowadzi do akumulacji cukrów. Ponadto obserwuje się wzmożoną hydrolizę skrobi w trakcie obniżania temperatury (Sakai, 1966), co również powiększa zapas wolnych cukrów prostych.

Badania dotyczące jakości nagromadzonych cukrów wskazują zarówno na duży udział oligosacharydów (prace Babenki i Geworkiana, 1967), jak również na specjalne znaczenie takich cukrów jak sacharoza (Steponkus i Lanphear, 1968b), rafinoza lub maltoza (Filipowicz i Strasznowa, 1969).

Niewątpliwie, znaczenie gromadzonych cukrów dla odporności mrozowej będzie zależało od miejsca ich akumulacji. Jeśli będzie nim wakuola, będą one wpływały na poziom odporności poprzez utrzymywanie w komórce większej ilości wody niezdolnej do zamrożenia, jak również — poprzez obniżenie punktu zamarzania soku wakuoli. Natomiast gromadzenie się drobnych cząsteczek cukrów w cytoplazmie może przyczynić się do utrzymania struktury przestrzennej składników protoplastu, przede wszystkim białek, po ich odwodnieniu na skutek krystalizacji lodu w przestrzeniach międzykomórkowych. Badania *in vitro* przeprowadzone przez Gilesa i Mc Kay'a (wg Levitta, 1966) wykazały, że heksozy tworzą w roztworach wodnych kompleksy z białkami, przy pomocy wiązań wodorowych.

Od lat pięćdziesiątych notuje się wzmożone zainteresowanie badaczy korelacją odporności na mróz z poziomem różnych organicznych związków azotowych. Badania Siminovitcha i Briggsa, opublikowane w 1953 r., a potem prace innych autorów wskazały na istnienie zadziwiająco ścisłej





Jak widać z tego schematu, Levitt wybijając na pierwsze miejsce znaczenie grup sulfhydrolowych, pomija zupełnie sens takich obserwowanych zjawisk, jak zmiany we właściwościach fizycznych protoplastu w czasie hartowania, zmiany we właściwościach błon komórkowych. Pomija też zupełnie możliwość regulacji odporności poprzez zmiany w poziomie regulatorów wzrostu.

Znacznie pełniejszy obraz tego co się ewentualnie dzieje w hartowanej komórce daje teoria Tumanowa (1967), który operując faktami zaczerpniętymi z prac różnych autorów, stworzył koncepcję mrozoodporności opartą przede wszystkim na zmianach właściwości fizycznych samego protoplastu.

Wg Tumanowa, zmiany prowadzące do powstania odporności następują w okresie hartowania, który poprzedzany jest z reguły przejściem roślin w stan spoczynku zimowego. O ile roślina nie znajduje się w stanie spoczynku — hartowanie trwa znacznie dłużej. Proces hartowania dzieli Tumanow na dwie fazy: pierwsza przebiega w temperaturze obniżonej, ale jeszcze powyżej  $0^{\circ}\text{C}$ , a druga w trakcie dalszego obniżania temperatury, prowadzącego do powstawania lodu w tkance. Na istnienie tych dwóch faz hartowania wskazują również wyniki badań innych badaczy, między innymi i Levitta (Kohn and Levitt, 1965).

W trakcie I fazy hartowania następuje stopniowa żelatynizacja protoplastu komórki. Zjawisko żelatynizacji jest ogólnie znane dla roztworów dużych, łatwo pęczniejących cząsteczek poddanych działaniu niższej temperatury (np. zestalanie się żelatyny). Żelatynizację utrudniają frakcje drobnocząsteczkowe. Zawartość normalnej, jeszcze niehartowanej komórki istnieje zarówno w postaci zolu jak i żelu. Wzajemny stosunek zolu i żelu zależy od wielu czynników, między innymi od aktywności metabolicznej komórki. Szybkie procesy wzrostowe sprzyjają przewadze zolu w komórce. Natomiast zahamowanie wzrostu, związane np. z przejściem komórki w stan spoczynku zimowego, sprzyja żelatynizacji protoplastu. Hartowanie temperaturą  $5^{\circ}\text{C}$  pogłębia ten proces, lub go rozpoczyna o ile komórka posiada zdolność syntezy odpowiednich substancji, tzn. wielkocząsteczkowych białek hydrofilnych. Żelatynizacja protoplastu zapewnia komórce pewną stabilność, zabezpiecza ją przed mechanicznymi lub dehydratacyjnymi deformacjami.

W trakcie I fazy hartowania, poza żelatynizacją, ma również miejsce nagromadzenie drobnocząsteczkowych substancji ochronnych — cukrów, które rozproszone są w roztworze, w oczkach siatki żelu. Stopniowe odwadnianie komórki na skutek powstawania lodu w przestrzeniach międzykomórkowych powoduje zateżnienie tego roztworu co ochrania komórkę przed utworzeniem w niej lodu.

Na skutek spadku temperatury poniżej  $0^{\circ}\text{C}$ , w drugiej fazie hartowania ma miejsce odwadnianie żelu komórkowego i dalsze zwieranie oczek siatki cytoplazmatycznego żelu. Doprowadzić by to mogło do zbytnej kruchości komórek i tkanek i dużej ich podatności na działanie czynników mechanicznych. Zjawisku temu przeciwdziałają zdaniem Tumanowa nagromadzone związki drobnocząsteczkowe, które działają jako substancje zwiększające plastyczność żelu i powodują jego rozluźnienie. Tumanow, opierając się na pracach Parkera twierdzi, że przy obniżonej znacznie temperaturze żel cytoplazmatyczny może z powrotem zamienić się w zol. (Fizyka zna takie przykłady substancji, które mają formę żelu w stosunkowo wysokiej temperaturze, a które po oziębieniu przechodzą w zol, np. miozyna). Natomiast, w miarę spadku temperatury, żelatynizacji ulega sok wakuoli.

Duże znaczenie dla przeżycia przez tkankę nawet bardzo niskiej temperatury ma wg Tumanowa przepuszczalność błon cytoplazmatycznych dla wody. Twierdzi on, że już w I fazie hartowania, a nawet jeszcze wcześniej — po wejściu komórki w stan spoczynku, zwiększa się ogromnie przepuszczalność plazmolemy. Ułatwia to przechodzenie wody do przestrzeni. W końcu jednak, w trakcie coraz głębszego przemrażania, następuje denaturacja plazmolemy. Zdolność komórek do szybkiej jej regeneracji decyduje o większej mrozoodporności tkanki.

Hipoteza Tumanowa tłumaczy wiele faktów opisywanych wcześniej przez różnych badaczy. Niestety, opiera się na danych zebranych z różnych prac, wykonanych różnymi metodami i na różnych gatunkach. W literaturze można znaleźć cały szereg prac wskazujących na istnienie zjawisk zupełnie przeciwnych opisywanym, co może być oczywiście spowodowane zarówno różnorodnością stosowanych metod jak i odmiennym przebiegiem samego zjawiska. Tak np. badania Mac Irvinga i Lanpheara (1967a) dowodzą, że roślina może osiągnąć stan zahartowania bez uprzedniego przejścia w stan spoczynku. Można chyba jednak przyjąć, że w ogólnych zarysach koncepcja Tumanowa jest słuszna, natomiast należy przebadać poszczególne jej składniki w miarę możliwości jednorodnymi metodami i na jednorodnym materiale.

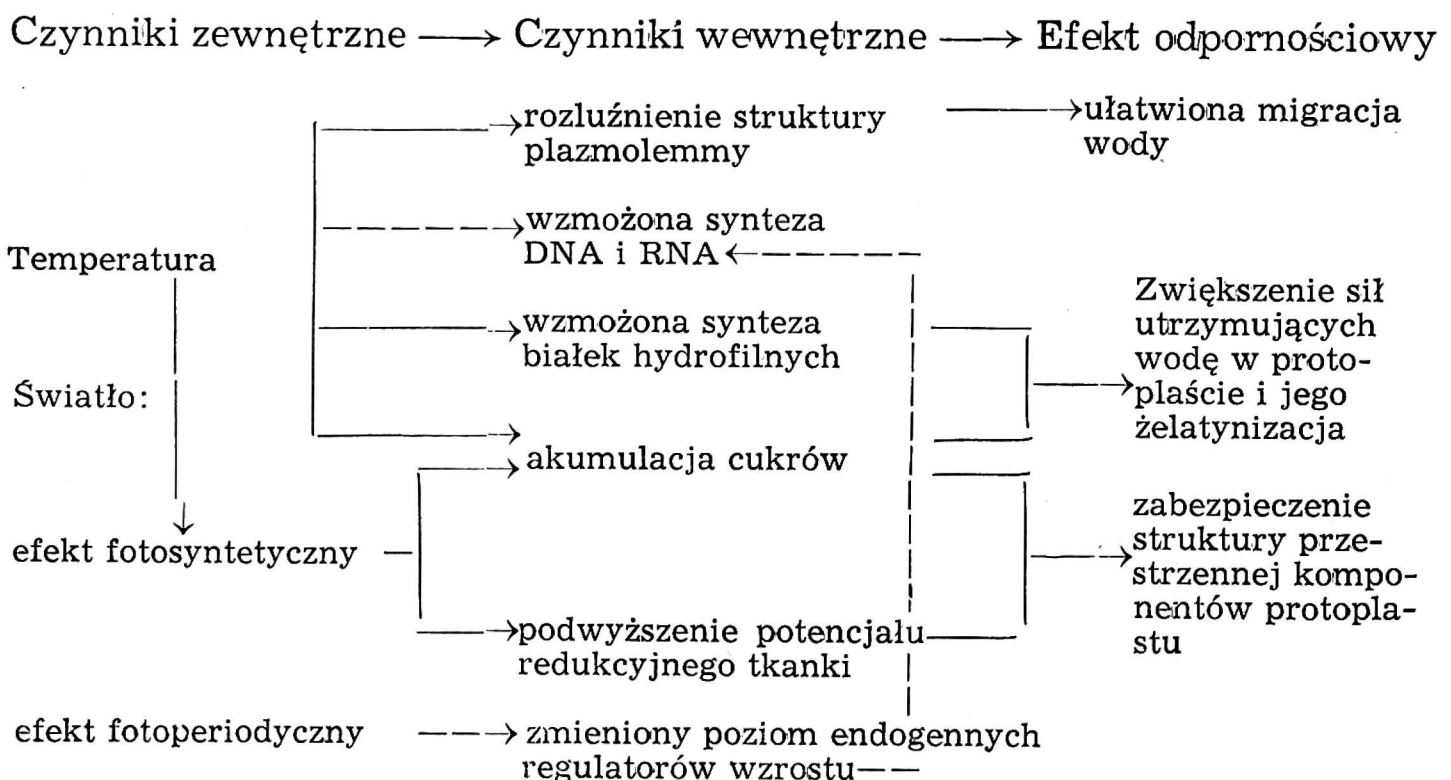
W doświadczeniach podjętych w Instytucie Botaniki UW próbujemy ustalić wpływ dwóch niezależnych czynników hartujących na właściwości fizyczne protoplastu, a także na jego skład chemiczny. Rośliną modelową jest ozimy rzepak, a czynnikami hartującymi temperatura  $5^{\circ}\text{C}$  oraz retardant wzrostu CCC (chlerek chlorcholiny) — znany między innymi jako preparat podnoszący mrozoodporność roślin (Marth, 1964).

Na podstawie dotychczas uzyskanych danych (Kacperska-Palacz i Egierszdorf, praca w druku), można by postulować istnienie co najmniej trzech równocześnie działających mechanizmów hartujących:

- 1 — usprawniający migrację wody z komórki w trakcie przemrażania, w oparciu o zwiększoną przepuszczalność błon cytoplazmatycznych dla wody,
- 2 — zwiększający siły utrzymujące wodę w komórce; tu miałyby miejsce obserwowane przez nas procesy nagromadzenia się cukrów redukujących i białek hydrofilnych (Kacperska-Palacz et al., 1969),
- 3 — zapewniający tkance większą odporność na odwodnienie. Tu ewentualnie miałyby miejsce procesy zapewniające utrzymanie struktury przestrzennej protoplastu, przede wszystkim białek, między innymi np. ochrona grup sulfhydrylowych przed utlenieniem.

Jednocześnie w badaniach naszych rejestrujemy pozytywny wpływ krótkiego dnia na poziom odporności w porównaniu z długim dniem, któremu nie towarzyszy nagromadzenie białek hydrofilnych lub też czynnika redukującego. Natomiast długi dzień i temperatura 5°C wyraźnie podwyższają zawartość tych dwóch czynników. Wyjaśnienie tych zjawisk jest obecnie przedmiotem naszych badań.

Na podstawie dotychczas zebranych danych można by zaproponować następujący schemat procesów zachodzących w pierwszej fazie hartowania, przy czym procesy przez nas obserwowane zaznaczono linią ciągłą, a postulowane — przerywaną (są one obiektem badań).



Tak więc, pierwsza faza hartowania miałaby charakter wyraźnie metaboliczny i efektem jej byłoby przygotowanie komórki do znoszenia skut-

ków powstającego w drugiej fazie lodu w przestrzeniach międzykomórkowych. Natomiast w drugiej fazie następowałoby przede wszystkim stopniowe odwadnianie komórek, przygotowujące je do znoszenia bardzo niskiej temperatury. Wg Sakai (1965) decydujące dla przeżycia komórek będzie tempo schładzania do temperatury  $-40^{\circ}\text{C}$ . W tej temperaturze komórka roślinna pozbawiona zostaje całej zawartości zdolnej do zamarzania wody i dalsze schładzanie nawet do temperatury  $-70^{\circ}\text{C}$  już praktycznie nic w stanie komórki nie zmienia. Taka ultra niska temperatura występuje w warunkach syberyjskiej tajgi, a odporność drzew na działanie takiej temperatury jest przedmiotem zainteresowania japońskich badaczy z Instytutu Niskich Temperatur w Sapporo. Wyniki ich badań, chociaż bardzo interesujące, są niezbyt przydatne w warunkach klimatu Polski i dlatego w artykule tym zaniechano omawiania problemów związanych z odpornością na ultra niską temperaturę.

## LITERATURA

1. Angelo E., Iverson V. E., Brierley W. G., and Landon R. H.: 1939. Minnesota Agr. Expt. Sta. Tech. Bull. 135: 1—36.
2. Babenko W. I., Geworkian A. M.: 1967. Fizjologia Rastienij 14: 727—736.
3. Cox Wesley, and Levitt J.: 1969. Plant Physiol. 44: 923—928.
4. Dexter S. T.: 1933. Effect of several environmental factors on the hardening of plants. Plant Physiol. 8: 123—139.
5. Filipowicz I. B., Strasznowa M. I.: 1969. Fizjologia Rastienij 16: 49—54.
6. Gorke M.: 1906. Landwirtsch. Versuchs Sta. 65: 149—160.
7. Göppert H. R.: 1830. Über die Wärme-Entwicklung in den Pflanzen, deren Gefrieren und die Schutzmittel gegen dasselbe. Max and Comp, Berlin, Breslau.
8. Hodgson R. W.: 1964. Crop Science 4: 302—305.
9. Iljin W. S.: 1933. Protoplasma 19: 414—442.
10. Jung G. A., Shih S. C., and Shelton D. C.: 1967. Plant Physiol. 42: 1653—1657.
11. Kacperska-Palacz A. E., Błaziak M., Wciślińska B.: 1969. Bot. Gaz. 130 (3): 213—221.
12. Kacperska-Palacz A. E., Egierszdorff St.: 1970. W druku.
13. Kohr and Levitt J.: 1965. Plant Physiol. 40: 476—480.
14. Levitt J.: 1956. The Hardiness of Plants. Academic Press, New York.
15. Levitt J.: 1962. J. Theoretical Biol. 3: 355—391.
16. Levitt J.: 1964. Cryobiology 1: 17.
17. Levitt J.: 1966. Winter Hardiness of Plants. W Cryobiology, Academic Press, London and New York.
18. Mac Irving R., Lanphear F. O.: 1967 a. Plant Physiol. 42: 1191—1196.
19. Mac Irving R., Lanphear F. O.: 1967 b. Plant Physiol. 42: 1384—1388.
20. Mac Irving R., Lanphear F. O.: 1968. Plant Physiol. 43: 9—13.
21. Marth P. C.: 1964. Agr. Food Chem. 13: 331—333.
22. Müller-Thurgau H.: 1880. Landwirtsch. Jahrb. 9: 133—189.
23. Pisek A.: 1953. Umschau Wiss. u. Tech. 21.
24. Sakai: 1965. Plant Physiol. 40: 882—887.

25. Sakai: 1966. *Plant Physiol.* 41: 353—359.
26. Schübler G.: 1827. *Ann. Physik u. Chem.* 10: 581—592.
27. Siminovitch D., and Briggs D. R.: 1953. *Plant Physiol.* 28: 177—200.
28. Steiner M.: 1933. *Jahrb. wiss. Botan.* 78: 564—622.
29. Steponkus P. L., and Lanphear F. O.: 1968 a. *Plant Physiol.* 43: 151—156.
30. Steponkus P. L., and Lanphear F. O.: 1968 b. *Physiologia Plantarum* 21: 777—791.
31. Tumanow I. I.: 1931. *Phytopathol. Z.* 3: 303—334.
32. Tumanow I. I.: 1967. *Fizjologia Rastienij* 14: 521—536.
33. Tysdal H. M.: 1933. *J. Agr. Research* 46: 483—515.
34. Wilding M. D., Stahmann M., and Smith Dale.: 1960. *Plant Physiol.* 35: 726—732.