

PAWEŁ CHMIELARZ

Odporność mrozowa żołądzi dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) o wilgotności 42%

Frost Resistance of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.)
Acorn with 42% Humidity

Wstęp

Zołądzie, podobnie jak np. nasiona kasztanowca czy jaworu, należą do nasion kategorii *recalcitrant*. Poza nasionami nielicznych gatunków pochodzących z klimatu umiarkowanego, kategoria ta reprezentowana jest w większości przez nasiona drzew i krzewów strefy tropikalnej. Podstawową cechą dojrzałych nasion kategorii *recalcitrant* jest konieczność zachowania wysokiego poziomu uwodnienia. Odwodnione nasiona szybko tracą żywotność, a ich przechowywanie jest możliwe tylko przez krótkie okresy. Najczęściej są to nasiona niespoczynkowe, a szczególną ich właściwością jest pozostawanie w stanie wysokiej aktywności metabolicznej, co sprzyja szybkiemu skiełkowaniu nasion wkrótce po dojrzeniu. Cienka i przepuszczalna łupina nasienna lub owocnia nie chroni nasion przed nadmierną utratą wody. Wszystko to sprawia, że nasiona kategorii *recalcitrant* giną w temperaturze ujemnej, nawet bliskiej 0°C, czasami też w temperaturze dodatniej, w przedziale temperatur od 0 do 10°C (nasiona roślin tropikalnych) [2].

W literaturze brakuje dokładniejszych danych o minimalnej temperaturze, w której następuje śmierć żołądzi podczas zamrażania. W ujemnej temperaturze krytycznej o przeżywalności nasion decydują ponadto takie czynniki jak pochodzenie, dojrzałość nasion, wilgotność i zdrowotność. Czynniki równie ważnymi, wpływającymi na przeżywalność przemrażanych żołądzi są temperatura i czas jej oddziaływania na żołądzie podczas schładzania od temperatur dodatnich do 0°C (okres hartowania żołądzi), tempo spadku temperatury poniżej 0°C, czas oddziaływania mrozu (minuty, dni, miesiące, lata), szybkość rozmrażania oraz warunki termiczne po rozmrożeniu żołądzi.

Ogjewskij w 1949 roku [3] stwierdził, iż żołądzie giną w temperaturze niższej od 0°C. Prawdin i Filimonowa [4] obserwowali całkowite zamieranie żołądzi (o wilgotności

41–43%), na które oddziaływano przez 4 miesiące stałą temperaturą -10, -15 i -20°C. Autorzy ci udowodnili ponadto, że żołądź nie skielkowane i skielkowane (długość korzonka 3–4 mm), zachowywały swoją żywotność w ciągu 4-miesięcznego przechowywania w temperaturze -5 i -7°C. Bardziej odporne na temperaturę -5 i -7°C były żołądź nie skielkowane, których żywotność utrzymywała się na tym samym poziomie jak po przechowaniu w 5, 0 i -2°C. Żywotność żołądź skielkowanych po przebywaniu w temperaturze -5 i -7°C była obniżona o 50% w porównaniu z przechowywanymi przez 4 miesiące w temperaturze 5, 0 i -2°C.

Podczas przechowywania w lodzie w temperaturze -12°C [1] lub w początkowo wilgotnym torfie w temperaturze -4°C, w nieszczelnie lub szczelnie zamkniętych pojemnikach, a także w temperaturze pokojowej, żołądź traciły swoją żywotność w bardzo krótkim czasie. Z badań Schönborn'a [5], który określał temperaturę krystalizacji lodu w pojedynczych żołądźkach o wilgotności 27–44% wynika, że nasiona dębu szypułkowego przy wilgotności 30% ginęły w temperaturze -8°C. Przy wilgotności 25% egzoterma wystąpiła w temperaturze -14°C.

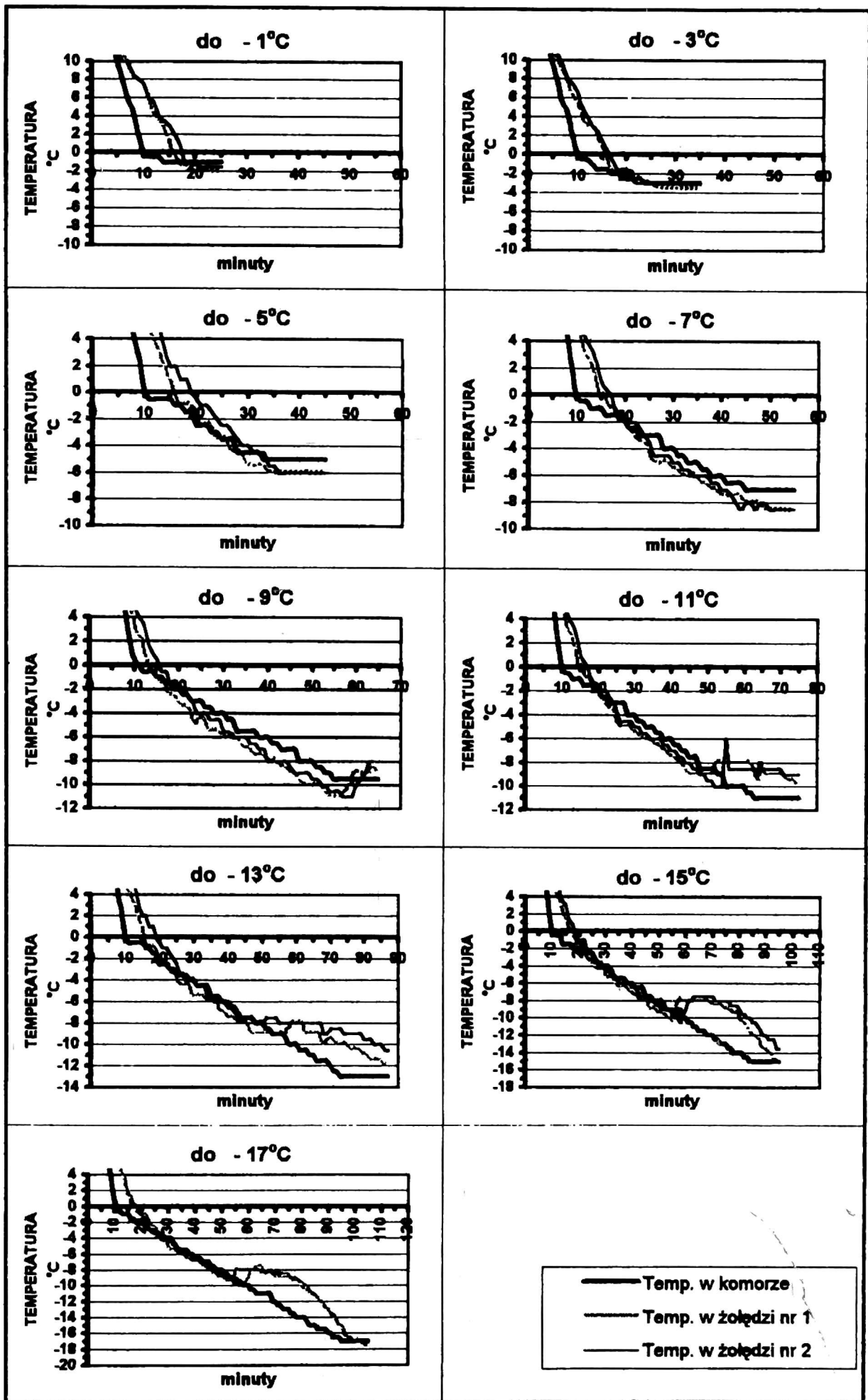
Celem naszych badań było określenie stopnia wrażliwości żołądź na temperaturę niższą od 0° podczas stopniowego ich zamrażania.

Materiał i metody

Użyte do badań dojrzałe żołądź zbierano 15 października 1994 roku, po opadnięciu z jednego drzewa w miejscowości Komorniki pod Kórnikami. Po zbiorze poduszono je z wilgotności początkowej 48–46% do 43–42%, a następnie przechowywano przez 4 miesiące w nieszczelnie zamkniętych pojemnikach w temperaturze 3°C. Do doświadczenia pobierano wyłącznie żołądź nie skielkowane i nie pęknięte. Miały one po tym czasie przechowywania wyraźnie powiększoną oś zarodkową.

Wilgotność żołądź (3×10 połówek z jednym całym liścieniem i osią zarodkową) określano przy użyciu wago-suszarki. Przed oceną wilgotności żołądź mielono. Program suszenia (100°C przez 30 minut) ustalono eksperymentalnie porównując wyniki oceny wilgotności z wynikiem suszenia poćwiartowanych żołądź (3×30 sztuk) w suszarce w 105°C przez 48 godzin. Wyniki oceny wilgotności dwoma wymienionymi sposobami nie różniły się istotnie.

Zdolność kiełkowania nasion określano po przechowaniu lecz przed zamrożeniem (próba kontrolna) oraz po każdym mrożeniu (9 ujemnych temperatur od -1 do -17°C, różniących się kolejno o 2°C). W próbach kiełkowania stosowano 3 powtórzenia, po 30 rozmrożonych żołądź. Rozmrożone żołądź przecinano poprzecznie odrzucając 1/3 od strony znamienia, a do prób kiełkowania używano pozostawionych 2/3 obydwu liścieni z osią zarodkową. Próby kiełkowania i wschodzenia przeprowadzono w plastikowych pudełkach napełnionych do połowy wilgotną mieszaniną piasku z torfem w proporcji objętościowej 1:1. Żołądź wciskano lekko w podłoże, korzeniem zarodkowym skierowanym ku górze. Po uprzednim nawilżeniu podłoża wodą pudełka przykrywano wiekiem. Przez pierwsze dwa tygodnie próbę przeprowadzono w ciemności w temperaturze 25°C. Po około 2 tygodniach wieko uchylano (hartowanie pędów) pozostawiając wschodzące żołądź jeszcze na 2–3



RYC. 1. *Quercus robur* L. Przebieg zmian temperatury w komorze i w dwóch żółdziach podczas zamrażania do -1, -3, -5, -7, -9, -11, -13, -15 i -17°C

dni w ciemności. Po całkowitym zdjęciu wieka pudełka przenoszono na światło o natężeniu $52 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, LF 40 W z 16-godzinnym oświetleniem na dobę. Następowo wtedy szybkie zazielenienie się etiolowanych pędów, następował też rozwój liści.

Zamrażanie całych żołądzi (3×30 sztuk) przeprowadzano za pomocą programu komputerowego CRYOSON firmy Cryoson GmbH, umożliwiającego zamrażanie materiału żywego w ściśle kontrolowanych i powtarzalnych warunkach. Źródłem chłodu był ciekły azot. Komora do zamrażania umożliwiała utrzymanie temperatury z dokładnością do $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Temperaturę w komorze schładzania i w dwóch zamrażanych żołądziach mierzono za pomocą termopar (miedź-konstantan). Termopary o średnicy 1 mm umieszczano w samym środku każdego z dwóch żołądzi długości ok. 25 mm, nawiercając w nich powoli od strony znamienia jeden otwór o długości około 13 mm i średnicy przekraczającej nieco średnicę termopary. Koniec termopary umieszczono dokładnie w środku żołądzi pomiędzy liścieniami. Schładzanie żołądzi do 0°C rozpoczynano każdorazowo od temperatury wyjściowej 10°C . Termopary umożliwiały pomiar temperatury rzeczywistej w żołądziach podczas spadku temperatury w komorze, a także określenie początku krystalizacji lodu w ich wnętrzu (nagły wzrost temperatury, tzw. egzoterma). Temperaturze początku krystalizacji lodu, a więc i śmierci żołądzi, odpowiada uwalnianie się dużej ilości ciepła z zamarzających komórek i tkanek. Wydzielanie się ciepła widoczne jest na wykresie procesu zamrażania jako gwałtowny wzrost temperatury o kilka stopni (ryc. 1). W komorze do kontrolowanego zamrażania przeprowadzono 9 odrębnych eksperymentów zamrażania żołądzi z początkową szybkością schładzania od 10 do 0°C w tempie $2^\circ\text{C}/\text{min}$, a poniżej 0°C w tempie $0,2^\circ\text{C}/\text{min}$. Żołądzie zamrażano kolejno do -1 , -3 , -5 , -7 , -9 , -11 , -13 , -15 i -17°C . Po osiągnięciu każdej z 9 zaprogramowanej temperatury żołądzie pozostawały w niej jeszcze przez 15 minut.

Rozmrażanie żołądzi przeprowadzano każdorazowo w temperaturze 24°C przez dwie godziny, po czym żołądzie poddawano próbom kiełkowania i wschodzenia. Jako nasiona skiełkowane uznawano te, których korzeń, geotropicznie skierowany ku dołowi, osiągnął długość 3 mm. Za wzeszłe uznawano nasiona z rosnącym korzeniem i pędem (dł. 10 mm). Określano również średni czas kiełkowania i wschodzenia, wyliczając go ze wzoru:

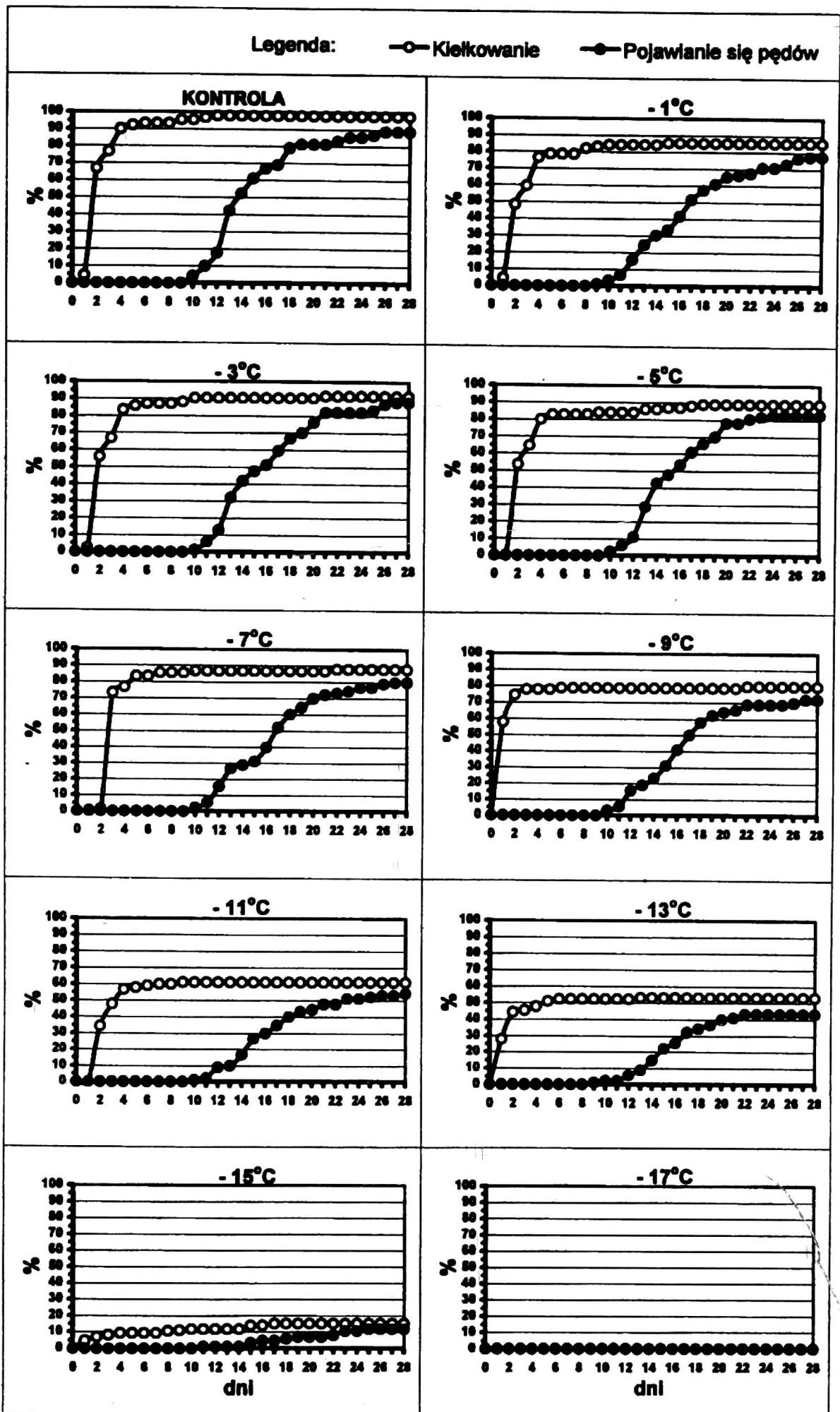
$$\text{Średni czas (kiełkowania lub wschodzenia)} = \frac{l_1 d_1 + l_2 d_2 + \dots + l_n d_n}{l_1 + l_2 + \dots + l_n}$$

gdzie:

$d_1, d_2 \dots d_n$ — liczba dni liczonych od początku próby kiełkowania i wschodzenia zarazem;

$l_1, l_2, \dots l_n$ — liczba nasion, które skiełkowały lub wzeszły w tych dniach; wynik wyraża w dniach średni czas, jaki upływa od wysiewu do skiełkowania lub wzejścia nasion danej próbki.

Uzyskane wyniki poddano analizie wariancji. Średnie porównano testem Tukey'a przy poziomie istotności $\alpha=0,05$. Wartości procentowe nie różniące się istotnie oznaczono na wykresach (ryc. 3 i 4) tymi samymi literami.



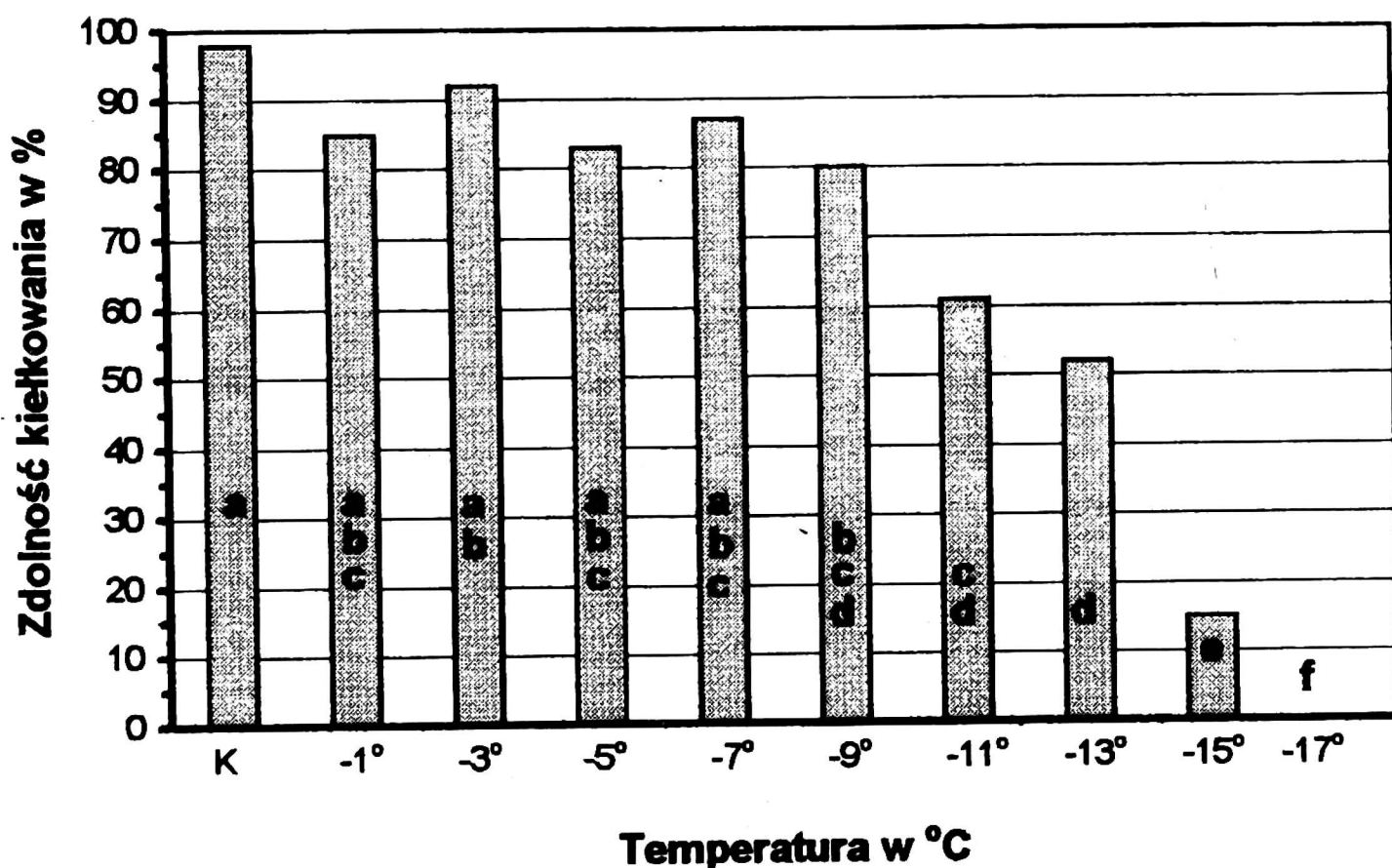
RYC. 2. *Quercus robur* L. Przebieg kiełkowania i wschodzenia w 25°C żołądzi uprzednio zamrożonych do -1, -3, -5, -7, -9, -11, -13, -15 i -17°C, a następnie odmrażanych w 25°C

Wyniki

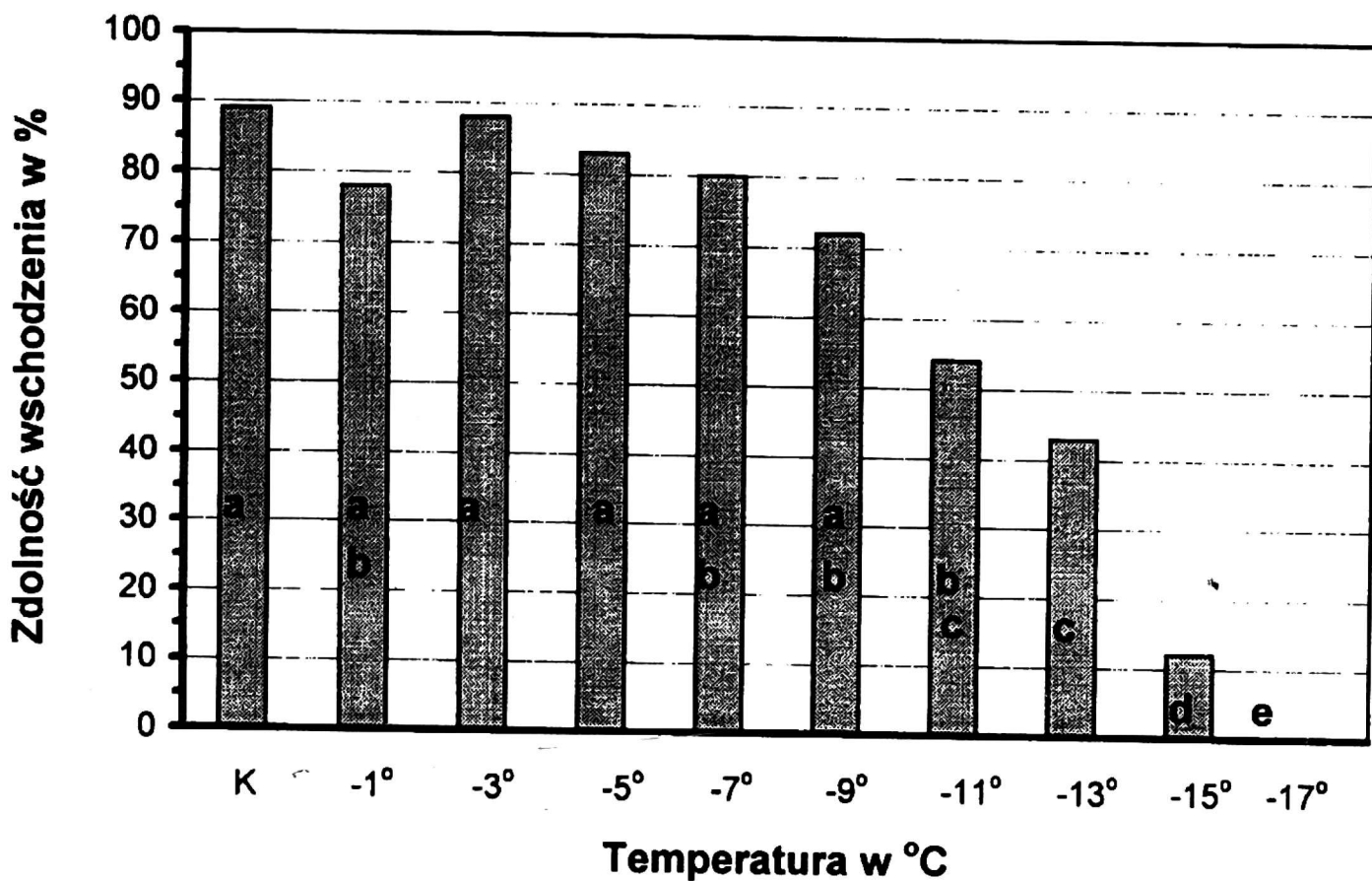
W żołądźkach zamrażanych do -1 , -3 , -5 i -7°C nie obserwowano krystalizacji lodu - brak egzotermii (ryc. 1). Podczas zamrażania do temperatury -9 , -11 , -13 , -15 i -17°C początek egzotermii stwierdzano zawsze wtedy, gdy temperatura w komorze (również i żołądźki w których umieszczona była termopara), osiągała $-10\pm 2^{\circ}\text{C}$ (ryc. 1). Mierzona w tym samym czasie maksymalna różnica między temperaturą w komorze a temperaturą wewnątrz żołądźki wynosiła 4°C . Obserwowane różnice w czasie dotyczące początku krystalizacji lodu, zachodzące pomiędzy żołądźkami w danym wariantcie mrożenia (max. do 5 minut) wynikały z niewielkich różnic wielkości i masy badanych żołądźki.

Zdolność oraz energia kiełkowania żołądźki mrożonych w -1 , -3 , -5 , -7°C (ryc. 2) nie różniła się istotnie od zdolności kiełkowania żołądźki niemrożonych (kontrola). Można zauważyć też, że zdolność kiełkowania żołądźki zamrożonych do -7 i -11°C nie różniła się istotnie (ryc. 3 i 4), natomiast istotne różnice w zdolności kiełkowania wystąpiły po zamrożeniu żołądźki do -7 i -13°C . Wszystkie korzenie zarodkowe żołądźki zamrożonych do temperatury -17°C były martwe.

W porównaniu z żołądźkami nie mrożonymi (kontrola) zdolność wschodzenia żołądźki zamrożonych do -1 , -3 , -5 , -7 , -9°C nie różniła się istotnie (ryc. 4). Świadczy to o wysokiej odporności na mróz zarówno stożka wzrostu pędu (plumuli) jak i korzenia zarodkowego: korzenia do -7°C , a plumuli nawet do -9°C . Zdolność wschodzenia żołądźki zamrożonych do -7 i -11°C nie różniła się istotnie. Różnice te wystąpiły natomiast między zdolnością



RYC. 3. *Quercus robur* L. Zdolność kiełkowania w 25°C żołądźki nie mrożonych (K) i żołądźki zamrażanych do -1 , -3 , -5 , -7 , -9 , -11 , -13 , -15 i -17°C ; wartości procentowe oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$ (test Tukey'a)



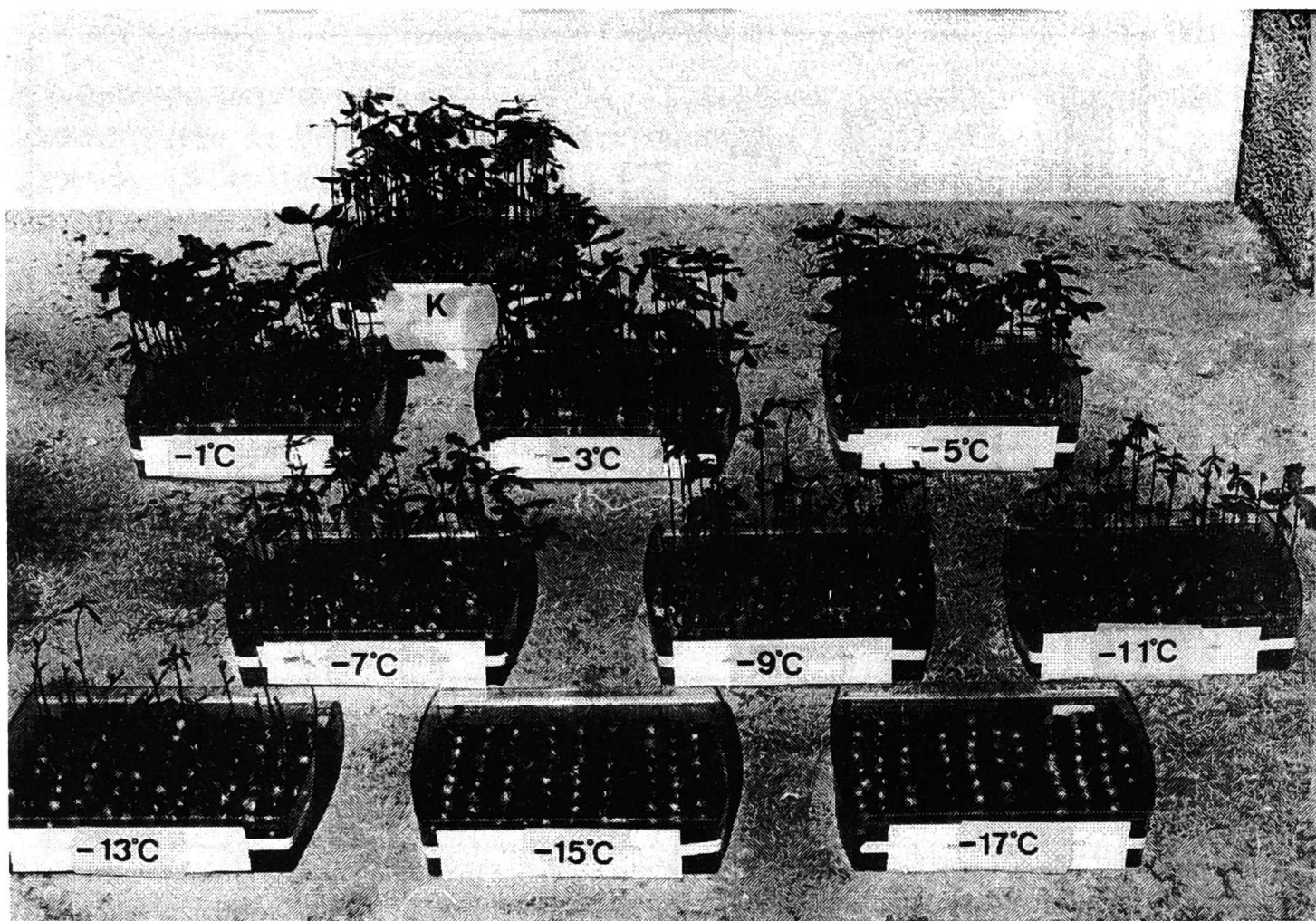
RYC. 4. *Quercus robur* L. Zdolność wschodzenia w 25°C (pojawianie się pędów) żołądzi nie mrożonych (K) i żołądzi zamrażanych kolejno do -1, -3, -5, -7, -9, -11, -13, -15 i -17°C, wartości procentowe oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$ (test Tukey'a)

wschodzenia żołądzi zamrożonych od -7 do -13°C. Po czterotygodniowej próbie wschodzenia przeprowadzonej po mrożeniu w temperaturze -17°C korzenie i stożki wzrostu pędu były martwe, a liścienie przybrały kolor ciemnobrązowy, co świadczyło o całkowitym zaniku żywotności wszystkich nasion.

W próbie kontrolnej i po zamrożeniu do -1, -3, -5, -7, -9, -11 i -13°C średni czas kiełkowania mieścił się w granicach od 3 do 4 dni, a średni czas pojawiania się pędów od 15 do 17 dni. Dla próby mrożonej do -15°C średni czas kiełkowania wynosił 7 dni, a średni czas pojawiania się pędów — 19 dni.

Dyskusja i wnioski

Wysoki poziom zdolności kiełkowania i wschodzenia nasion w próbie kontrolnej (ryc. 3, 4) w porównaniu z o wiele niższym poziomem kiełkowania i wschodzenia po przemrożeniu do temperatury -3, -5°C, a szczególnie do -1°C, był spowodowany pobieraniem do próby kontrolnej tylko żołądzi zdrowych, a do prób mrożenia — żołądzi nieselekcjonowanych. Próbkę żołądzi poddanych mrożeniu zawierały średnio po 7% nasion zepsutych. W próbie kontrolnej zdrowotność żołądzi można było ocenić podczas ich przekrawania przed próbą kiełkowania i wschodzenia. Mrożenie nasion z nienaruszoną okrywą nasienną uniemożliwiało dokonanie oceny ich zdrowotności przed zamrażaniem, dlatego też udział żołądzi zepsutych w próbie kontrolnej nie przekraczał 1%, a w wariantach z mrożeniem był większy i dochodził do 7% (-3°C) lub 9% (-5°C). W próbach kiełkowania i wschodzenia po mrożeniu



RYC. 5. *Quercus robur* L. Siewki z żołądźmi nie mrożonych (K) i z żołądźmi zamrażanych do temperatury -1, -3, -5, -7, -9, -11, -13, -15 i -17°C, siewki po 28 dniach — warianty: K, -1, -3, -5°C; po 23 dniach - warianty -7, -9, -11°C, po 20 dniach — warianty -13, -15, -17°C (Fot. E. Szubert)

do -1°C udział żołądźmi z ciemnymi liścieniami był największy, bo 12%. Tylko tak można wytłumaczyć niższy poziom kiełkowania i wschodzenia tych żołądźmi (ryc. 3, 4) w porównaniu z kontrolnymi i zamrażanymi do temperatury -3 i -5°C. Wiadomo bowiem, że w tych temperaturach ujemnych wiele z nich zachowuje żywotność nawet przez kilka lat [4, 6].

Według Pravdina i Filimonowej [4] żołądźmi dębu szypułkowego przechowywane przy wilgotności 42% ginęły w temperaturze -10°C. W świetle przytoczonych tu badań temperatura -10°C, oddziałująca na żołądźmi przez 15 minut, zapewniała przeżycie 60% nasion. Wynika z tego, że długość okresu mrożenia jest czynnikiem decydującym o przeżywalności żołądźmi. Czynnikiem czasu wydaje się być szczególnie ważny dla temperatury krytycznej, przy której żołądźmi zaczynają tracić żywotność. Schönborn [5] określa temperaturę -10°C jako tę, poniżej której następował szybki spadek żywotności żołądźmi o wilgotności 44–27%. Wyniki naszych badań wskazywałyby na temperaturę o 1–2°C niższą jako zabójczą dla żołądźmi jeszcze nie kiełkujących o wilgotności 42%.

Tematem dalszych badań powinno być określenie temperatury utraty żywotności żołądźmi (nie kiełkujących) po różnych okresach przechowywania w temperaturach ujemnych, przy innym poziomie uwodnienia liścieni, a także żołądźmi już skielkowanych. Inny skład

chemiczny oraz wyższa wilgotność osi zarodkowych w porównaniu z liścieniami sugeruje, aby zbadać też temperaturę krystalizacji lodu w samych osiach zarodkowych na żołądździach tego samego drzewa, w różnych latach zbioru.

Z Zakładu Biologii Nasion
Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku

Literatura

1. **Holmes G. D., Buszewicz G.**, 1956. Longevity of acorns with several storage methods. Rep. For. Res. For. Comm., London 1954/56: 88–94.
2. **Kartha K. K.**, 1985. Cryopreservation of Plant Cells and Organs, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
3. **Ogniewskij W. W., Braude I. D., D'jaćenko A. E.**, i drugije, 1949. Liesnye kul'tury, M.-L.
4. **Pravdin L., Filimonowa V. D.**, 1952. Vlijanie niskich temperatur na žiznesposobnost' želudej. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 85 (4): 921–924.
5. **Schönborn A.**, 1964. Die Aufbewahrung des Saatgutes der Waldbäume. BLV München.
6. **Suszka B., Tylkowski T.**, 1980. Storage of acorns of English oak (*Quercus robur* L.) over 1-5 winters. Arb. Kórnickie 1980, 25: 199–230.

Summary

Frost resistance of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) acorn with 42% humidity

The goal of the work consisted in defining the temperature critical for the survival of acorn when frozen to -17°C .

Acorn freezing was carried out using a computer program permitting to freeze live material in strictly controlled and repeatable conditions. The temperature was measured in a freezing chamber and on the side (using thermopairs) of two frozen acorns. The viability of frozen acorn was defined through sprouting and growing (stem growth) tests on halfcut (containing germ axis) seed-leaves pushed downward into substrate at 25°C .

The ability of acorn to sprout and to grow, if frozen to -1 , -3 , -5 , and -7°C did not differ significantly from the control sample (without freezing). The sprouting ability in acorn frozen to -7°C and -11°C did not differ significantly to each other. That difference was significant at freezing to -7 and -13°C . After freezing to -17°C all acorn died. The critical temperature for mass dying at 42–43% humidity is placed within the temperature interval from -10°C to -12°C .

A comparison of our study results with those published earlier by other authors proved a decisive importance of the duration of freezing (minus temperatures) on the viability of acorn, especially those that are frozen within the range of critical temperatures.