

**BP**  
2/2008

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra botaniky



Bakalářská práce

**Odolnost temperátních rostlin vůči  
nízkým teplotám**

Resistance of temperate plants  
to low temperatures

Michal Daněk

2008

školitel: RNDr. Petr Sklenář, Ph.D.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	4
<b>ČÁST PRVNÍ: LITERÁRNÍ REŠERŠE</b> .....	5
1. Rostliny a nízké teploty na Zemi .....	5
2. Teplotní a radiační bilance rostliny na stanovišti .....	5
3. Klasifikace rostlin podle vztahu k nízkým teplotám.....	7
1. Rostliny citlivé na chlad.....	7
2. Rostliny citlivé na mráz. ....	8
3. Rostliny odolné vůči mrazu. ....	8
4. Fyziologie poškození rostlin nízkými teplotami.....	8
1. Poškození chladem .....	8
Vliv na membrány a proteiny .....	9
Vliv na fotosyntézu.....	9
Vliv na respiraci.....	10
2. Poškození mrazem .....	11
Led intracelulární.....	11
Led extracelulární .....	11
5. Mechanismy odolnosti.....	14
Rozpoznání nízkých teplot.....	15
Odolnost k chladu .....	16
Odolnost k mrazu.....	17
Mechanismy avoidance.....	17
1. Mechanismy zmírňující mráz. ....	18
2. Podchlazení.....	18
Mechanismy tolerance .....	20

6. Možnosti růstu rostlin v období nízkých teplot .....	22
7. Aklimace .....	23
8. Rytmicita.....	24
9. Evoluce odolnosti k nízkým teplotám .....	26
10. Rozšíření rostlin s různými mechanismy odolnosti .....	26
<b>ČÁST DRUHÁ .....</b>	<b>28</b>
1. Metodika .....	28
Zjišťování počátku nukleace .....	28
Zjišťování poškození .....	29
2. Zaměření následné diplomové práce .....	31
<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>32</b>

**Abstrakt:** Nízké teploty jsou na Zemi velmi rozšířeným jevem. Rostliny, jakožto sesilní organismy, jsou jejich účinkům přímo vystaveny. Liší se působení teplot nadnulových (chlad) a podnulových (mráz). V průběhu evoluce se u rostlin vyvinuly rozličné mechanismy, jak se s působením nízkých teplot vypořádat. Tyto mechanismy jsou dvojího typu – avoidance a tolerance. Využití těchto typů odráží původ rostliny. Rostliny mohou být na nízké teploty aklimatizovány, díky čemuž dosahují vyšší úrovně odolnosti. U temperátních rostlin je proces aklimace úzce spjat s jinými biorytmy a je ponejvíce řízen fotoperiodou. Odolnost rostlin k nízkým teplotám při svém vzniku těsně souvisela s odolností k suchu.

**Klíčová slova:** aklimace, chlad, mráz, odolnost k nízkým teplotám, poškození, stres, temperátní rostliny

**Abstract:** Low temperatures are a wide-spread phenomenon on Earth. Plants, being sessile organisms, are directly exposed to their effects. There is a difference between the impacts of supra-zero (chill) and sub-zero (frost) temperatures. During the evolution various mechanisms were developed in plants to cope with the influences of low temperatures. There are two types of the mechanisms – avoidance and tolerance. The use of these mechanisms reflects the origin of plants. Plants can be acclimated (hardened) to low temperatures and thus they can reach a higher level of resistance. In temperate plants, the course of hardening is tightly linked to other biorhythms and it is controlled mainly by photoperiod. The resistance of plants to low temperatures was closely connected with the resistance to drought by its rise.

**Key words:** acclimation, cold, frost, injury, low temperature resistance, stress, temperate plants

# ÚVOD

Předkládaná bakalářská práce shrnuje poznatky týkající se odolnosti rostlin k nízkým teplotám. Jejím hlavním cílem je získání dostatečného teoretického základu pro vypracování práce diplomové.

První část je literární rešerší na dané téma, v části druhé se zabývám metodickými postupy, které jsem již zkušebně prováděl.

## Poděkování

Děkuji svému školiteli RNDr. Petru Sklenářovi Ph.D. za vedení a usměrňování práce, za pomoc při získávání literatury i za praktickou pomoc v laboratoři i terénu.

Velký dík patří rovněž RNDr. Andree Kučerové z BÚ AV v Třeboni za podnětné rady, literaturu a velikou ochotu projevenou při mém seznamování se s lokalitami. Též jí děkuji za zajištění praktického zázemí v Třeboni.

# ČÁST PRVNÍ: LITERÁRNÍ REŠERŠE

## 1. Rostliny a nízké teploty na Zemi

Rostliny jsou organismy poikilothermické – teplota jejich těla je podmíněna teplotou okolního prostředí. Jsou ovšem schopné svou teplotu částečně regulovat (v obou směrech).

Suchozemské cévnaté rostliny jsou dále eurythermní, způsobilé přežívat široké rozpětí teplot. Rostliny poikilohydrické (některé řasy, mechy, z cévnatých rostlin některé kapradiny, z ojedinelých zástupců krytosemenných např. *Ramonda myconi*, *Myrothamnus flabellifolia*), rovněž suchá semena, pylová zrna a spory jsou schopné přežít veškeré teploty vyskytující se na Zemi.

Pouze pod vodou a hlouběji v půdě teploty kolísají v průběhu dne v úzkém rozmezí. V blízkosti zemského povrchu dochází k denním změnám, které mohou být i letální.

Nejnižší teploty se vyskytují v centrální Antarktidě (kolem  $-90^{\circ}\text{C}$ ), v Grónsku a východní Sibiři (až  $-68^{\circ}\text{C}$ ). Na 64% zemského povrchu je průměrná roční minimální teplota nižší než  $0^{\circ}\text{C}$ , na 48% povrchu nižší než  $-10^{\circ}\text{C}$ , na 35% nižší než  $-20^{\circ}\text{C}$  a na 25% nižší než  $-40^{\circ}\text{C}$ . Jen na  $\frac{1}{4}$  zemského povrchu se tak podnulové teploty vůbec nevyskytují, tzn. rostliny nejsou nikdy vystaveny mrazu. Teploty pod  $15^{\circ}\text{C}$  (tedy chlad) se neobjevují pouze v nížinných oblastech Amazonské pánve, Konžské pánve a jihovýchodní Asie – celkem 6,6% zemského povrchu (Sakai et Larcher, 1987).

Výskyt nízkých teplot narůstá se zeměpisnou šířkou, nadmořskou výškou a vzdáleností od moře.

## 2. Teplotní a radiační bilance rostliny na stanovišti

Teplota rostliny je ponejvíce ovlivňována radiací. Zbývající dva způsoby tepelné výměny (tj. kondukce a konvekce) se rovněž uplatňují, ale spíše ve specifických případech (o kterých bude hovořeno níže). Naproti tomu radiační výměna probíhá po celých 24 hodin. Rostlina absorbuje záření viditelné, ultrafialové a infračervené. UV i viditelné světlo je

schopna degradovat na energii tepelnou (zejména při nadměrných dávkách záření, např. prostřednictvím xantofylového cyklu). Rovněž je někdy schopna produkovat teplo biochemickou cestou (alternativní oxidáza). Do okolí vyzařují rostliny některé složky spektra viditelného (hlavně v zelené a červené oblasti – důsledek excitací a deexcitací pigmentů) a jako každé těleso s nenulovou absolutní teplotou také IR.

Ve dne výrazně převažuje příjem viditelného záření – teplota rostliny se postupně zvyšuje – často o několik (8-10) stupňů převyšuje teplotu okolního vzduchu. Toto je nejvýraznější u dužnatých plodů, sukulentních částí rostlin a kmenů stromů, jejichž teplota tak může být až o 15 K vyšší než teplota okolní (Sakai et Larcher, 1987). Přizemní, růžicovité a polštářovité formy se zahřívají více než rostliny vzpřímené. O poměru pohlceného a odraženého množství záření rozhoduje úhel, pod nímž paprsky na povrch dopadají, tedy výška slunce nad obzorem.

V noci naopak rostlina teplo ztrácí, hlavně výdejem IR do chladnějšího prostředí. Za klidné, jasné noci je povrch rostliny o 1-3 K chladnější než okolní vzduch. I v noci ale mohou rostliny určité množství tepla ze svého okolí získat, např. když na chladnějším rostlinném povrchu kondenzuje vodní pára, čímž se uvolňuje latentní teplo, nebo vedením tepla z půdy.

Pro 24 hodinovou tepelnou bilanci rostliny je tedy rozhodující poměr délky dne a noci.

V těsné blízkosti povrchu rostliny se nalézá tzv. hraniční vrstva, nehybný vzduch, jehož teplota je vyšší než teplota vzduchu okolního. Hraniční vrstva velice snižuje možnost tepelné výměny kondukcí nebo konvencí mezi povrchem rostliny a jejím okolím. Odpor kladený hraniční vrstvou vzrůstá s její zvyšující se mocností. Ta závisí na velikosti plochy listu a jeho spojitosti – je tenčí, čím je list menší a členitější, je snižována větrem.

Nachází-li se rostlina v porostu, je vystavena poměrně mírnějším klimatickým oscilacím, než když roste osamoceně. V porostu totiž rostliny ve vyšší míře ovlivňují mikroklima dané abiotickým prostředím. Toto porostní mikroklima se nazývá bioklimatem. Bioklima je rostlinami spoluvytvářeno tím větší měrou, čím početnější a propojenější rostlinstvo je. Husté zapojené porosty mají tudíž bioklima nejvyrovnanější.

Zapojený porost se svým okolím komunikuje zejména přes tzv. aktivní vrstvu, která přiléhá k povrchu porostu. V této vrstvě se značná část příchozího záření mění v teplo, takže zde s velkou intenzitou probíhá evapotranspirace. Dochází zde tak k největším teplotním fluktuacím, aktivní vrstva je ve dne o několik stupňů teplejší a v noci o několik stupňů chladnější než interiér porostu. Uvnitř porostu jsou vertikální teplotní (ale i vlhkostní, světelné, koncentrace CO<sub>2</sub>) gradienty, jejichž směr se mění s přechodem den/noc. Uvnitř porostu se část tepelné energie ve dne mění v teplo latentní (díky evapotranspiraci), v noci

naproti tomu dochází k intercepci a kondenzaci vodní páry, při nichž se toto teplo opět uvolňuje.

Stabilizační a pufrací schopnosti z hlediska teploty má rovněž půda. Ve dne se při povrchu zahřívá (míra zahřívání závisí na vlastnostech půdy), teplo je odváděno do spodnějších vrstev. Tepelná vodivost půdy je závislá zejména na její vlhkosti a provzdušnění. Vlhké a utažené půdy vedou teplo lépe. V noci je naopak teplo vedeno k ochlazujícímu se půdnímu povrchu, odkud je vyzařováno do okolí, případně může být pohlcováno rostlinami.

### 3. Klasifikace rostlin podle vztahu k nízkým teplotám

Stupeň odolnosti rostlin k nízkým teplotám odráží jejich geografické rozšíření, tj. výskyt, případně absenci těchto teplot v jejich původním přirozeném prostředí. V rámci jednoho druhu se vyskytuje mezipopulační variabilita, která může dávat vznik různě tepelně odolným ekotypům. Taková rozrůzněnost zvyšuje potenciál druhu k přežití podmínek extrémních, neobvyklých mrazů. Přítomnost různých ekotypů je typická u druhů s rozsáhlým areálem zasahujícím různé zeměpisné šířky. Např. u *Arabidopsis thaliana* koreluje odolnost k podnulovým teplotám se zeměpisnou šířkou, z níž tyto rostliny pocházejí (Zhen at Ungerer, 2007).

Nejnižší teplota, při níž ještě nedochází k poškození rostliny, se označuje  $LT_0$ , naopak nejvyšší teplota, při které již odumírají všechny vzorky nebo je dosaženo poškození maximálního, je  $LT_{100}$ . Pro srovnání odolnosti se nejčastěji užívá hodnota  $LT_{50}$ , tedy teplota, při níž odumírá právě  $\frac{1}{2}$  počtu rostlin nebo nastává 50% poškození.

Podle odolnosti k nízkým teplotám lze rostliny dělit na:

#### 1. Rostliny citlivé na chlad

Jsou poškozovány i nemrazovými teplotami, obvykle nižšími než  $10^{\circ}\text{C}$ . Některé druhy (cukrová třtina) nebo i vývojová stádia (rýže v květu) však nesnášejí ani teploty pod  $15^{\circ}\text{C}$ . Případně nemusí být chladem poškozena celá rostlina, ale jen její části (např. kvetoucí pšenice při teplotách nižších než  $3^{\circ}\text{C}$  zastavuje vývoj pylu v prašnicích). Různé části rostlin bývají různě citlivé. O dopadu chladu na rostlinu rozhoduje zároveň i doba expozice - např.



listy okurky vydrží bez poškození při 10°C týden, při 8°C tři dny a při 5°C jen několik hodin (Levitt, 1980).

Rostliny citlivé na chlad patří ponejvíce mezi druhy tropické a subtropické. Patří sem některé významné plodiny jako rýže, kukuřice, sója, rajče nebo bavlník.

## **2. Rostliny citlivé na mráz**

Tyto rostliny postrádají toleranci k mrazu, uplatňují pouze mechanismy avoidance (viz níže). Vyskytují se obvykle na místech, kde se mráz objevuje jen na několik hodin denně, i když třeba po celý rok (typicky na tropických horách). Opět mohou být citlivé nejen celé rostliny, ale pouze některá pletiva (např. buňky dřevního parenchymu dřevin mírného pásma).

Vedle druhů tropických a subtropických sem patří i některé druhy teplých temperátních oblastí.

## **3. Rostliny odolné vůči mrazu**

Vykazují toleranci k mrazu. Jde zejména o dřeviny a byliny mírného a polárního pásu. Patří mezi ně nejodolnější druhy – hlavně dřeviny boreální tajgy a vysokohorské a arktické byliny, z nichž některé jsou schopny (v experimentálních podmínkách) přežít bez poškození i ponoření do kapalného dusíku (-196°C) nebo vodíku (-250°C) (Levitt, 1980).

## **4. Fyziologie poškození rostlin nízkými teplotami**

### **1. Poškození chladem**

Nízká teplota zasahuje nejdříve membrány. Ty mohou u neaklimatizovaných rostlin při vystavení nízkým teplotám (chladový šok) přecházet z fáze tekutého krystalu do fáze gelu. V tomto ohledu jsou nejcitlivější thylakoidní membrány chloroplastů a plasmalema (Smallwood et Bowles, 2002) Změny v membráně pak ovlivňují proteiny s membránami asociované, mezi něž patří i klíčové enzymy energetického metabolismu. Prvními příznaky chladového šoku tak bývají zejména zastavení proudění cytoplasmy (přímo závislé na dostatečném poolu NTP), snížení intenzity fotosyntézy a naopak zvýšení respirace, kterým se

rostlina snaží navýšit v buňce obsah dostupné energie, z níž jsou hrazena opatření směřující k nápravě poškození a přežití rostliny (Levitt, 1980).

Nízká teplota má rovněž vliv na aktivitu a sekundární strukturu enzymů, včetně těch podílejících se na genové expresi, a na stabilitu nukleových kyselin.

### **Vliv na membrány a proteiny**

Fázový přechod membrány způsobuje její pravidelnější uspořádání a kontrakci, kvůli čemuž se mění její propustnost. Dochází k masivnímu vylití iontů (zejména  $K^+$ ) z buněk. Otvírání a zavírání iontových kanálů souvisí se stavem membrány. Iontové kanály však pravděpodobně nereagují přímo na nějakou teplotu, ale spíše na rychlost změny teploty (Smallwood et Bowles, 2002).

Kontrahovaná membrána je méně permeabilní pro malé molekuly, až o  $\frac{1}{3}$  klesá propustnost pro vodu. Dochází ke zhoršení absorpční funkce kořenů, a tím k dehydrataci.

Fázový přechod nemusí proběhnout v celé plasmalemě najednou. To je dáno přítomností různých funkčních okrsků membrány, které se liší složením (např. lipidové rafty s vyšším zastoupením delších a nasycených mastných kyselin jsou méně fluidní). Při takové nerovnoměrné kontrakci může pak docházet v membráně ke zlomům, které se nemohou zacelit, pokud membrána setrvává ve fázi gelu. Výskyt zlomů může být dále zvyšován vlivem dehydratace. Vytváření zlomů je velmi pravděpodobné zejména v místech integrálních proteinů. Vlivem chladu a dehydratace dochází k zeslabování hydrofobních interakcí mezi molekulami proteinů a lipidů, takže je zde membrána vázána k lipidům méně pevně.

### **Vliv na fotosyntézu**

Na chlad jsou velmi citlivé fotosyntetické struktury. Vlivem nízkých teplot dochází k inhibici komplexu rozkládajícího vodu (OEC), separaci pigmentproteinových komplexů a snížení aktivity enzymů fotochemické i syntetické části fotosyntézy. Např. u *Pinus sylvatica* v zimě je asimilace  $CO_2$  téměř nulová (Ensminger, 2007).

Pokud se společně s nízkou teplotou vyskytuje vysoká ozáření (např. alpské rostliny), dochází k poškození fotosyntetického aparátu světlem – fotoinhibici. Je zapříčiněna tím, že při nízké teplotě enzymy zajišťující přeměnu světelné energie absorbované fotosyntetickými pigmenty nepřevádějí tuto energii dostatečně rychle v energii chemickou. Může tak docházet k oxidaci fotosystémů (hlavně PS II, který si doplňuje elektrony z fotolýzy

vody – OEC je nízkou teplotou inhibován). Vlivem fotooxidace mohou v buňce vznikat nebezpečné ROS (reaktivní formy kyslíku).

V reakci na chlad se mění poměr využití zachycené světelné energie. Ta může být buď zpracována fotochemickými reakcemi, přeměněna na teplo (xantofylový cyklus) nebo zpětně emitována deexcitací pigmentů (fluorescence).

V listech zdravých rostlin je za optimálních stabilních podmínek asi 80% absorbovaného světla využito ve fotochemických reakcích, 15% disipováno jako teplo a jen kolem 5% emitováno fluorescence. Fluorescence probíhá z velké většiny na PS II, které mají rozsáhlý světlosběrný systém s velkým množstvím molekul chlorofylu a (Ducruet, 2006).

Fluorescence je minimální ( $F_0$ ) u listů adaptovaných na tmou. Ve tmě jsou všechna místa  $Q_A$  fotosystému II v oxidovaném stavu, tím pádem mohou přijímat elektrony (uvolňované z excitovaného chlorofylu) a převádět maximum absorbované energie do fotochemických reakcí.

Naopak při saturaci světlem dochází k vysycení všech  $Q_A$  míst (tedy jejich redukci) a energie absorbovaná nad tuto kapacitu musí být odváděna jinak, fluorescence je za daných podmínek maximální ( $F_M$ ). Rychlost reoxidace  $Q_A$  míst je tedy klíčová. Rozdíl  $F_M$  a  $F_0$  je maximální výtěžek variabilní fluorescence  $F_V$ .

Poměr  $F_V/F_M$  tak poskytuje informaci, kolik z maximální možné fluorescence je realizováno emisí aktuální, tedy nepřímo i do jaké míry je vysycena kapacita fotosyntetických pochodů. Fluorescence je nejvyšší kolem teploty fázového přechodu thylakoidní membrány (Ducruet, 2007).

## **Vliv na respiraci**

Respirace se během poškození nejen zvyšuje ve své intenzitě, ale také se mění poměr mezi respirací aerobní a anaerobní. Anaerobní průběh začíná převládat. (Naproti tomu u rostlin k chladu resistantních nebo otužilých se při nízkých teplotách uplatňuje rostoucí měrou pentosofosfátová dráha) (Guy, 2003).

V důsledku nedostatku ATP a poklesu aktivity enzymů významně převažují katabolické reakce nad anabolickými. Dochází k amylolyze, štěpení bílkovin, které jsou v nedostatečné míře resyntetizovány. Na grafu závislosti rychlosti enzymatické reakce na teplotě se u na chlad citlivých rostlin objevuje výrazný zlom. Za tímto zlomem klesá rychlost se snižující se teplotou rychleji než před ním. Stoupá aktivační energie enzymů. Může docházet i k chladové denaturaci proteinů, kdy zeslabení hydrofobních interakcí

v sekundárních a vyšších strukturách proteinu končí změnou konformace proteinu (Levitt, 1980).

V závěrečné fázi těchto procesů rostlina umírá na „vyhladovění“.

## **2. Poškození mrazem**

Působení mrazu vyvolává poškození jednak nízkými teplotami, za druhé jevy spojenými s tvorbou a přítomností ledu v rostlinném těle.

Účinky nízkých teplot jsou podobné jako u chladu, tedy hlavně vliv na membrány a enzymovou aktivitu.

Led může být v rostlinách lokalizován dvojím způsobem:

### **Led intracelulární**

Tvorba ledu uvnitř buňky je vždy letální. Zřejmě dochází k mechanickému poškození buněčných struktur ledovými krystaly. Pouze v experimentálních podmínkách byla pozorována tvorba submikroskopických ledových krystalků v cytoplasmě (při pseudovitrifikaci, viz níže), která nezpůsobila poškození buňky (Levitt, 1980).

Intracelulární led se v přírodních podmínkách vytváří zřídka. Buď při prudkém ochlazení buněk nebo spontánní nukleaci podchlazeného obsahu buněk. K prvnímu případu dochází údajně (nikdy to nebylo zcela potvrzeno) u dřevin při jevu nazývaném „sunscald“: je-li v zimě slunečné počasí, pak na ozářené straně stromu stoupá teplota rostliny – větví, kmene – o několik desítek stupňů nad teplotu vzduchu. Pokud je však slunce náhle zastíněno oblačností nebo jinou překážkou, poklesne teplota rostliny velice prudce, což může vést až k tvorbě ledu uvnitř buněk. Rychlost poklesu se uvádí několik (6-8) stupňů za minutu (Levitt, 1980).

### **Led extracelulární**

Tvoří se v apoplastu. Jeho vznik přináší rostlině celou řadu stresových důsledků.

Led začíná krystalizovat na nukleačních centrech. Může jít o některé makromolekuly, strukturální motivy povrchů, prachové částice apod. Bakterie *Erwinia hubicola* a *Pseudomonas syringae* produkují látky, které rovněž působí jako nukleátory.

Nukleace může být homogenní, kdy se v kapalině tvoří nukleační centra spontánně (každá kapalina je charakteristická určitou teplotou, při níž u ní dochází k homogenní

nukleaci – voda: 235 K). K heterogenní nukleaci dochází v kapalině na nukleačních centrech nevzniklých v této kapalině.

Začátek nukleace se manifestuje jako náhlé zvýšení teploty (při fázovém přechodu se uvolní skupenské teplo tuhnutí) – exoterma.

Části rostlin mohou promrzat kontinuálně – jde především o pletiva s jednotnou strukturou, např. jen jediným buněčným typem. Když zde nukleace započne, šíří se všesměrně a rovnoměrně celým pletivem. Exoterma je jediná, s širokým peakem.

Sekvenčně promrzají např. orgány s vodivými pletivy. Nukleace začíná právě ve vodivých (xylémových) elementech a šíří se podél nich do okolních pletiv. Roztok v tracheách a tracheidách má z roztoků v rostlině nejvyšší hodnotu bodu tuhnutí. V tomto případě se objevuje exoterem několik.

Diskontinuální promrzání se projevuje na úrovni celých velkých částí rostlin (větve), obsahujících množství různě uspořádaných buněčných typů. Jednotlivá pletiva se v teplotě promrzání i výrazně liší, nukleace na sebe bezprostředně nenavazuje.

Led působí na rostlinu jednak termodynamicky, jednak mechanicky.

Termodynamické působení spočívá v tom, že nad povrchem ledu je tenze vodní páry nižší než nad povrchem roztoku v buňce, v důsledku čehož dochází k difúzi vodní páry přes plasmatickou membránu z buňky na led. Toto probíhá do ustanovení rovnováhy.

Přímé poškození mrazem se vyskytuje zejména u buněk velkých a s velkým obsahem vody, kdy je rozdíl vodního potenciálu cytoplasmy a ledu tak vysoký, že dochází k poruše permeability membrány až vylití buněčného obsahu.

K mrazu tolerantní buňky jsou tvorbou ledu dehydratovány, protoplast může v důsledku ztráty vody zmenšit svůj objem až o  $1/3$ . Vodní poměry v buňce během dehydratace popisuje vztah podle Gusta et al. (1975):

$$L_T = L_0 * \Delta T_m / T + K,$$

kde  $L_0$  je původní obsah vody v buňce,  $L_T$  obsah vody v buňce při teplotě  $T$  (tedy po dehydrataci),  $\Delta T_m$  pokles bodu tuhnutí buněčné šťávy a  $K$  obsah vázané, tedy nezmrznutelné vody. Poškození při mrazu je tedy vyvoláno zejména sekundárně – dehydratací.

Dehydratace způsobuje vzestup koncentrace solutů v buněčné šťávě. Vysoké koncentrace zejména iontů (anorganických kationtů a aniontů organických kyselin) mohou působit toxicky, případně ovlivňovat vlastnosti membrán a konformaci proteinů.

Nejmarkantnější je opět dopad na membrány. Ty mohou v důsledku dehydratace a nízké teploty přecházet do hexagonální II fáze, v níž pozbývají lamelární struktury. To samozřejmě ovlivňuje strukturu membránových proteinů. Dochází až ke ztrátě některých proteinů z membrány. Při zmrazení na poškozující teploty byly u buněk takto zasažených rostlin nalezeny oblasti membrán zcela prosté proteinů. Předpokládá se, že takovéto poškození je neobnovitelné (Sakai et Larcher, 1987).

Zmenšení objemu buňky sleduje plasmalema rovněž změnou velikosti. U neaklimatizovaných buněk dochází k endocytické vesikulaci, která je ireversibilní (Smallwood et Bowles, 2002). Při zvýšení teploty, tání a rehydrataci protoplastu není membrána schopna kompenzovat narůstající objem buňky a dochází k lýze.

V aklimatizovaných rostlinách naopak převládá exocytická extruze reversibilní v hypotonickém roztoku. Aklimatizované buňky tak mohou při oteplení úspěšně obnovit turgor (Smallwood et Bowles, 2002).

Rovněž u aklimatizovaných buněk vznikají tzv. „fracture jump lesion“. Ty však již mají charakter poškození. Jde o propojení cytoplasmatické membrány s membránami vnitrobuněčnými (např. endoplasmatické retikulum, organely). Předpokládá se, že vznikají provázáním lipidových molekul různých membrán, když jsou tyto membrány v hexagonální II fázi (Guy, 2003).

Možností, jak (alespoň částečně) zachovat původní velikost cytoplasmatické membrány, může být častější propojení plasmalemy s buněčnou stěnou (integrální membránové proteiny se vážou na proteiny buněčné stěny). Při zmenšení objemu protoplastu pak tvoří část membrány Hechtova vlákna.

Při letálních teplotách se nevratně mění složení membrán. Aktivitou fosfolipázy D dochází ke štěpení fosfatidylcholinu, čímž v membráně vzrůstá zastoupení kyseliny fosfatidové (Sakai et Larcher, 1987).

Mechanické působení ledu má původ v objemových změnách – intercelulární prostory se zaplňují ledem a tím se zvětšují, zatímco protoplasty a celá pletiva se v důsledku dehydratace smršťují. Tím často vzniká výrazné pnutí.

Na úrovni buněk dochází např. k mrazové plasmolýze, kdy vzniká led mezi plasmalemou a buněčnou stěnou. Smršťující se protoplast je obklopen ledem. Propojení membrány s buněčnou stěnou je zachováno, tvoří se Hechtova vlákna známá z „normální“ plasmolýzy (Levitt, 1980).

„Frost splitting“ známé u dřevin je dalším příkladem mechanického působení ledu. Na kmenech a větvích se při silných mrazech otvírají podélné praskliny („frost cracks“) vedoucí

od středu orgánu k borce. Na jednom kmenu může být současně několik prasklin. Při oteplení a rehydrataci se uzavírají a mohou se zacelit, při opětném mrazu se znovu rozšiřují (Guy, 2003).

Míra poškození rostlin mrazem závisí na délce expozice. Při krátkém vystavení mrazu (v řádu dnů) se poškození s časem nemění, avšak po delší době (desítky dnů) postupně vzrůstá. U plně aklimatizovaných temperátních rostlin k výraznějšímu poškození dochází až při několikaměsíční expozici mrazům v řádu desítek stupňů Celsia.

Opakované krátkodobé zmrznání a tání zvyšuje teplotu, při níž se poškození objeví.

Ke vzniku poškození zřejmě dochází při vymrzání, ve zmrzlém stavu se může poškození pravděpodobně pouze stupňovat (ale nejspíše ne vznikat). Další poškození se může vyskytnout během rehydratace při tání nebo i několik dnů po úplném roztátí (Levitt, 1980).

Čím je způsobena smrt následkem nízkých teplot (u aklimatizovaných tolerantních rostlin), není vždy zcela jasno. Někdy se na záznamu teploty objevuje druhá exoterma (značně nižší než první), která značí promrznutí protoplastu. Jiná teorie říká, že zvýšení teploty je dáno teplem uvolněným agregací proteinů denaturovaných extrémní hydratací. Příčina možná tkví v odstranění části vázané vody při nízkých teplotách. Rovněž lze předpokládat nevratné a s životem neslučitelné změny ve struktuře a složení membrán.

## 5. Mechanismy odolnosti

Rostliny se v odolnosti odlišují primárně podle svého původu. Nejodolnější jsou boreální dřeviny, nejcitlivější druhy z nížin vnitřních tropů. Různě odolné jsou ale i jednotlivé části rostliny. Značně citlivé jsou podzemní orgány. Přežití dřevin je mnohokrát určeno odolností kořenů. Naopak prýt je značně odolnější. Nejcitlivější k nízké teplotě jsou reprodukční orgány, což je dáno energetickou náročností procesů v nich probíhajících (u rostlin kvetoucích brzy na jaře bylo prokázáno zvyšování teploty rozmnožovacích orgánů díky efektu parabolického zrcadla vytvářeného květními obaly). Suchá semena ztrácejí svou vysokou odolnost při klíčení, semenáčky jsou (podobně jako v mnoha jiných ohledech) jednou z nejcitlivějších vývojových fází. Nejodolnějšími orgány bývají pupeny (hlavně axilární, apikální pupen je odolný o něco méně) a stonkové články. Z pletiv je nejodolnější kambium (Larcher).

Větévky odolných rostlin, nejdříve pomalu ochlazené na -15 až -0°C (nepoškozující teplota) a ponechané na těchto teplotách do ustavení rovnováhy mezi extracelulárním ledem a roztokem uvnitř buněk, pak přežily přímé ponoření do kapalného dusíku nebo i vodíku.

Teplotu kapalného dusíku přežívají v zimě i jehlice *Pinus strobus* ochlazované rychlostí 3°C za hodinu (Levitt).

Odolnost k nízkým teplotám je získávána v procesu aklimace (viz níže). Ta je vyvolávána vystavením rostliny nízkým nepoškozujícím teplotám, vhodné fotoperiodě, může být spouštěna i suchem. V reakci na expozici těmto podmínkám se spouštějí adaptivní mechanismy vedoucí k navození takové situace v rostlině, která jí umožní vypořádat se s nízkoteplotním stresem.

### **Rozpoznání nízkých teplot**

Aby mohly rostliny na jakýkoli stres adekvátně zareagovat, musí být nejdříve schopny jej rozpoznat a vyhodnotit.

Předpokládá se, že „tuhnutí“ membrány může spouštět expozice genů regulovaných nízkými teplotami (Chinnusamy, 2007).

Vlivem nízkých teplot dochází k nárůstu koncentrace vápenatých kationtů v cytoplasmě. Přítokové kanály pro  $Ca^{2+}$  v plasmatické membráně jsou spouštěny rychlým poklesem teploty (Smallwood at Bowles, 2002). Při chladovém stresu tak rychlost pří toku  $Ca^{2+}$  odpovídá rychlosti snižování teploty. Zvýšení koncentrace  $Ca^{2+}$  je společným mediátorem signálů o rozličném stresu, pokaždé je ale jinak vyhodnocováno. Interpretace je zřejmě závislá na různé lokalizaci, intenzitě nebo frekvenci nárůstu koncentrace. Vyšší koncentrace  $Ca^{2+}$  je nezbytná pro spuštění COR („cold regulated“) genů.

Rovněž zvýšení obsahu ABA a tvorba ROS ovlivňuje koncentraci  $Ca^{2+}$ . ROS mohou také přímo působit na proteiny citlivé na redox potenciál (transkripční faktory, proteinkinázy), které tím mění své chování (Chinnusamy, 2007).

U *Arabidopsis thaliana* je 4 až 20% genů COR. Vlivem aklimace se v rostlině mění (vesměš stoupá) 75% metabolitů (z celkem 497 zjištěných metabolitů) (Guy, 2008).

Na chlad odpovídají zejména CFBs („C-repeat binding factors“ neboli „dehydration responsive element-binding protein 1s“ = DREB1s), což je rodina transkripčních faktorů, které vážou cis-elementy v promotoru COR genů.

Jako regulátory (represory) genové exprese rovněž působí microRNA a short interfering RNA. COR geny totiž kódují vedle velkého množství transkripčních faktorů



relativně málo regulátorů transkripce (u *Arabidopsis thaliana* jen asi 7% COR genů (Chinnusamy, 2007)), tudíž je ve zvýšené míře využívána regulace pomocí miRNA a siRNA.

### **Odolnost k chladu**

Opatření směřují hlavně k ochraně membrán. Důležité je udržení membrány ve fázi tekutého krystalu, dochází tedy ke změnám vedoucím ke snížení teploty fázového přechodu membrány. V membráně se velmi zvyšuje zastoupení krátkých a nenasycených mastných kyselin. U neaklimatizovaných na chlad citlivých rostlin může naopak množství takových látek klesat (Levitt, 1980), čímž se ještě více snižuje fluidita. Změny ve složení jsou zvláště výrazné u plasmalemy a membrán semiautonomních organel a probíhají ponejvíce v nově se tvořících, vyvíjejících a nedospělých pletivech. Mezi nenasycenými mastnými kyselinami se nejvíce uplatňují kyseliny vícenasycené, tedy ty s několika dvojnými vazbami v molekule, hlavně linolová a linolenová. Dalšími látkami zvyšujícími fluiditu membrán jsou steroly, jejichž obsah v průběhu otužování rovněž vzrůstá (Smallwood et Bowles, 2002).

Desaturace mastných kyselin s sebou ovšem nese i jistá rizika. Nenasycené mastné kyseliny jsou kvůli přítomnosti dvojných vazeb náchylnější k oxidaci. Mohou tak vznikat nebezpečné a reaktivní peroxidy, z nichž se některými cestami mohou vytvářet ROS nebo mohou být oxidované mastné kyseliny ve zvýšené míře degradovány. (Sakai et Larcher, 1987). Proti oxidaci mastných kyselin působí některé enzymy, např. glutathion peroxidázy, jejichž aktivita ale může být z důvodu nízké teploty snížena, a antioxidanty (např. chinony, karotenoidy,  $\alpha$ -tokoferol, askorbát). Aby k oxidaci nedocházelo, zvyšuje se redukční charakter prostředí uvnitř buňky zvýšenou syntézou proteinů s velkým množstvím sulfhydrylových skupin (zbytky cysteinu).

Dvojí úlohu má v odolnosti proti nízkým teplotám enzym fenylalaninamoniumlyáza (PAL). Hladina PAL je při nízkých teplotách vyšší, za nízkých teplot se totiž mnohem pomaleji odbourává, než je syntetizována. PAL stojí na počátku tvorby fenylypropanoidních látek, tedy prekursorů ligninu a suberinu, které zvyšují odolnost buněčných stěn. U fotosyntetizujících buněk se navíc vlivem vysokého obsahu PAL tvoří hodně kyseliny transkořicové, jejíž estery se ukládají do vakuoly. Zde slouží jako substráty pro regeneraci vakuolární peroxidázy. Působí tedy rovněž jako obrana před účinky ROS (Adámková et al., 2006).

Aby nedocházelo vlivem současného působení vysoké radiace a nízkých teplot k fotoinhibici, snižuje se u stálezelených rostlin v buňkách hladina fotosyntetických pigmentů. Stoupá poměr VAZ/Chl, tedy relativně se zvyšuje zastoupení xantofylů účastnících se disipace energie v podobě tepla v xantofylovém cyklu proti ostatním karotenoidům a chlorofylu.

V průběhu aklimace se zvyšuje schopnost reoxidace  $Q_A$ , může stoupat syntéza alternativní oxidázy (Bravo et al., 2007).

Rovněž stoupá obsah některých proteinů, které fungují jako ochrana před světelným stresem. Např. u *Rhododendron catawbiense* je obsah ELIP („early light-induced protein“) v zimě 5-8krát vyšší než na konci léta. ELIP je integrální protein thylakoidní membrány. Je schopen vázat volné molekuly chlorofylu a i b a tudíž zabraňovat důsledkům fotoinhibice (Peng et al., 2008).

Rozpustné enzymy s úzkým teplotním optimem jsou nahrazovány tolerantnějšími izozymy, případně může stoupat koncentrace těchto termolabilních enzymů. Nově syntetizované enzymy mají proti původním někdy sníženou hodnotu Michaelisovy konstanty ( $K_M$ ).

## **Odolnost k mrazu**

Odolnost k mrazu je v podstatě trojího druhu. Prvním způsobem je snaha rostlin vůbec se nevystavit mrazovým teplotám. Ve druhém případě sice rostliny zakoušejí podnulové teploty, nicméně nejsou vystaveny důsledkům tvorby extracelulárního ledu ve svém těle. Posledním typem je odolnost vůči tvorbě extracelulárního ledu a s tím spojené dehydrataci. V prvních dvou případech jde o mechanismy avoidance, poslední způsob je tolerancí k mrazu.

## **Mechanismy avoidance**

Avoidance (vyhnutí se) mrazu je typická hlavně pro rostliny, které nejsou mrazu vystaveny nepřerušeně dlouhodobě (nejvíce několik hodin), i když se mráz může vyskytovat opakovaně či pravidelně. Tedy rostliny tropických hor nebo při nahodilých mrazech na začátku a konci vegetačního období u rostlin v temperátu. Nicméně některé avoidantní mechanismy jsou charakteristické pro určitá pletiva rostlin temperátních a jiné mechanismy než avoidanci tato pletiva ani nevyužívají.

**1. Mechanismy zmírňující mráz.** Mezi takovéto mechanismy patří izolace živých pletiv a různé cesty získávání tepla.

Izolace citlivých orgánů skýtá účinnou ochranu zejména před radiačním mrazem. Náleží sem nyktinastické pohyby květů a listů, zakrývají se tak rozmnožovací orgány, pupeny a meristémy před nočním mrazem. Dále izolace mrtvými rostlinnými částmi, opadem nebo i orgány méně citlivými (např. polštářovité rostliny mohou pupeny ukrývat ve spleti listů a větviček). Isolačně působí rovněž půda na kořeny nebo podzemní orgány geofytů či vrstva sněhu.

Teplo mohou rostliny získávat z několika zdrojů. Dužnaté a sukulentní orgány nebo kmeny stromů mohou mít v sobě značné množství tepla akumulovaného během slunečného dne. Tím potom mohou kompenzovat tepelné ztráty během noci. Při zemi rozprostřené, růžicovité a polštářovité rostliny jsou schopny v noci využívat teplo vedené z hlubších vrstev půdy k jejímu povrchu. Části rostlin přiléhající k půdě jsou o 2 až 6 K teplejší než zbytek rostliny (Sakai et Larcher, 1987). Také při krystalizaci ledu a jinovatky na povrchu rostlin se uvolňuje teplo, které je rostlina schopna přijímat.

Zvláštním případem je metabolická termogeneze. Je zajišťována alternativní (= kyanid resistantní) oxidázou a PEP karboxylázou. Termogenní pletiva byla pozorována u Araceae. U druhu *Symplocarpus foetidus* zůstává teplota květenství nad 10°C i při okolní teplotě -15°C.

**2. Podchlazení.** Podchlazení protoplastů je stav, kdy i pod bodem tuhnutí (0°C) je buněčný obsah tekutý a netvoří se led. Jak již bylo řečeno, je teplota homegonní nukleace vody kolem -38°C (různé prameny uvádějí různé teploty od -38 do -40°C), tedy do této teploty se může voda nacházet v kapalném skupenství. Látky rozpuštěné ve vodě tuto teplotu dále snižují. Zvýšení koncentrace solutů (nebo snížení koncentrace vody) rovněž snižuje bod tuhnutí roztoku. Při 60 až 70% vody v cytoplasmě klesá bod tuhnutí o 1 až 2 K. Při snížení obsahu vody až ke 40% (např. při mimoorganovém vymrzání, viz níže) se teplota snižuje až o 10 K (Sakai et Larcher, 1987).

Podchlazení se vyskytuje v několika podobách. Mírné podchlazení (-0,6 až -15°C) trvá jen po omezenou dobu, po níž je následováno tvorbou extracelulárního ledu. Často se vyskytuje při krátkodobých radiačních mrazech.

Dlouhodobé podchlazení (-16 až -25°C). Předpokladem pro dlouhotrvající podchlazení je určitá struktura pletiva: buňky jsou malé, buněčné stěny silné se zvláště malými kapilárními prostory, interceluláry jsou redukovány nebo je pletivo vůbec bez

mezibuněčných prostorů. Vyskytuje se např. u květních pupenů a dřevního parenchymu temperátních dřevin. Dále u listů rostlin tropických hor, subtropických palem nebo mediterránních sklerofylních dřevin (např. *Olea europaea*).

Zvláštním typem dlouhodobého je podchlazení hluboké. Dosahuje se při teplotách pod úrovní bodu homogenní nukleace vody. Je známo v podstatě jen z buněk dřevního parenchymu dřevin studených oblastí.

Dřevní parenchym je pletivo přežívající nízké teploty v podstatě jen touto cestou. Jeho buňky jsou k tomu dobře přizpůsobeny. Nejsou mezi nimi žádné prostory. Extracelulární led tedy nemá, kde by se tvořil. V průběhu aklimace velmi zahušťují svůj obsah, narůstá koncentrace sacharidů – hlavně oligosacharidů (sacharosa, raffinosa, stachyosa). Monosacharidy se hromadí spíše v apoplastu. Může to být způsobeno změnou aktivity hexosových přenašečů při nízkých teplotách. Např. u topolu jsou v zimě hexosové přenašeče inaktivovány (Kasuga et al., 2007).

Buňky dřevního parenchymu jsou při letálních teplotách buď zabity tvorbou intracelulárního ledu (objeví se exoterma) nebo dehydratací (k níž dochází vlivem mimopletivového vymrzání, viz níže.) Letální teploty pro toto pletivo jsou kolem -40 až -50°C. Boreální opadavé druhy (*Betula*, *Populus*, *Salix*) nevykazují při podchlazování dřevního parenchymu žádnou exotermu a přežívají i teploty -70°C.

Podchlazením se pletiva vyhýbají dehydrataci následkem tvorby extracelulárního ledu. Avšak i podchlazená pletiva mohou být dehydrataci vystavena cestou mimopletivového, resp. mimoorganického vymrzání.

Jde o transport vody z podchlazených buněk/pletiv/orgánů do jiných částí rostlin, kde tato voda přechází v extracelulární led. Týká se hlavně dlouhodobě podchlazených částí rostliny. Tak je voda z podchlazených pupenů odváděna přes šupiny pupenů do parenchymu větví, z embrya do distální části semena, z kambia do kortexu apod. Vlivem tohoto transportu je dehydratace pletiv pozvolnější a tím i méně poškozující. Navíc snížení obsahu vody v buňkách rozšiřuje možnosti podchlazení na nižší teploty.

S podchlazením poněkud souvisí i jev zvaný vitifikace. K němu dochází za experimentálních podmínek při velmi rychlém ochlazení ( $10^4$  až  $10^5$  K/s) na velmi nízkou teplotu. Typicky ponořením tenkého plátku pletiva do kapalného dusíku. Je-li toto pletivo poté podobnou rychlostí rozehřáto (ponořením do teplé lázně), obvykle přežije, a to i u pletiv, která jsou jinak zabijena slabým mrazem. Vitifikaci přežívají i buňky s normálně hydratovanou cytoplasmou.

Při vitrifikaci vzniká nekystalická, sklo připomínající forma pevného skupenství vody. Bod vitrifikace vody je  $162(\pm 1)$  K. Při teplotách nad tímto bodem vzniká led, při nedostatečně rychlém rozehrívání dochází k rekrystalizaci nad teplotami vyššími než  $-135^{\circ}\text{C}$ .

Buňky mohou být k vitrifikaci přivedeny i podchlazováním pomalejším, avšak v přítomnosti kryoprotektantů. Kryoprotektanty (např. glycerol, dimethylsulfoxid) při vysokých koncentracích zabraňují tvorbě ledu v cytoplasmě a při velmi nízkých teplotách podporují vitrifikaci. Přesné působení těchto látek není známo, není ani jasné, zda musí být pro tuto funkci přítomné v cytoplasmě, nebo jestli postačuje povrchové ošetření. Předpokládá se membránové působení, ale neprokázala se inkorporace do membrán.

### **Mechanismy tolerance**

Tolerance k mrazu zahrnuje mechanismy umožňující rostlině vyrovnat se s dehydratací buněk působenou extracelulárním ledem. V tomto ohledu je patrný blízký vztah reakcí rostlin na stres z nízkých teplot a ze sucha. Během aklimace se v cytoplasmě hromadí látky s různou funkcí.

Buňky snižují svůj osmotický potenciál (tím pádem více „poutají“ vodu) hromaděním solutů. Ty nesmějí být ve vyšších koncentracích toxické. Z toho důvodu se nehodí ionty, které při zvýšených hladinách mohou působit na proteiny a membrány nebo vyvolávat změny elektrochemických potenciálů. Nejčastější jsou mono a oligosacharidy (glukosa, fruktosa, sacharosa, melibiosa, raffinosa, stachyosa, verbaskosa a další) a jejich deriváty, např. cukerné alkoholy (mannitol, pinitol, sorbitol). Úlohu kompatibilních solutů plní i některé aminokyseliny a jejich deriváty (prolin, glycin-betain, alanin-betain) a polyaminy (spermin, spermidin, putrescin) (Kosová et al, 2007).

Dále jsou syntetizovány látky chránící proteiny a membrány před účinky dehydratace. Tuto funkci plní jednak opět kompatibilní soluty, zejména však různé ochranné proteiny.

Jedněmi z nich jsou LEA proteiny (late embryogenesis abundant – byly objeveny v embryích, kde chránily buněčné struktury při desikaci semene) neboli dehydriny. Působí jako chaperony („drží“ proteiny v nativní konformaci) nebo emulgátory (zabraňují agregaci proteinových molekul, k níž může docházet vlivem dehydratace). Interagují s různými buněčnými strukturami (endoplasmatické retikulum, jádro, mitochondrie) (Smallwood et Bowles, 2002). Jsou vysoce hydrofilní a při plné hydrataci jsou obklopeny rozsáhlým, vysoce uspořádaným hydratačním obalem a nemohou tudíž interagovat s jinými molekulami. Lze na ně takto pohlížet rovněž jako na kompatibilní soluty. Při nedostatku vody se hydratační obaly

zmenšují a dehydriny tím mohou uplatňovat svou protektivní funkci. Orgánový výskyt těchto proteinů závisí na druhu rostliny. Mohou být v listech, květních i vegetativních meristémech, plodech, zásobních orgánech, vodivých pletivech, dřevním parenchymu i uvnitř organel (jádro, plastidy) (Kosová et al., 2007).

Dalším případem protektivních proteinů jsou CIP (cold induced proteins). Ty jsou na rozdíl od LEA proteinů vysoce hydrofobní. Jejich syntéza je zahajována během aklimace.

Odolnost buněk k mrazu závisí i na buněčné stěně. Její struktura může ovlivňovat jednak teplotu nukleace podchlazeného buněčného obsahu a za druhé rychlost dehydratace vyvolané tvorbou extracelulárního ledu. Pro obojí je určující porositá stěny, tedy velikost mikrokapilárních prostorů. Ty se při aklimaci zmenšují, zejména jsou vyplňovány pektiny. U pektinů stoupá jejich množství a klesá úroveň esterifikace. Methylestery pektinů umožňují rozvolnění stěny (např. při růstu), zatímco hydrolýza těchto esterů dává vznik uronovým kyselinám. Ty pak mohou svými karboxylovými skupinami poutat kationty – dochází k provázání pektinových molekul dvoumocnými ionty, hlavně  $\text{Ca}^{2+}$ . Díky těmto interakcím se stává buněčná stěna pevnější.

Hydrolýza methylesterů pektinů je prováděna enzymem pektinmethylesterázou, jejíž aktivita se během aklimace zvyšuje o 70 až 90% (Solecka et al., 2008).

Navíc působí hydrolýza i snížení pH. To může měnit aktivitu enzymů přítomných v buněčné stěně, např. endopolygalakturonáz, které štěpí pektinové řetězce.

Rostliny lze podle mechanismu odolnosti dělit na:

**1. Permanentně sensitivní**, které vůbec nevykazují toleranci. Využívají pouze podchlazení a snížení bodu tuhnutí. I tyto mechanismy však mohou nabývat na intenzitě v průběhu aklimace.

**2. Tolerantní.** Většina rostlin si toleranci podržuje jen dočasně a je u nich spojena s jinými cyklickými životními projevy. Vysokohorské rostliny si zpravidla udržují určitou míru tolerance po celý rok – ty jsou permanentně tolerantní. Rostliny částečně tolerantní mají i v období nejvyšší odolnosti některá pletiva sensitivní (tj. podchlazená). Jde o většinu dřevin mírného pásu. Boreální dřeviny (*Betula*, *Populus*, *Salix*, konifery) a alpské keřky mohou být asi tolerantní ve všech pletivech – jsou celkově tolerantní (Sakai et Larcher, 1987).

## 6. Možnosti růstu rostlin v období nízkých teplot

Při dlouhodobě nízkých teplotách, tedy v zimním období, jsou stálezelené rostliny aktivní v některých životních pochodech. Jsou však nuceny snášet četné obtíže.

Hlavním problémem je nedostatek vody. Kořeny při nízké teplotě vodu absorbují jen v malé míře. Pokud půda promrzne, není k dispozici voda žádná. K promrzání půdy dochází při nedostatečné sněhové pokrývce. Dřeviny proto vytvářejí zásoby vody, zejména uvnitř kmenů a větví. Při vysoké sluneční radiaci (hlavně na konci zimy) se vlivem absorpce světla zahřívá povrch rostlin a mohou se otevírat průduchy. To vede k vysychání pletiv.

Ve vodivých pletivech se v důsledku transpirace snižuje tlak, který není kompenzován nasáváním vody kořeny, a může tak dojít ke kavitaci. Vodivá pletiva konifer – tracheidy – jsou schopna účinky kavitace odstranit uzavřením těch tracheid, v nichž k přetržení vodního sloupce došlo, díky strukturám v jejich buněčných stěnách – dvůrkatým ztenčeninám. (Stálezelené listnaté keříky, jejichž trachey nejsou schopné kavitace kompenzovat, jsou většinou ukryty pod sněhem).

Fotosyntéza může v zimním období probíhat u konifer (u boreálních však nejspíš ne). Některé rostliny jsou zimní fotosyntézou schopny dosáhnout až 10 – 35% letního maxima. Ale většina alpských rostlin mírného pásu v zimě nefotosyntetizuje ani při oblevách.

Některé opadavé dřeviny (např. osika) obsahují značné množství chlorofylu ve felodermu (během vegetačního období může fotosyntéza kmenem a větvemi pokrývat až 15% fotosyntézy celého stromu). Zde může probíhat fotosyntéza i v zimě. Může k ní být použit i  $\text{CO}_2$  vznikající respirací hlubších pletiv kmene (Marchand, 1996).

Rostliny ukryté pod sněhem jsou schopny v tomto prostředí růst, dokonce zakládat květní pupeny. Tato aktivita je často hrazena ze zásob. Nicméně stálezelené (nebo i opadavé, např. borůvka zelenými větvkami) rostliny mohou i pod sněhem fotosyntetizovat. Vrstva sněhu silná 20 cm propouští pouze 1 až 15% (v závislosti na struktuře sněhu) na její povrch dopadajícího světla, navíc je sníh relativně málo propustný pro plyny. Na druhou stranu se ale světlo průchodem sněhem spektrálně mění a relativně se v něm zvyšuje zastoupení složek optimálních pro fotosyntézu. Navíc je pod sněhem vlivem dekompozičních pochodů v půdě vyšší koncentrace  $\text{CO}_2$ . Tím se může posunovat světelný kompenzační bod fotosyntézy, takže rostlina poté vykazuje kladnou bilanci uhlíku při koncentraci fotonů nižší, než jakou by potřebovala pro kladnou bilanci uhlíku v normálních podmínkách.

## 7. Aklimace

Odolnost k nízkým teplotám se mění v průběhu ontogeneze celých rostlin i jednotlivých orgánů. Nejnížší je u klíčících semenáčků a rašících prýtů. Míra (nebo přítomnost či absence) odolnosti se ale u rostlin z mírného klimatického pásu mění i v průběhu roku. U rostlin pocházejících z oblastí neměnného klimatu je odolnost přítomna (pokud se tedy vyskytuje) celoročně na stejné úrovni.

V temperátu se změna ve stupni odolnosti pojí s periodickými změnami podmínek a dalšími biorytmy provázejícími tyto změny – dormanci u dřevin a obdobím vegetačního útlumu u víceletých bylin. Aklimace (otužení) je přechodem ze stavu nulové tolerance do úrovně tolerance vyšší až maximální. Během ní dochází k rozvoji obranných mechanismů.

Aby mohla rostlina nastoupit proces otužování, musí k němu být připravena. Stav připravenosti nastává až po ukončení růstu. U temperátních dřevin mívá aklimace obvykle tři fáze.

První nastupuje po ukončení růstu v létě nebo na podzim. Je indukována zkracujícím se dnem při teplotách 10 až 20°C. Dochází ke zvýšené syntéze zásobních látek – hlavně škrobu a lipidů – a protektantů.

Další fáze je vyvolána několikátýdenní expozicí nízkým nadnulovým teplotám. To vede ke snížení obsahu vody v buňkách, fragmentaci centrální vakuoly. Další snížení teplot k 5 až -3°C provází reorganizace biomembrán a enzymových systémů.

Poslední fáze nastává při trvalých teplotách -5 až -15°C. Těmi je navozena nejvyšší míra odolnosti. Při výskytu vyšších teplot během aklimace rostlina rychle ztrácí dosaženou úroveň odolnosti.

U bylin je proces jednodušší, obvykle probíhá ve fázi jediné. Je to dáno tím, že dřeviny při aklimaci souběžně upadají do dormance, což je proces komplexní, zahrnující rozsáhlé změny, zatímco byliny obvykle pouze přerušují aktivitu. Aklimace bylin je tak navozována teplotami 5 až -2°C. Zpravidla ani není třeba vhodné fotoperiody. Během této fáze rostlina akumuluje cukry (byliny jsou schopné poměrně výkonné fotosyntézy i za nízkých teplot). V několika dnech se dosahuje plné odolnosti. Deaklimace – ztráta odolnosti probíhá na jaře po ukončení dormance. Je vyvolána zvyšující se teplotou. Je-li dormantní rostlina ve stádiu plné odolnosti vystavena vysokým (nadnulovým) teplotám, tolerance se rychle vytrácí, ale rostlina setrvává na úrovních odolnosti odpovídajících okolním teplotám.



Při opětném poklesu teplot se tolerance rychle navrácí (reaklimace). Náhlé vysoké (10 až 20°C) dlouhotrvající teploty uprostřed zimního období vedou k rychlé ztrátě odolnosti (v několika dnech).

Někdy může být aklimace navozena i (mírnějším) suchem. Při vodním stresu je produkována ve zvýšené míře ABA, která rovněž aktivuje některé mechanismy odolnosti k nízkým teplotám.

## 8. Rytmicita

Získávání a zvyšování odolnosti je spřaženo s dalšími rytmy – zejména se střídáním období aktivity a klidu. Rostliny, které mezi aktivitou a klidem „nepřepínají“, vykazují nepřetržitý růst. V oblastech s neměnným klimatem je to asi 20% všech stálezelených rostlin. Rostou nepřetržitě a dosahují stromových rozměrů. Patří sem bylinná fanerofyta (*Musa*), stromovité kapradiny, palmy, cykasy, některé dvouděložné dřeviny – *Carica papaya*.

Růst přerušovaný (obdobím klidu) se vyskytuje u většiny rostlin. V tropech se projeví shozením listoví. To může nastávat i několikrát do roka. Nové olistění se však objevuje již po krátké době. V temperátu je tento rytmus vázán na změny ročního období. V těchto zeměpisných šířkách se totiž uplatňuje významný sezónní fotoperiodismus, od něhož se odvíjí sezónní termoperiodismus. Fotoperioda ovlivňuje četné vývojové procesy rostlin – klíčení semen, rašení pupenů, tvorbu zásobních orgánů, indukuje kvetení aj. Fotoperiodický signál účastnící se dormance je zprostředkován fytochromem.

U některých bylin (*Capsella*, *Cerastium*, *Senecio*) má střídání aktivity a klidu charakter rytmu aitonického (vnuceného), tj. vyvolaného oscilací nějaké vnější podmínky. Ukončení aktivity není primárně iniciováno rostlinou samou. Spouštěcím signálem je nízká teplota. Po vystavení takovým teplotám rostlina rychle přerušuje růst. Přerušování růstu zpravidla nevyžaduje fotoperiodický signál.

Naproti tomu u většiny dřevin je dormance rytmem endogenním, vyvolaným vnitřním oscilátorem rostliny. Vnitřní oscilátor je ale entrainován s oscilací vnější – fotoperiodou. Výjimkami jsou např. jasan, jírovec, šerík, třešeň. U těchto není nástup dormance řízen endogenně a nevyvolává jej ani fotoperioda. Indukce probíhá vlivem nízké noční teploty (pod

10°C). Vnitřní rytmicitata se vyskytuje u nadzemních částí rostliny. Kořeny většinou vykazují růst přerušovaný pouze nízkou půdní teplotou, nedostatkem vody nebo živin. Růst kořenů začíná dříve než růst prýtu a později ustává.

Dormance nastupuje souběžně s aklimací k nízkým teplotám. Má několik fází. Předodpočinkové období začíná v létě se zkracujícím se dnem, případně snižujícími se nočními teplotami. Vytvářejí se axilární pupeny, v rostlině se snižuje obsah vody, hromadí se zásobní látky. Klesá hladina giberelinů, stoupá obsah ABA. To vede k selektivním změnám genové exprese a útlumu a zastavení dělivé aktivity meristémů. Buněčná jádra zpravidla ustrnou v G1 fázi. Mění se endomembránový systém (zhušťování membrán endoplasmatického retikula, zmenšování mitochondrií, fragmentace centrální vakuoly) a aktivita enzymů (zvyšuje se u hydroláz, peroxidáz, kataláz, snižuje u cytochromoxidáz a dehydrogenáz), některé enzymy jsou nahrazovány isozymy fungujícími při nižších teplotách. Do buněčných stěn se ukládá větší množství prolinem bohatých proteinů (např. extensiny), póry v matrix stěn jsou zmenšovány.

U některých rostlin (hlavně geofytů) je nástup předodpočinkového období vyvoláván i dny dlouhými. To souvisí s nedostatkem vody v létě.

Vlastní odpočinkové období nastává v pozdním podzimu a zimě. Je to zároveň období vysoké odolnosti k nízkým teplotám. Je řízeno zcela endogenně. Rostliny nereagují na signály (fotoperioda, teploty) vystoupením z dormance a obnovou aktivity.

Poodpočinkové období přichází v našich šířkách zhruba v únoru. Přejchod do něj je vyvolán nízkými teplotami v období předešlém. Při těchto teplotách zřejmě dochází k odbourání některých inhibitorů. Je charakteristické zvýšením syntézy fytohormonů – nejdříve giberelinů a cytokininů, později auxinů. V důsledku těchto změn jsou mobilisovány zásobní látky, zvyšuje se intenzita bazálního metabolismu a biosyntéz, obnovuje se buněčné dělení.

Při určité úrovni aktivity je rostlina schopna reagovat na příhodnou fotoperiodu nebo teplotu obnovou růstu.

Dřeviny s přerušovaným růstem je možno podle charakteru růstu prýtu dělit na 2 skupiny.

Typ *Populus* má jen jedno (zimní) klidové období. Prýt roste od jara nepřerušovaně až do konce léta nebo začátku podzimu (i když samozřejmě ne stále stejnou rychlostí). Tento typ růstu vykazují vedle topolu např. *Betula*, *Larix*, *Robinia*, *Tilia*.

Typ *Quercus* – prýť začíná růst na jaře, pak následuje zastavení růstu a po určité pauze přichází druhé rašení, pak růst pokračuje až do konce sezóny. Tyto dřeviny tak prodělávají dvě období klidu. Kromě dubu sem náleží např. *Fagus*, *Abies*, *Picea*, *Pinus*.

## 9. Evoluce odolnosti k nízkým teplotám

Jak se rostliny šířily z oblastí s neměnným klimatem, v nichž nebyly nízkým teplotám vůbec vystaveny, do prostředí stále tužších, sílil tlak na vytvoření mechanismů zmírňujících dopad nepříznivých podmínek. Předpokládá se postupná adaptace jednotlivých úrovní odolnosti. Nejprve bylo nutno přizpůsobit membránový a metabolický aparát výskytu nízkých nenulových teplot. Vyvíjela se odolnost k chladu. Během geologické minulosti totiž docházelo k postupnému snižování globální teploty. V dalším kroku následovala adaptace na slabý, krátkodobý mráz. K tomu mohlo docházet hlavně šířením rostlin v tropech z nížinných partií do vyšších nadmořských výšek. Rozvíjely se tím mechanismy avoidance, které jsou aktivní během celého roku.

Migrace rostlin z rovníkových oblastí do monzunových byla nejspíše klíčová pro ustanovení vnitřní oscilace, i když primárně ne spojené s chladem. V monzunových oblastech, kde se pravidelně střídají vlhká a suchá období, došlo pravděpodobně k evoluci dormance, pomocí níž rostliny překonávaly nepříznivé období sucha. Šíření pokračovalo do subtropů a temperátu.

Zde se mechanismy tolerance k suchu postupně měnily na mechanismy mrazové tolerance. Vedle oscilace vlhko/sucho se přiřadila i periodická změna teplo/zima, jejíž překonávání bylo rovněž usnadněno vstupem rostliny do stavu klidu. Z toho vyplývá značná podobnost mechanismů překonání sucha a mrazu.

## 10. Rozšíření rostlin s různými mechanismy odolnosti

Rostliny různého původu vykazují odlišné typy odolnosti. Odrážejí zejména průběh a hodnoty teplot na přirozených stanovištích.

Platí zde Thienemanovo pravidlo, totiž, že rozšíření rostliny je dáno odolností její nejcitlivější části.

Se stoupající nadmořskou výškou sílí tendence k avoidanci, naopak s přibývajícím zeměpisnou šířkou se silně uplatňuje tolerance. Tolerance je úzce spjata s obdobím klidu, zatímco avoidance se vyskytuje tam, kde se mráz objevuje v průběhu růstu a vývoje. Po překonání nízkých teplot avoidantními mechanismy je možná rychlá obnova přerušovaných procesů. Při toleranci naproti tomu dochází k dalekosáhlým změnám metabolismu a struktury, tudíž návrat k aktivitě je náročnější a vyžaduje i více času.

V temperátu je tedy v zimním období jednoznačně upřednostněna tolerance. Avoidance se vyskytuje jen u některých (tím typických) pletiv, např. dřevního parenchymu nebo kambia. Avoidance však dobře chrání temperátní rostliny při krátkodobých a nízkých mrazech na začátku resp. konci vegetační sezóny

Zajímavá je situace na horách, ať tropických nebo mírných. Stoupající nadmořská výška působí jednak riziko častějšího výskytu nízkých teplot, za druhé zkracuje vegetační sezónu.

Mechanismy odolnosti uplatněné během sezóny se často liší podle životní formy rostlin. Přízemní rostliny, zejména byliny a graminoidy, vykazují toleranci. Rostliny vzpřímené (např. tropické obří růžice) naopak avoidanci. Je to dáno tím, že při nočních radiačních mrazech se teplota snižuje směrem k zemskému povrchu. Afroalpínské a havajské obří růžice však mráz tolerují (Márquez, Rada et Fariñas, 2006). Rovněž *Polylepis tarapacana*, která zakouší na horní hranici svého rozšíření teploty až  $-19^{\circ}\text{C}$ , využívá mechanismů tolerance, zatímco ostatní druhy rodu, které ovšem rostou v nižších nadmořských výškách, jsou avoidantní.

Tropické rostliny nízkých nadmořských výšek jsou pouze senzitivní (tedy využívají pouze avoidance).

# ČÁST DRUHÁ

## 1. Metodika

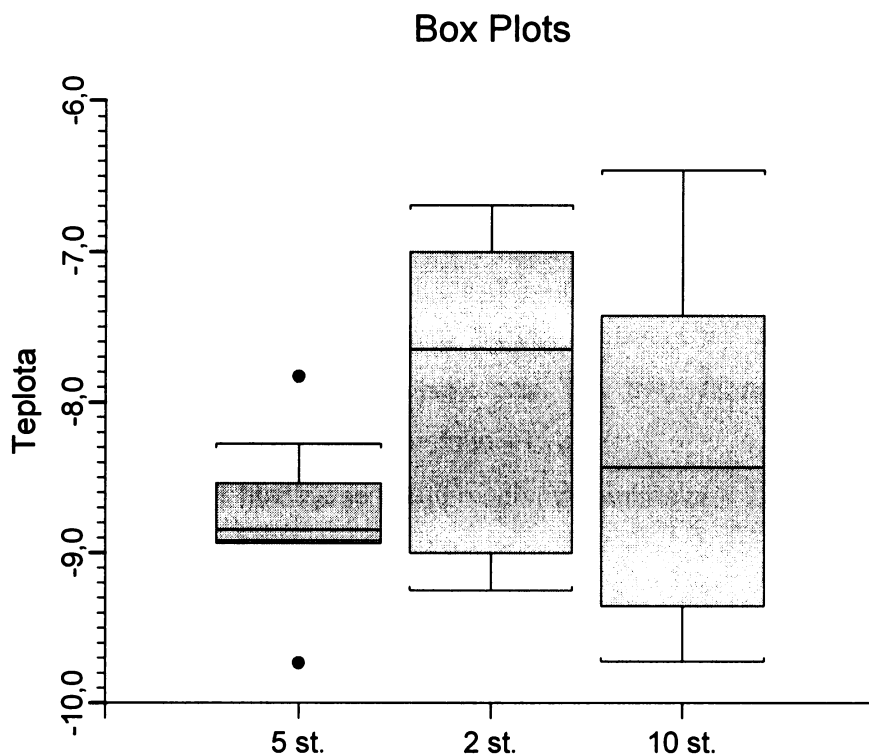
V rámci bakalářské práce byl proveden pokus s podchlazováním rostlin. Jako pokusná rostlina byla zvolena brusinka (*Vaccinium vitis-idaea*) coby zástupce erikoidních keřů, jimiž se bude zabývat následující diplomová práce.

### Zjišťování počátku nukleace

Listy brusinky byly vystaveny rovnoměrnému graduálnímu podchlazování, kdy byla sledována teplota listu (snímána termočlánkem). Tak byla zjišťována teplota, při které začíná tvorba ledu (exoterma). Protože literatura udává různé rychlosti poklesu teploty (nejen lišící se podle růstových forem různých druhů rostlin, ale i u podobných rostlin používají různí autoři odlišné rychlosti), např. pro dřeviny: 2 K/4h (Sakai et Wardle, 1978), 5 K/den (Sakai et Weiser, 1973), u bylin např. 2 K/h (Taschler et Neuner, 2004), 0,2 K/min (Márquez, 2006).

Byly testovány 3 rychlosti (2, 5 a 10 K/h) a byl sledován rozptyl teplot, při nichž se objevila exoterma. Cílem bylo zvolit takovou rychlost (pro účely podchlazování rostlin v rámci diplomové práce), při které měly naměřené teplotní hodnoty nejmenší rozptyl.

Rychlost podchlazování	Počet opakování	Úspěšné detekce exotermie	Odlehlé hodnoty	Směrodatná odchylka	Rozptyl	Průměr (°C)	Medián (°C)
2 K/hod	11	8	0	0,9538	0,9097	-7,855	-7,645
5 K/hod	11	9	2	0,4846	0,2349	-8,783	-8,839
10 K/hod	11	10	0	1,0424	1,0866	-8,337	-8,425



Dá se samozřejmě předpokládat jistý posun teplot exotermy od hodnot, které by se vyskytly v přirozeném prostředí. Při srovnání podchlazování *in situ* a v laboratoři (Taschler et Neuner, 2004) bylo zjištěno, že při podchlazení v přirozených podmínkách se u rostlin objevovala exoterma při teplotách v průměru o 1,1 K nižších než při laboratorních pokusech. Pokusy *in situ* jsou bohužel spíše výjimkou.

### **Zjišťování poškození**

Detekce poškození je možná několika způsoby. Používá se vizuální stanovení (např. Sakai et Weiser, 1973).

Poškozená pletiva často mění barvu (hnědnou), mohou být tedy listy např. skenovány a poškození určeno analýzou obrazu.

Dále je možno použít stanovení pomocí TTC (trifenyltetrazolium chlorid). Exponované části rostlin jsou inkubovány s roztokem TTC, který reaguje s poškozenými strukturami (redukuje se). Podle změn koncentrace TTC (stanovuje se spektrofotometricky) se vyhodnotí poškození (např. Rada et al., 2001, Márquez, 2006).

V mém pokusu byla použita metoda konduktometrická (Prášil et Zámečník, 1997, Prášil et Zámečník, 1990). Při poškození buněk dochází k úniku elektrolytů. Tento únik je

svým rozsahem úměrný poškození. Lze tedy měřit elektrickou vodivost výluhu rostlinných vzorků vystavených různým teplotám.

Při zvolených teplotách byly odebírány vzorky (listy brusinky), byl z nich korkovrtem vyseknut terčík o průměru 4 mm. Terčíky byly zality 5 ml deionizované vody a hodinu třepány. Po ukončení třepání byly ještě 1 hodinu ponechány v klidu, načež byla změřena vodivost výluhu –  $L_T$ .

Stejně vzorky byly poté vloženy na cca 15 minut do lázně s vroucí vodou. Přejití vzorků varem způsobilo maximální poškození. Pak byly vzorky zchlazeny na laboratorní teplotu a opět byla změřena vodivost výluhu –  $L_{TM}$ .

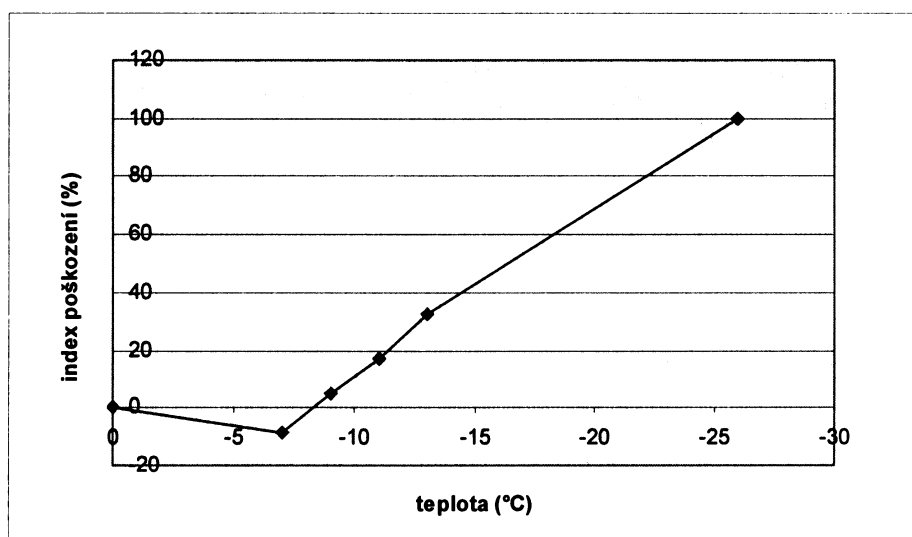
Jako referenční hladina se určuje vodivost minimální –  $L_0$  (a k ní příslušná  $R_0$ ), tedy vodivost výluhu z nepoškozeného vzorku.

Z hodnot relativních vodivostí lze vypočítat index poškození  $I_t$  podle vztahu:

$$I_t (\%) = 100 \cdot (R_t - R_0) / (100 - R_0)$$

Teplota, při níž nabývá index poškození hodnoty 50%, je  $LT_{50}$ .

Graf ukazuje výsledek stanovení indexu poškození konduktometricky u listů brusinky. Vzorky byly odebírány při teplotách v okolí bodu, kdy se vyskytovala exoterma (tedy -7, -9, -11 a -13°C). Posledním bodem je nejnižší teplota dosažitelná použitým chladičím zařízením.



Záporné poškození (druhý bod datové řady) je samozřejmě artefaktem.

## **2. Zaměření následné diplomové práce**

V DP se chci zabývat změnami v úrovni odolnosti erikoidních keřů na rašeliništích v průběhu vegetačního období. Společně s tím bude zkoumána případná změna vodního potenciálu pletiv těchto rostlin. Výzkum bude prováděn na lokalitách Červené blato a Rokytecká slat', tedy bude možno porovnávat vliv nadmořské výšky na odolnost (rozdíl nadmořských výšek lokalit je cca 700 m).



## POUŽITÁ LITERATURA

Adámková Š., Luhová L., Petřivalský M. et Peč P.: Role L-fenylalaninamoniumlyasy při obranné reakci rostlin – Chemické Listy 100: 486-494, 2006

Addo-Bediako A., Chown S. L. et Gaston K. J.: Thermal tolerance, climatic variability and latitude – Proceedings of the Royal Society B 267: 739-745, 2000

Bhosale S. U., Rymen B., Beemster G. T. S., Melchinger A. E. et Reif J. C.: Chilling tolerance of central European maize lines and their factorial crosses – Annals of Botany 100: 1315-1321, 2007

Bravo L. A., Saavedra-Mella F. A., Vera F., Guerra A., Cavieres L. A., Ivanov A. G., Hunter N. P. A. et Corcuera L. J.: Effects of cold acclimation on the photosynthetic performance of two ecotypes of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. – Journal of Experimental Botany 58(13): 3581-3590, 2007

Bruce T. J. A., Matthes M. C., Napier J. A. et Pickett J. A.: Stressful „memories“ of plants: Evidence and possible mechanisms – Plant Science 173: 603-608, 2007

Cavender-Bares J.: Chilling and freezing stress in live oaks (*Quercus* section *Virentes*): intra- and inter-specific variation in PS II sensitivity corresponds to latitude of origin – Photosynthesis Research 94: 437-453, 2007

Ducruet J-M., Peeva V. et Havaux M.: Chlorophyll thermofluorescence and thermoluminescence as complementary tools for the study of temperature stress in plants – Photosynthesis Research 93: 159-171, 2007

Ensminger I., Schmidt L. et Lloyd J.: Soil temperature and intermittent frost modulate the rate of recovery of photosynthesis in Scots pine under simulated spring conditions – New Phytologists 177: 428-442, 2008

Guy Ch. L.: Freezing tolerance in plants: current understanding and selected emerging concepts – Canadian Journal of Botany 81: 1216-1223, 2003

Guy Ch., Kaplan F., Kopka J., Selbig J. et Hinch D. K.: Metabolomics of temperature stress – Physiologia Plantarum 132: 220-235, 2008

Chinnusamy V., Zhu J. et Zhu J.-K.: Cold stress regulation of gene expression in plants – TRENDS in Plant Science 12 (10): 444-451, 2007

Kasuga J., Arakawa K. et Fujikawa S.: High accumulation of soluble sugars in deep supercooling Japanese white birch xylem parenchyma cells – New Phytologists 174: 569-579, 2007

- Kosová K., Vítámvás P. et Prášil I. T.: The role of dehydrins in plant response to cold – *Biologia Plantarum* 51 (4): 601-617, 2007
- Levitt J.: Responses of Plants to Environmental Stresses (Vol. 1: Chilling, Freezing and High Temperature Stresses) – Academic Press, New York, 1980
- Marchand P. J.: Life in the Cold: An Introduction to Winter Ecology – University Press of New England, 1996
- Márquez E. J., Rada F. et Fariñas M. R.: Freezing tolerance in grasses along an altitudinal gradient in the Venezuelan Andes – *Oecologia* 150: 393-397, 2006
- Maslova S. P., Tabalenkova G. N., Kurenkova S. V. et Plusnina S. N.: Seasonal changes in anatomical and morphological structure and the content of phytohormones and sugars in underground shoots of a long-rhizome perennial grass *Phalaroides arundinacea* - *Russian Journal of Plant Physiology* 54 (4):491-497, 2007
- Naoki T., Kasuga J., Takezawa D., Arakawa K. et Fujikawa S.: Gene expression associated with increased supercooling capability in xylem parenchyma cells of larch (*Larix kaempferi*) – *Journal of Experimental Botany* 58 (13): 3731-3742, 2007
- Pang X., Halaly T., Crane O., Keilin T., Keren-Keiserman A., Ogradovitch A., Galbraith D. et Or E.: Involvement of calcium signalling in dormancy release of grape buds – *Journal of Experimental Botany* 58 (12): 3249-3262, 2007
- Peng Y., Lin W., Krebs S. L. et Arora R.: Phylogenetic analysis and seasonal cold acclimation- associated expression of early light-induced protein genes of *Rhododendron catawbiense* – *Physiologia Plantarum* 132: 44-52, 2008
- Prášil I. et Zámečník J.: The course of electrolyte leakage from various samples killed by frost, liquid nitrogen or boiling – *Biologia Plantarum* 32 (1):77-80, 1990
- Prášil I. et Zámečník J.: The use of conductivity measurement method for assessing freezing injury I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree of injury – *Environmental and Experimental Botany* 40: 1-10, 1998
- Rada F., García-Núñez C., Boero C., Gallardo M., Hilal M., González J., Prado F., Liberman-Cruz M. et Azócar A.: Low temperature resistance in *Polylepis tarapacana*, a tree growing at the highest altitudes in the world – *Plant, Cell and Environment* 24: 377-381, 2001
- Sakai A. et Larcher W.: Frost Survival of Plants: Responses and Adaptations to Freezing Stress – Springer, Berlin, 1987
- Sakai A. et Wardle P.: Freezing resistance of New Zealand trees and shrubs – *New Zealand Journal of Ecology* 1: 51-61, 1978
- Sakai A. et Weiser C. J.: Freezing resistance of trees in North America with reference to tree regions – *Ecology* 54 (1): 118-126, 1973

Smallwood M. et Bowles D. J.: Plants in a cold climate – Philosophical Transactions of the Royal Society B 375: 831-847, 2002

Soitamo A. J., Piippo M., Allahverdiyeva Y., Battchikova N. et Aro E.-M.: light has a specific role in modulating *Arabidopsis* gene expression at low temperature – BMC Plant Biology 8: 13, 2008

Solecka D., Zebrowski J. et Kacperska A.: Are pectins involved in cold acclimation and de-acclimation of winter oil-seed rape plants? – Annals of Botany 101: 521-530, 2008

Squeo F. A., Rada F., Azocar A. et Goldstein G.: Freezing avoidance and tolerance in high tropical Andean plants: Is it equally represented in species with different plant height? – Oecologia 89: 378-382, 1991

Strimbeck G. R., Kjellsen T. D. Scharberg P. G. et Murakami P. F.: Cold in the common garden: comparative low-temperature tolerance of boreal and temperate conifer foliage – Trees 21: 557-567, 2007

Taschler D. et Neuner G.: Summer frost resistance and freezing patterns measured *in situ* in leaves of major alpine plant growth forms in relation to their upper distribution boundary – Plant, Cell and Environment 27: 737-746, 2004

Zhen Y. et Ungerer M. C.: Clinal variation in freezing tolerance among natural accessions of *Arabidopsis thaliana* – New Phytologists 177: 419-427, 2008