

O. H. BAADSHAUG

Onsdag
Torsdag

kl. 1415
" 1415

Jordinsk

7 til 1415
2 " 1415
3 " ledig.

FROST I LEVENDE CELLEVEV OG FAKTORER SOM
VIRKER INN PÅ PLANTENES FROSTRESISTENS

av

Halvdan Sjøseth

Innhold

| | side |
|---|------|
| I. Innledning | 1 |
| II. Prinsippene for frysing og frost i biologisk sammenheng | 1 |
| 1. Vann- og isstruktur | 1 |
| 2. Frysing av løsninger | 8 |
| 3. Frostbeskyttende stoffer | 11 |
| 4. "Bundet vann" | 11 |
| III. Mekanismen for frost i levende organismer ... | 13 |
| 1. Intra- og extracellulær frost | 13 |
| 2. Toleranse mot frost hos planter | 19 |
| 3. Årsaker til frostskaader og frostresistens | 25 |
| IV. Klimatiske og biologiske faktorer i samband med frost hos planter, spesielt i vegeta- sjonsperioden | 27 |
| 1. Frost i biologisk- og meteorologisk sammenheng | 27 |
| 2. Jordbunnsmessige forhold og nattefrost ... | 34 |
| 3. Ulike metoder for bekjempelse av natte- frost | 37 |

| | side |
|--|------|
| V. Relasjonen mellom frostresistens og noen morfologiske og fysiologiske faktorer hos plantene | 40 |
| 1. Morfologiske og anatomiske karakterer ... | 40 |
| 2. Sukkerinnhold og celledaftkonsentrasjon . | 40 |
| 3. Vanninnhold | 45 |
| 4. N-holdige stoffer | 47 |
| 5. Andre stoffer | 48 |
| 6. Permiabilitet og viskositet | 49 |
| VI. Miljø og utvikling i relasjon til frostresistens | 50 |
| 1. Herdning og avherdning | 50 |
| 2. Hvileperiode (dermancy) | 56 |
| 3. Vernalisering | 58 |
| 4. Tilgang på næringsstoffer | 60 |
| VII. Ulike metoder for bestemmelse av plantenes frostresistens | 60 |
| VIII. Litteratur | 69 |

I. Innledning

Virkingen av frost hos levende organismer av forskjellig slag har vært studert gjennom lange tider. Innen botanikken går slike undersøkelser helt tilbake til midten av det 18. århundre. Den seinere tids forskning på dette felt har ført til betydningsfulle fremskritt på mange områder innenfor biologien. Innenfor landbruket har f.eks. utviklingen av metoder for lagring av dypfrost sæd spilt stor rolle i husdyravlen. I foredlingsarbeidet med sikte på økt hardførhet hos forskjellige vekster, nyttes i stor utstrekning ulike laboratoriemetoder for testing av frostresistens og hardførhet.

Et felles siktepunkt for forskningen på dette område er å klarlegge hva som skjer i levende celler og organismer ved frysing, hva som er grunnen til ulik grad av frostresistens, og videre hva som er den egentlige årsak til at cellene dør av frost.

I det følgende blir det gitt en kort oversikt over noen begreper, faktorer og forhold som er av betydning for forståelsen av frost og frostskafer i levende cellelev. Videre blir det gitt en oversikt over de viktigste miljømessige og fysiologiske forhold som gjør seg gjeldende i samband med frost og frostresistens hos planter. Det er også gitt en kort beskrivelse av ulike metoder for frysing av planter og plantelev. I teksten er det henvist til en del litteratur av nyere dato, både originalarbeider og mer omfattende oversikter.

II. Prinsippene for frysing og frost i biologisk sammenheng

1. Vann- og isstruktur

Vann er en av de viktigste bestanddeler i levende systemer både kvalitativt og kvantitativt. Kjennskapet til vannets funksjon er derfor viktig for forståelsen av frost i levende

organismer. Det er imidlertid ikke helt klarlagt hvilken betydning vannet har, direkte eller indirekte, for frost og frostskaader i levende cellelev.

Vannmolekylet kan skisseres som en V med en oxygenkjerne ved basis og med hydrogenkjerner ved de to åpne endene. Molekylet får på denne måte en tosidig elektrisk struktur med to positivt ladde protoner i en retning og negativt ladde elektroner i motsatt retning. To av de 4 par valenselektroner er forbundet med hydrogenatomer, mens to par, de såkalte "ensomme" par, peker bort fra det positive område av molekylet. Denne asymmetrien gjør at vann får en relativ løs struktur med langt mindre tetthet enn de fleste andre flytende stoffer. Gjennom de "ensomme" elektronparene og de positive protonene kan vannmolekylene danne hydrogenbånd både med andre vannmolekyler og med molekyler av andre forbindelser.

Et vannmolekyl kan, p.g.a. fordelingen av protoner og elektroner, forbinde seg med 4 andre og danne et såkalt "tetraedron", med alle bånd komplett. Dette er en mer stabil struktur, og det er denne strukturen vann inntar i is (fig. 1).

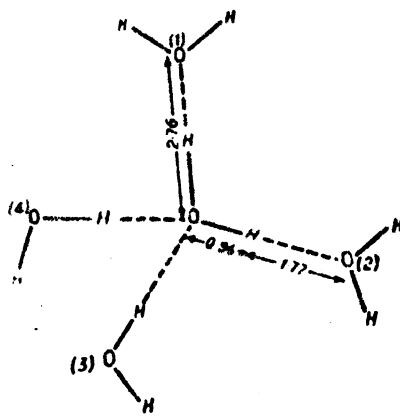


Fig. 1. Tetraedral koordinasjon av vannmolekyler i is. Molekyl (1) og (2) samt det sentrale molekyl ligger i papirets plan. Molekyl (3) ligger over dette plan og molekyl (4) under, slik at oxygenatomene (1), (2), (3) og (4) ligger i hjørnene av et regulært tetraedron. Avstand i Ångström (Smith, 1961).

Vann krystalliserer i det hexagonale system, mest typisk i hexagonale prizmer. Molekylene i en iskrystall er arrangert i sjikt over hverandre slik at de danner prismatiske søyler (fig. 2). Det er bare oxygenatomene som har en bestemt og regelmessig orientering i iskrystallene. Hydrogenatomenes orientering ser derimot ut til å være helt tilfeldig (Buswell et al. 1956).

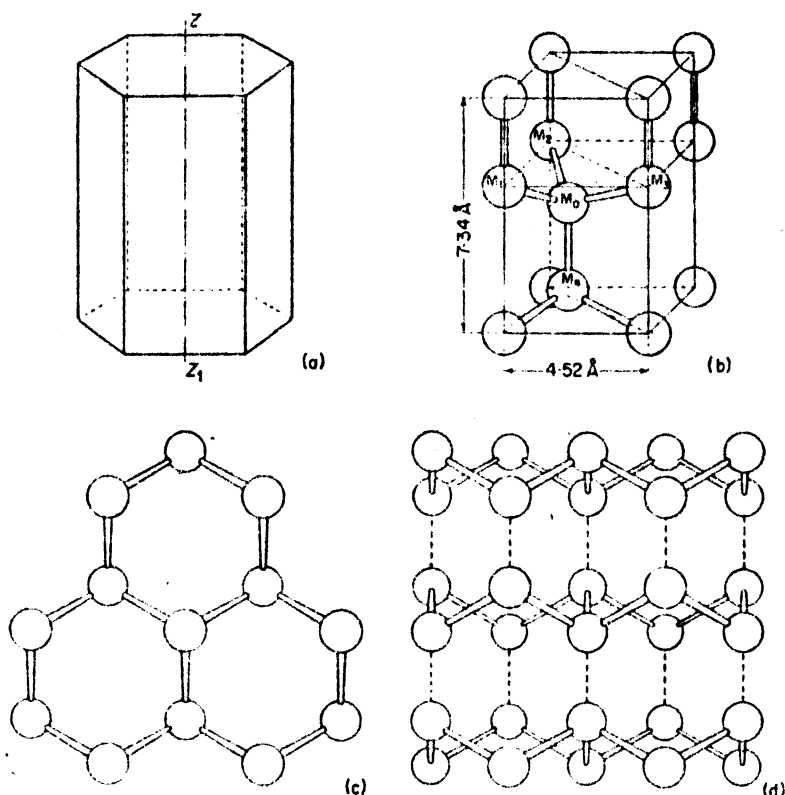


Fig. 2. Diagram som viser oppbyggingen av en iskrystall. (a) Hexagonal prisme. (b) "Celleenhet" som viser hvordan vannmolekylene er arrangert i en iskrystall. (c) Hexagonale figurer av vannmolekyler arrangert i et plan. (d) Sammensetning av basale plan i prismatisk struktur (Luyet, 1966).

På grunn av den spesielle og regelmessige strukturordning som vannet har i is, blir det forholdsvis mye "åpent rom" mellom molekylene. Dette er årsaken til at vann, i mot-

setning til de fleste andre stoffer, har mindre tetthet i fast enn i flytende form. Tettheten i vann er størst ved $+3.98^{\circ}\text{C}$, dvs. 1.000 g/ml . Is ved 0°C har en tetthet på 0.917 g/ml .

Is må ikke betraktes som et dødt system. Det foreligger mange beviser for at det finner sted bevegelser av molekyler og joner i meget stor hastighet. Dersom en iskrystall plasseres i et elektrisk felt vil den polariseres, dvs. en innstilling av de elektriske ladninger i forhold til det elektriske felt. Når strømmen brytes, blir krystallen igjen nøytral. Ren is leder elektrisk strøm like godt som vann, enda vann inneholder store mengder fremmede joner (Runnels, 1967). Is er å betrakte som en "halvleder" og strømmen overføres med protoner via H_3O^+ -joner.

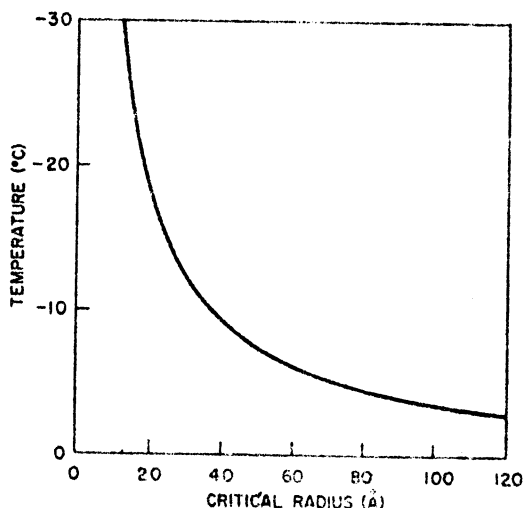
Når is smelter foregår det en "strekning" av hydrogenbåndene slik at avstanden mellom oxygenatomene blir noe større. Molekylene kan derfor bevege seg lengre fra hverandre. Dette skulle tilsi en mer åpen struktur i vann enn i is, men som nevnt, er det motsatte tilfelle. Årsaken er at molekylene i vann samler seg i mer eller mindre "kompakte grupper", slik at hvert vannmolekyl er omgitt av fem eller flere andre molekyler istedet for bare fire i is.

Krystallisasjon i vann eller en vandig løsning kan foregå enten ved homogen kjernedannelse, dvs. dannelse av iskjerne i helt rent vann, eller ved heterogen kjernedannelse, som blir katalysert av fremmede partikler.

Vannmolekylene kan floke seg sammen og danne såkalte aggregater på basis av tetraedronstrukturen. Ved lave temperaturer, under frysepunktet, blir denne tendens sterkere, og en mener nå at dette er grunnlaget for den homogene kjernedannelsen.

En iskjerne i en vandig løsning vil stadig være utsatt for et bombardement av vannmolekyler. Dersom energien i dette

bombardement er høy, f.eks. høy temperatur, kan vannmolekyler bli "slått ut" fra iskjernens overflate og gå ut i løsningen. Ved lavere energi kan vannmolekyler "feste" seg til kjerneoverflaten. Damptrykket er proporsjonalt med konveksiteten av overflaten, dvs. jo mindre krystallen er, desto større overflatekonveksitet, og derfor større damptrykk i forhold til en større krystall. Under ellers like forhold vil meget små krystaller derfor ha en tendens til å miste vannmolekyler og bli mindre, mens større krystaller vil ha en tendens til å oppta vannmolekyler og vokse. Når forholdene er slik at krystallen har lik ^{tilbakegang} mulighet til å øke eller minske i størrelse, er den ved sin kritiske størrelse. Den kritiske størrelsen er bl.a. avhengig av temperaturen. Jo lavere temperatur desto mindre er den kritiske størrelse, fordi avgangen av molekyler fra overflaten da er mindre. Rent vann i små dråper, f.eks. vanndamp i skyer, kan underkjøles helt ned til -40 - -50°C . Ved denne temperaturen er den kritiske størrelse så liten at aggregater av vannmolekyler kan danne iskjerner, se fig. 3.



Ved dampmetning
i væske

Fig. 3. Sambandet mellom temperatur og kritisk størrelse av en iskrystall. Ved temperaturer under -30°C nærmer den kritiske størrelse seg dimensjonen av vannmolekyl-aggregater (Meryman, 1966).

Homogen kjernedannelse er ikke det mest vanlige. Vann i "større mengder" kan bare underkjøles til litt under smeltepunktet. Det er antatt at krystallisasjonen her blir katalysert av fremmede partikler, dvs. ved heterogen kjernedannelse (jfr. kondensasjon av vanndamp til regn i atmosfæren). Heterogene krystallisasjonskjerner har gjerne en overflatekonfigurasjon som stemmer overens med iskrystallenes, f.eks. A_gNO_3 . Prinsippene for dannelse av iskrystaller, både den homogene og heterogene kjernedannelse, er imidlertid ikke helt klarlagt.

Amorf is har ingen bestemt strukturordning. Tidligere ble det hevdet at amorf is kunne dannes bl.a. ved langsom kondensasjon av vanndamp på meget kalde flater, dvs. ved svært rask nedkjøling. Nyere forskning har vist at det er meget vanskelig å unngå krystalldannelse, selv med den raskeste form for nedkjøling. Ved tilsetning av stoffer som hindrer krystalldannelse, f.eks. glyserol, er det mulig å få i stand amorf is.

Isens tilstand eller struktur beror bl.a. på temperaturen. Dersom temperaturen heves fra et lavere til et høyere nivå, kan isstrukturen forandres, såkalt rekrySTALLISASJON. Ved denne prosess øker krystallstørrelsen på bekostning av små krystaller. RekrySTALLISASJON kan lett iakttas under naturlige forhold både i snø og is.

Etter hvert som isdannelsen i vann eller i en annen væske fortsetter, vil krystallene vokse til isformasjoner av ulike slag. Hvilken type isformasjon som dannes, avhenger bl.a. av nedkjølingshastigheten. Er nedkjølingen langsom, vil det dannes velordnede hexagonale formasjoner.

Ved hurtigere nedkjøling blir isformasjonene mer uregelmessige, såkalte irregulære dendritter, og ved svært hurtig nedkjøling framkommer en slags "amorf" struktur, men som likevel viser seg å være krystallinsk. Denne formen kalles spheruliter (Luyet, 1966).

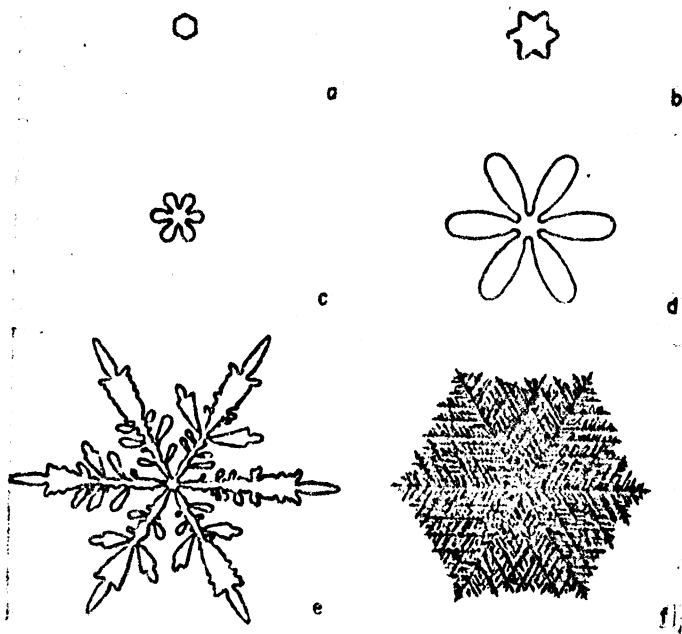


Fig. 4. Dannelse av hexagonale formasjoner (Luyet, 1966).

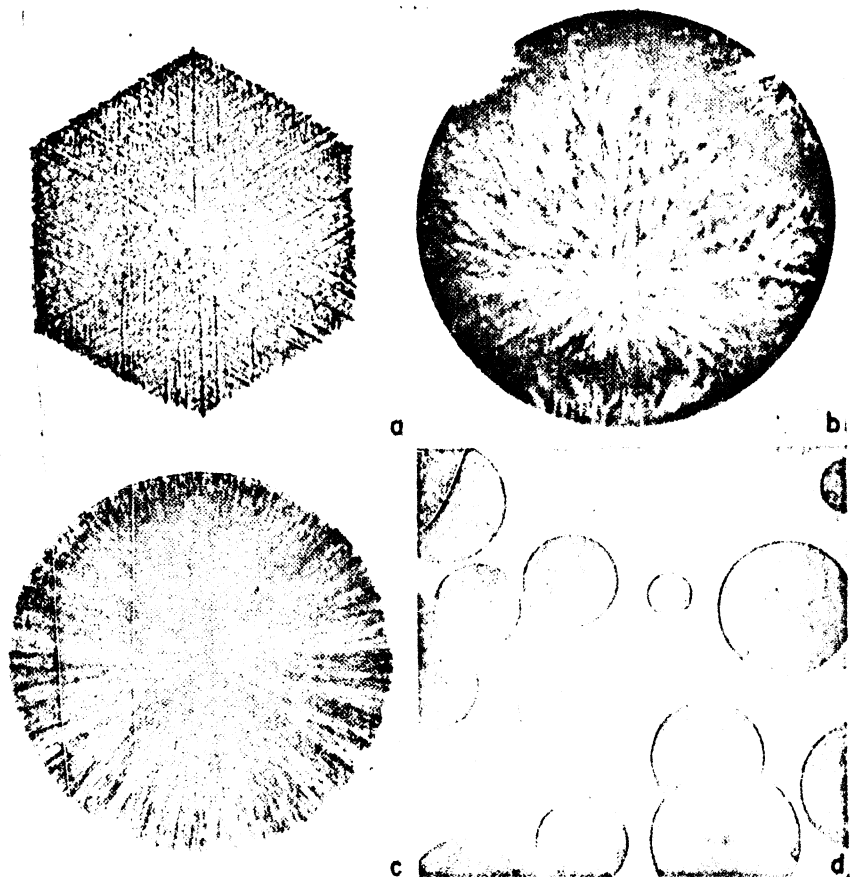


Fig. 5. De fire hovedtyper av isformasjoner. (a) Hexagonal form. (b) Uregelmessige dendritter. (c og d) Spheruliter (Luyet, 1966).

Uttrykk som langsom, hurtig og svært hurtig nedkjøling er upresise uten en nærmere forklaring. Som rettesnor kan følgende verdier anføres:

| <u>Temp., °C</u> | <u>Tid</u> | <u>Benevning</u> |
|------------------|-------------------|------------------|
| 0 til -190 | 2 sek. el. mindre | Svært hurtig |
| 0 til - 79 | 2 sek. til 5 min. | Hurtig |
| 0 til - 79 | 10 min. el. mer | Langsom |
| 0 til - 20 | 1 time el. mer | Svært langsom |

Ved frysing av cellepreparater blir gjerne en temperatur-senking på 1° pr. minutt angitt som langsom nedkjøling. Nedkjølingshastigheter på opptil 100 000° pr. sekund blir også angitt.

2. Frysing av løsninger

En løsning er å betrakte som et homogent system selv om den inneholder oppløste stoffer av forskjellig slag. Flere av løsningenes typiske fysiske og fysiologiske egenskaper beror på antall partikler av oppløst stoff. Det gjelder f.eks. senkning av kokepunkt og frysepunkt og økning av osmotisk potensial.

Løses et stoff i vann, vil damptrykket av vann bli redusert ved hvilken som helst temperatur. Damptrykket beror på hastigheten av evaporasjon og kondensasjon av vannmolekyler ved overflaten. Damptrykket avtar med konsentrasjonen av oppløste stoffer, fordi antallet av vannmolekyler pr. overflateenhet blir redusert. Dette forhold kan uttrykkes slik:

$$\frac{P_0 - P}{P_0} = \frac{n_1}{n_1 + n_2}$$

der P_0 og P er løsningsmidlets resp. løsningens damptrykk, og n_1 og n_2 er antall moler av oppløst stoff resp. løsnings-

middel. Et eksempel: I en vandig løsning har vi at $n_2 = 55.49$ (antall gram-molekylvekter pr. 1 000 g vann). For en 1 molal løsning får vi:

$$\frac{1}{1 + 55.49} = \underline{0.0177}$$

Dette betyr at vanndamptrykket i en 1 molal løsning er 1.77% mindre enn for vann alene, og løsningen er i vanndamptrykklikevekt med relativ fuktighet på 98.23%. Dette kalles også vannaktiviteten, a_w , her lik 0.9823. Under ideelle forhold er vannaktiviteten uavhengig av temperaturen, men så snart frost og dermed isdannelse inntreer, vil konsentrasjonen stige inntil løsningen er i damptrykklikevekt med isen. Damptrykket over is faller langt raskere med synkende temperatur enn damptrykket over vann. Dette anskueliggjøres nettopp ved at konsentrasjonen i en løsning stiger etter hvert som vannet fryser til is.

Vannmolekylene i en løsning vil bli spredd fra hverandre, mer eller mindre, alt etter konsentrasjon av oppløste stoffer. Når temperaturen synker til vannets frysepunkt, blir det derfor vanskelig for vannmolekylene å nå hverandre og danne isstruktur. Frysepunktet av en slik løsning vil derfor nedsettes, hvor mye beror på mengden av oppløst stoff.

Frysepunktsenkningen henger også sammen med graden av underkjøling. Jo sterkere underkjøling, desto større er frysepunktsenkningen. Når isdannelsen i en underkjølt løsning starter, stiger temperaturen raskt til løsningens frysepunkt. Men løsningen blir samtidig mer konsentrert p.g.a. isdannelsen, og det observerte frysepunkt gjelder derfor for den mer konsentrerte løsningen og ikke for den opprinnelige. Det er derfor nødvendig å nytte en korreksjonsfaktor, dersom graden av underkjøling varierer (Walter, 1936).

Det som her er sagt om kjemiske og fysiske forhold i løsninger, gjelder ikke dersom det oppløste stoffet undergår dissosiasjon, f.eks. elektrolytter.

Frysing av en løsning skjer i to faser: Primær krystallisasjon, dvs. krystallisasjon av vannet i løsningen, og sekundær krystallisasjon, som innebærer at det oppløste stoff og løsningen i sin helhet fryser. Hvis f.eks. en underkjølt NaCl-løsning podes med en iskrystall, vil den ta til å fryse og temperaturen stiger til løsningens frysepunkt. Ved fortsatt nedkjøling dannes mere is, og konsentrasjonen øker. Samtidig vil et mindre volum løsning være i likevekt med et større volum is. Ved -21.8°C har konsentrasjonen av NaCl nådd et maksimum på ca. 30 g prosent, eller 5.2 molar. Dette kalles løsningens eutektiske punkt, og -21.8°C er den laveste temperatur ved hvilken en NaCl-løsning kan være flytende og i likevekt med fast NaCl og is. Temperaturen i løsningen vil holde seg ved -21.8°C inntil alt vann er frosset og all NaCl er felt ut, deretter synker temperaturen i massen.

En skal gi noen eksempler på eutektisk temperatur for ulike elektrolytt-løsninger:

| | | | |
|------------------------|------------------------|-----------------|-------------------------|
| KNO_3 | -2.9°C | NaCl | -21.8°C |
| KCl | -11.1 " | MgCl_2 | -33.6 " |
| NH_4Cl | -15.8 " | CaCl_2 | -54.9 " |

Noen elektrolytter danner hydrater med vann, dvs. vannet krystalliseres rundt saltet, f.eks. CaCl_2 , andre danner krystallinsk salt og krystallinsk is, f.eks. KCl, mens atter andre danner både hydrat og is, f.eks. NaCl.

Flere stoffer danner ikke krystallinske "eutektiks". Som et eksempel kan nevnes glyserol, $\text{C}_3\text{H}_3(\text{OH})_3$. Fryses en oppløsning av glyserol i vann, vil vannet krystallisere ut til konsentrasjonen har nådd ca. 63%. Senkes temperaturen ytterligere, vil ikke mere vann krystallisere ut, og den resterende løsning går langsomt over i en "glassaktig" form, en slags amorf struktur. Dersom glyserolløsningen inneholder et salt, f.eks. NaCl, oppfører den seg på samme måte. Saltet holder seg i oppløsning i glyserol-vannkomplekset, og det

vil inngå i den "amorfe" strukturen sammen med glyserol og vann, når temperaturen blir lav nok. Dette er en av grunnene til at glyserol egner seg som beskyttelsesmiddel ved frysing av levende celler og cellevev.

3. Frostbeskyttende stoffer

Det har lenge vært kjent at enkelte kjemiske forbindelser kan hindre frostskafer ved frysing av levende biologisk materiale. Glyserol er det mest anvendte beskyttende middel ved frysing og lagring av dyriske celler, f.eks. røde blodceller og spermieceller. For at et stoff skal ha frostbeskyttende virkning, må det kunne danne forbindelse med vann gjennom hydrogenbånd for derved å hindre at vannet fryser til is. Videre må stoffet kunne tjene som oppløsningsmiddel for økt konsentrasjon av elektrolytter, og det må kunne trenge igjennom celledmembranene. Mange andre stoffer har vist god frostbeskyttende virkning, f.eks. dimetyl sulfoxid, $\text{CH}_3 \text{SO} \text{CH}_3$, (DMSO), etylen glycol. $\text{CH}_2\text{OH} \text{CH}_2\text{OH}$, dietyl glycol. $\text{O}(\text{CH}_2 \text{CH}_2\text{OH})_2$ m.fl. Karakteristisk for disse stoffene er at de danner tyktflytende væsker, som vanskelig krystalliserer selv ved svært lave temperaturer.

Også ved frysing av plantevev er det påvist beskyttende virkning av ulike stoffer. En har også prøvd å øke frostresistensen ved å sprøyte slike stoffer på hele planter, men resultatene har bare delvis vært positive (Levitt, 1966).

4. "Bundet vann"

En del av det totale vanninnholdet i levende organismer blir gjerne kalt bundet vann fordi det er holdt mer eller mindre fast til tørrstoffet. Denne vannkomponenten er delvis bundet til kolloidale strukturer og delvis til osmotisk aktive stoffer som f.eks. sukker. Det finnes ingen klar grense mellom bundet vann på den ene siden og fritt vann på

den annen. Det vil alltid være en "overgangssone" mellom molekylsjiktene nærmest partiklene og det vannet som utgjør dispersjonsmediet. Alt fritt vann er heller ikke like fritt slik at det lett lar seg skille ut ved frysing eller på annen måte. En del av det frie vannet inngår som inklusjoner i små porer eller tynne filmer mellom strukturer som bare er noen molekyllag i diameter, f.eks. i cellevegger og membraner. Damptrykket blir i slike tilfelle sterkt redusert og det øker båndstyrken i hydrogenbåndene. Dette vannet krystalliserer derfor ikke selv ved svært lave frysetemperaturer.

Det har vært diskutert om det finnes en vannkomponent i levende celler som kan betraktes som absolutt bundet, eller om det innstiller seg en likevekt mellom vann og is ved hvilken som helst frysetemperatur. Ved en slik likevekttilstand vil det være en stadig utbytting av vannmolekyler mellom is og vann. Ved frysing av en glyserolløsning med en konsentrasjon på ca. 50%, tok det ca. to uker ved -40°C før det innstilte seg likevekt mellom is og løsningen. Dette viser at utfrysing av vann kan være en svært langsom prosess. Ut fra energinivået i hydrogenbåndene, ca. 5-8 kcal/mol, er det lite sannsynlig at noe vann er så sterkt bundet at det ikke kan fryse.

Bundet vann kan defineres på ulike måter. Det kan f.eks. defineres som det vann som ikke fryser, eller som det vann som ikke inngår i løsninger. I begge tilfeller vil mengden, i større eller mindre grad, variere med frysetemperaturen. Dette går frem av sammenstillingen i tabell 1. Tallene gjelder for en undersøkelse i muskelvev, 100 g friskvekt og 23 g tørrvekt (Meryman, 1966).

Tabell 1. Fritt og bundet vann som funksjon av temperaturen.

| Temperatur °C | Total mengde ufrosset vann g | Ufrosset fritt vann g | Bundet vann g |
|------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| -1.0 | 77.0 | 70.3 | 6.7 |
| -4.7 | 19.5 | 15.1 | 4.4 |
| -11.6 | 11.4 | 6.6 | 4.8 |
| -16.0 | 9.2 | 5.1 | 4.1 |
| -21.9 | 7.8 | 4.0 | 3.8 |

Tallene viser at dersom mengden av bundet vann blir definert som total mengde ufrosset vann, 2.kollonne i tabellen, vil mengden variere svært mye med frysetemperaturen. Dersom det defineres som det vann som ikke inngår i løsninger, 4.kollonne, er verdiene langt mindre, men også her varierer mengden med frysetemperaturen. Også ved bruk av andre metoder vil mengden, i noen grad, variere med temperaturen. Det er derfor svært vanskelig å bestemme innholdet av bundet vann på en tilfredsstillende måte, og det finnes en rekke forskjellige fremgangsmåter. Mengden av bundet vann i levende organismer varierer svært mye. Det kan utgjøre fra ca. 5 til vel 30% av den totale vannmengden.

III. Mekanismen for frost i levende organismer

1. Intra- og extracellulær frysing

Det viktigste som skjer når levende organismer fryser, er at mer eller mindre av vannet i cellevevet går over til is. Alle biokjemiske og fysiologiske følger av frost er derfor direkte eller indirekte konsekvenser av dette forhold.

Alle celler som har et aktivt stoffskifte, vil være omgitt av mer eller mindre vann. Stort sett går det fram av de fleste undersøkelser at det extracellulære mediet fryser før celleinnholdet, dersom nedkjølingen er forholdsvis langsom.

Årsaken til dette er ikke helt klarlagt. Særlig i dyrisk vev er det vanskelig å forklare hvorfor isen først dannes utenfor cellene. I enkelte tilfelle har celleinnholdet noe lavere frysepunkt enn den extracellulære veskefasen, og det kan være grunnen til at isen først dannes utenfor cellene. Men i andre tilfelle er det ikke påvist sikker forskjell i konsentrasjonen, og om det er en forskjell, så er den trolig for liten til å influere på isdannelsen.

Vannet inne i cellene kan fryse ut på to måter. Det kan fryse inne i cellene, dvs. intracellulært, eller det kan diffundere ut av cellene og fryse extracellulært. Langsom nedkjøling fører som regel alltid til extracellulær isdannelse. Når det er dannet is utenfor cellene og kjølingen er langsom, vil vann fra cytoplasmaet diffundere ut så lenge permeabiliteten i cellemembranen fungerer. Damptrykket over den extracellulære isen avtar sterkt med synkende temperatur, og vannet trekkes derfor ut fra cellene og fryser utenfor. Denne prosess er noe forskjellig hos dyr og planter. I dyrisk vev er cellene adskilt av en tyntflytende substans, en kolloidal løsning av proteiner, uorganiske joner og andre stoffer. Også her dannes isen extracellulært ved langsom nedkjøling. Etter hvert som vannet utenfor cellene fryser, blir intercellularvesken hypertenisk og vann fra cytoplasmaet trekkes ut ved osmose.

Både hos dyr og planter fører extracellulær isdannelse til at cellene dehydreres og skrumper sammen, se fig. 6. Der-
som cellene er drept av frosten, kan celleveggene likevel reabsorbere vann under opptiningen og gå tilbake til sin opprinnelige posisjon, mens protoplasten^{mat} forblir sammen-
skrumpet. Hvis frysingen ikke har ført til skade, vil cellene under opptiningen reabsorbere vann og gjenvinne turgor. Hos planter fylles cellemellomrommene samtidig med luft.

Ved relativt hurtig nedkjøling kan cellene fryse intracellulært. Denne form for isdannelse fører så å si alltid til celledød. Dette gjelder når iskrystallene er så store at

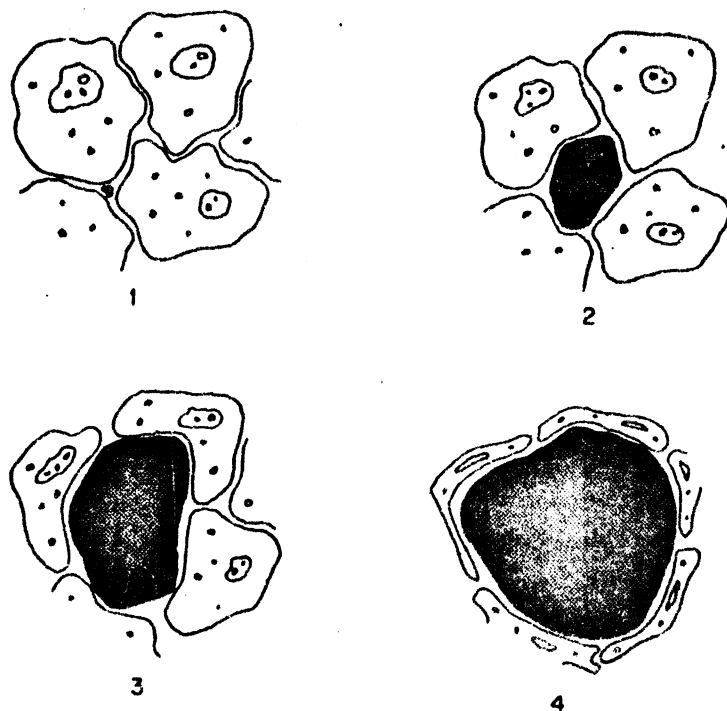


Fig. 6. Skjematisk fremstilling av extracellulær isdannelse med dehydrering av cellene (Meryman, 1966).

de kan observeres i vanlig mikroskop. Er derimot nedkjølingen så hurtig at iskrystallene inne i cellene får submikroskopisk størrelse, dvs. en slags amorf struktur, kan cellene, under visse forutsetninger, overleve frysingen. Hos planter er det ikke påvist intracellulær isdannelse under naturlige vilkår, men det kan trolig forekomme, f.eks. under ekstreme strålingsforhold.

Levende celler og organismer kan tåle til dels høy grad av underkjøling, dvs. nedkjøling under frysepunktet uten isdannelse. Ulike deler av planter som f.eks. nåler av furu og knopper av forskjellige busker, har vært underkjølt helt ned til -20 -30°C , gjærceller ned til -16° og insekter ned til -40°C . Bestemte arter av arktisk fisk lever i lange perioder i underkjølt tilstand. De oppgitte temperaturene betyr ikke noen absolutt grense for å overleve underkjøling, men det har ikke vært mulig å opprettholde underkjøling ved lavere temperaturer. Det er sjelden påvist skade av under-

kjøling eller temperatursjokk.

Celleinnholdet er sammensatt av mange forskjellige stoffer og stoffgrupper. Ved temperaturer under frysepunktet, skulle derfor cellene lett kunne fryse på grunn av hetrogen kjernedannelse. Men ettersom cellene kan underkjøles i betydelig grad, er det klart at disse stoffene ikke umiddelbart kan fungere som kjerner for isdannelse. Grunnen er at mange av stoffene forekommer i løsning og ikke i krystallisk form. Strukturelle proteiner er på en måte ikke i "løsning", men heller ikke disse synes å fungere som kjernedannere uten ved svært lave temperaturer, sannsynligvis fordi partiklene er for små.

Dersom cellene er omgitt av is, skulle dette lett føre til "poding" av celleinnholdet. Det er imidlertid påvist at cytoplasmaet kan underkjøles helt ned til -13°C selv om det er extracellulær is til stede. Plasmamembranen virker som en barriere og hindrer at celleinnholdet blir "podet" av is utenfra. Dette er påvist både i dyre- og plantevev (Mazur, 1966). Under frysing kan det dannes is mellom celleveggen og plasmamembranen, men uten at det dannes is inne i protoplasten.

Dersom det er extracellulær is tilstede og cellene er underkjølt, er damptrykket over det intracellulære, underkjølte vannet høyere enn det over den extracellulære isen. Damptrykklikevekt kan gjenopprettes enten ved at cellene fryser intracellulært, eller ved at det intracellulære, underkjølte vannet, p.g.a. damptrykkgradienten, flyter ut av cellene og fryser extracellulært. Hvorvidt den ene eller den andre form for isdannelse skal inntre, beror på mange ulike faktorer, bl.a. frysetemperatur, nedkjølingshastighet, permeabilitet i cellemembranene, konsentrasjon av stoffer i cellene, osv. Så lenge cellene kan kvitte seg med vannet hurtig nok etter hvert som temperaturen synker, er det liten fare for intracellulær frysing. For etter hvert som vannet flyter ut av cellene, vil konsentrasjonen av stoffer inne i cel-

lene øke, damptrykket synker, og frysepunktet for celleinnholdet settes tilsvarende ned.

Hos gjærceller er det på teoretisk grunnlag utført beregninger over andelen av underkjølt, intracellulært vann ved ulike frysetemperaturer og nedkjølingshastigheter. Disse beregningene viser at ved langsom nedkjøling, $1^{\circ}/\text{min.}$, vil vannet flyte ut fra cellene, og damptrykklikevekt kan dermed gjenopprettes før den kritiske temperatur for intracellulær frost er nådd. Ved hurtig nedkjøling er derimot en betydelig del av vannet tilbake i cellene ved denne temperatur, og cellene kan derfor fryse intracellulært.

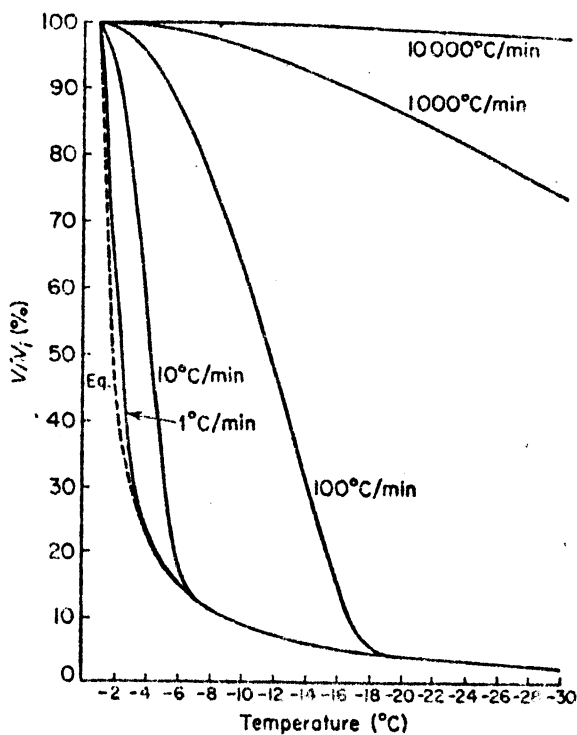


Fig. 7. Beregnet andel av intracellulært, underkjølt vann som er igjen ved ulike temperaturer hos gjærceller som er nedkjølt ved de angitte hastigheter. V_i = opprinnelig volum intracellulært vann. 1, 100, 1000 og 10 000 $^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ = nedkjølingshastighet (Mazur, 1963b).

Lignende beregninger er utført ved ulik størrelse hos gjær-cellene. Store celler inneholder prosentvis mer underkjølt vann ved en bestemt temperatur og nedkjølingshastighet enn små celler, og de vil derfor snarere kunne fryse intracellulært (Mazur, 1966).

Det har vært mye diskusjon om hvordan de første extracellulære iskrystallene blir dannet, og på hvilken måte isen sprer seg i vevet. Det er ennå uklart hvordan isen sprer seg i vevet hos planter som fryser under naturlige vilkår. I følge Sakai (1966) begynner frosten hos ulike treslag i bladene, eller den induseres gjennom lenticeller eller porer i barken hos trær som ikke har blad. Ellers blir det hevdet at isen først dannes i de store karene som er fylt med vann eller væske med svært lav konsentrasjon, og sprer seg derfra til cellemellomrom og cellevegger i hele planten. Men ikke alle planter har kar, og hos enkelte arter er kar og trakeider trange, slik at de neppe egner seg så godt for begynnende isdannelse. På våte eller fuktige planter dannes det utvendige iskrystaller (rim) når temperaturen synker under 0°C , og den utvendige isen kan "pode" det underliggende vev med is.

Som nevnt vil cellene skrumpe sammen etter hvert som ismengden i cellemellomrommene øker. Dersom temperaturlikevekt kommer i stand, vil damptrykket i og utenfor cellene jevne seg ut. Når celleinnholdet er i likevekt med extracellulær is hva angår både temperatur og damptrykk, så vil det være ved sitt frysepunkt. Planter kan derfor være frosset i lang tid ved konstant temperatur uten at det dannes is inne i cellene. I en slik tilstand vil det meste av plantevevet ha isfylte cellemellomrom. Det vil inneholde lite luft, delvis fordi strukturelle deler av vevet kontraherer under frysingen, og delvis fordi ismassen presser luften ut. Om vinteren kan trestammer splintres, ofte med harde smell, fordi vevet trekker seg sammen, samtidig med en volumøkning av vannet under frysingen.

2. Toleranse mot frost hos planter

Det er stor forskjell i frostresistens hos ulike organismer både innen dyre- og planteriket. Skadene som påføres en organisme ved frysing beror ikke bare på frysetemperaturen, men også på andre faktorer som f.eks. nedkjølings- og opptiningshastighet, frysetid etc.

Enkelte organismer kan til en viss grad unngå frost selv om temperaturen synker langt under deres frysepunkt. Noen insekter kan f.eks. overleve svært lave frysetemperaturer i underkjølt tilstand. Også hos planter er det påvist sterk underkjøling, men en slik tilstand er svært ustabil, særlig på grunn av bevegelser hos plantene, og dersom isdannelse kommer i stand hos underkjølte planter, kan skadene bli store fordi det kan føre til intracellulær frysing.

Plantene har også liten eller ingen evne til å isolere seg mot kulde. Kambieceller og andre levende celler i trestammer er i noen grad beskyttet mot frost av tykke barklag, men dette har liten betydning fordi isdannelse først kan opptre i bladene eller i porer i barken og spre seg til det indre av stammene. Temperatursvingningene i plantevevet kan dessuten i visse tilfelle bli langt større enn i luften omkring. Under forhold med sterk utstråling, kan temperaturen i plantevevet bli betydelig lavere enn lufttemperaturen, og ved sterk innstråling kan temperaturen i plantevevet bli langt høyere enn lufttemperaturen.

I barken hos trær er det funnet svært store temperaturforskjeller mellom nord- og sørsiden av stammene, se fig. 8. Det er også påvist lavere frostresistens hos barkceller på sørsiden av en trestamme enn på nordsiden, fordi sterk oppvarming om dagen førte til avherdning av barkcellene på sørsiden (Sakai, 1966).

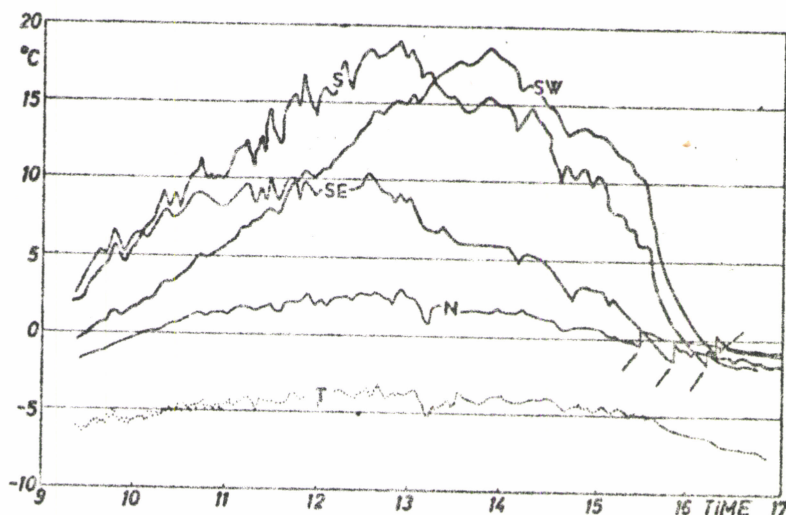


Fig. 8. Temperaturvariasjon i barken (0.5 cm dypt) hos poppeltre til ulike tider i døgnet en dag midt-vinters. Lufttemperaturen T ble målt 70 cm over snøoverflaten. S = sør, SE = sørøst, SW = sør-vest og N = nord (Sakai, 1966).

Tropiske plantearter som f.eks. tobakk, ris, bomull m.fl., kan bli skadd dersom temperaturen synker ned mot 0°C (+1 til $+5^{\circ}\text{C}$), dvs. uten at plantevevet fryser. Dette blir kalt kjølingsskader. Det kan ikke gis noen uttømmende forklaring på årsakene til kjølingsskadene. Forstyrrelser i visse stoffskifteprosesser som syntese og nedbryting av proteinstoffer, overvekt av respirasjon i forhold til fotosyntese, redusert vannopptak osv., er sannsynligvis noen av årsakene som ligger til grunn for skadene. Planter som vokser i nordligere områder, blir ikke skadd på de vegetative organene av temperaturer over 0°C . Hos enkelte kornarter, f.eks. bygg, kan imidlertid pollenet bli ødelagt dersom temperaturen synker ned til $+2 - +3^{\circ}\text{C}$ like etter aksskyting.

Vanlig potet tåler svært lite frost, men enkelte ville arter fra Sør-Amerika og Russland kan tåle -8 til -10°C uten å ta skade, men disse artene gir svært liten eller ingen avling. Hos vårkornartene kan spireevnen bli nedsatt p.g.a. frost

dersom temperaturen synker ned til -2 til -5°C på et tidlig modningsstadium. Ved fullmodning, og dersom vanninnholdet er under ca. 25%, kan kornet tåle ned til -10°C uten å ta nevneverdig skade. Hardføre arter og sorter av ulike engvekster og høstkorn kan tåle svært lave vintertemperaturer. Det samme er tilfelle for hardføre typer av frukttrær og bærbusker. Men blomstene hos frukttrærne er svært ømfintlige for frost. Enkelte skogstreslag, f.eks. sibirisk furu (*Pinus pumila*), kan tåle selv de laveste temperaturer under naturlige forhold. Mange arktiske og alpine planteslag er meget frostresistente. Et eksempel på dette er den arktiske planten *Cochlearia fenestrata*, en skjørbuksurt, som i full blomst kan overleve temperatur mellom -40 og -50°C . Noe lignende er tilfelle for isssoleie, *Ranunculus glasialis*, som vokser på høye fjelltopper.

I tørr tilstand kan plantene tåle de laveste temperaturer fordi vannet som er igjen er "bundet" og det kan derfor ikke fryse. Frø, sporer, pollenkorn etc. har vært kjølt ned til nesten -273°C i flere timer uten skade. Hvetekorn med et vanninnhold på ca. 11%, har vært nedkjølt til -190°C uten at kornet ble skadd (Levitt, 1956).

Ved spesiell fryseteknikk kan plantevev i vanlig fuktig tilstand overleve svært lave frysetemperaturer. Dette er mulig dersom nedfrysingen er så hurtig at iskrystallene i cellene får submikroskopisk størrelse. Opptiningen må også være svært hurtig, hvis cellene skal overleve f.eks. -196°C . Er opptiningen langsom, vil den "amorfe" isen rekrystallisere, dvs. gå over til større krystaller, og det kan forårsake celledød. For å oppnå "amorfisering" av celleinnholdet, må nedkjølingen være fra flere hundre til flere tusen grader pr. sekund. Dette er mulig ved å lage tynne preparater med ikke for høyt vanninnhold, og å føre disse direkte i f.eks. flytende nitrogen, ca. -196° , flytende hydrogen ca. -250° , eller flytende helium ca. -269°C .

Hvis vanninnholdet er tilstrekkelig lavt og fryseteknikken rik-

tig tilpasset, kan hele organer overleve svært lave temperaturer. Kvister av forskjellige treslag er lagret i flere måneder ved -196°C uten skade. De er først frosset langsomt ned til en temperatur som ligger på grensen av hva de normalt kan tåle, f.eks. -30°C . Ved denne temperaturen fryser det meste av vannet ut extracellulært. Deretter er de ført direkte over i flytende nitrogen. Etter denne behandlingen må opptiningen skje like hurtig som nedkjølingen, dersom cellene skal overleve frysingen (Sakai, 1965). En kan også nevne at herdete blad av en furuart ble frosset ned svært langsomt, $3^{\circ}/\text{time}$, til -189° uten skade (Parker, 1960).

Disse resultatene tyder på at levende protoplasma, endog med relativt høyt vanninnhold, kan kjøles ned til svært lave temperaturer uten at det oppstår skade av betydning, dersom den rette metoden blir brukt.

Ved mer konvensjonell fryseteknikk, f.eks. frysing av hele planter i fryseskap eller fryseboks, er det i flere undersøkelser påvist større skade ved forholdsvis rask nedkjøling og opptining enn ved langsom. Men i mange tilfelle er det ikke funnet en slik sammenheng. Ikke så sjelden mangler en presis definisjon av hva det i hvert enkelt tilfelle er ment med "hurtig" og "langsom" frysing og opptining. Dersom en plante blir frosset tilstrekkelig under den temperatur som er nødvendig for at den skal fryse ihjel, så vil den dø uansett hvor langsom både frysingen og opptiningen er. Blir den derimot nedkjølt til en temperatur som ligger godt over plantens "dødspunkt", så vil den overleve frysingen uansett nedkjølings- og opptiningshastighet. I mellom disse ytterpunkter er det sannsynligvis en sone der både nedkjølings- og opptiningshastigheten virker på omfanget av frostskaedene. Innenfor en slik sone er virkningen av nedkjølingshastigheten sannsynligvis mer viktig, og er også lettere å forklare, enn virkningen av opptiningshastigheten.

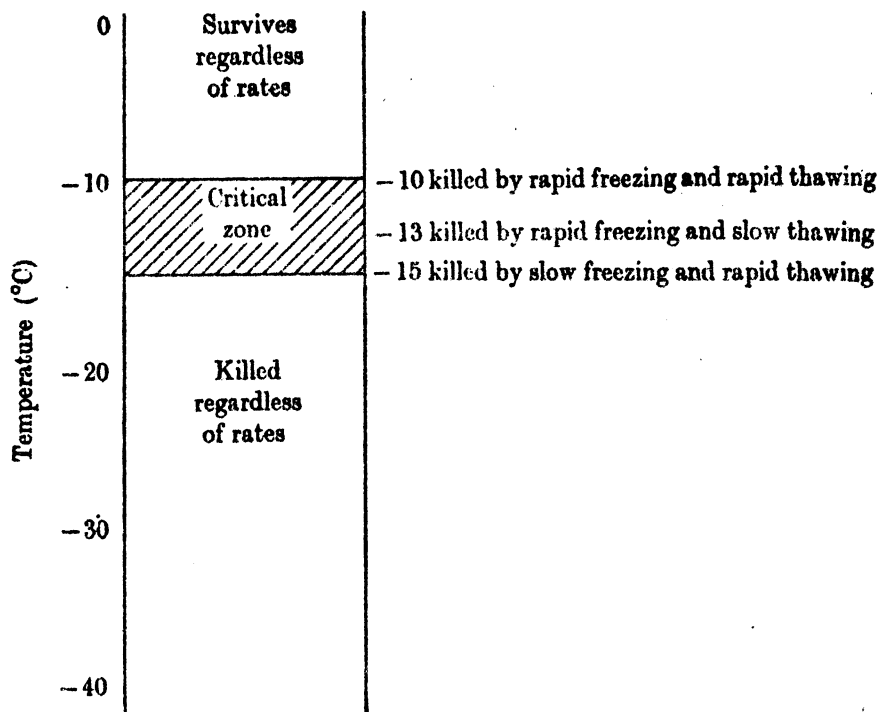


Fig. 9. Skisse som viser et eksempel på "kritisk sone" ved frysing av planter (Levitt, 1966).

Som før nevnt, kan cellene fryse innvendig dersom nedkjølingen skjer raskt, og intracellulær isdannelse fører alltid til celledød. Ved en og samme temperatur kan rask nedkjøling derfor føre til store frostska- | 2
der, mens langsom nedkjøling ikke skader plantevevet. Unntak herfra har en vært inne på tidligere, nemlig ved anvendelse av spesiell fryseteknikk i laboratoriet.

Ved frysing av hele planter i fryseskap e.l. regnes 1-2°C pr. time som langsom nedkjøling. Under naturlige forhold er ofte nedkjølingshastigheten enda mindre. En nedkjølingshastighet på 5-15°C pr. time kan føre til intracellulær isdannelse hos hele planter.

Årsaken til at hurtig opptining kan føre til større skader enn langsom, er ikke kjent. Gjentatt frysing og tining kan drepe plantene ved temperaturer der én gangs frysing ikke fører til skade. Lengden av fryseperioden kan også virke inn

på omfanget av skadene, men neppe innenfor korte tidsrom, f.eks. noen timer.

Frostskader i hele planter kan vanligvis ikke påvises før en tid etter at plantene er tint opp. Det har derfor vært adskillig diskusjon om når skadene inntreffer. Ved intracellulær frost er det antatt at skadene skjer under selve frysingen, men det finnes unntak. Ved extracellulær frost kan skadene trolig inntre både under selve frysingen og under opptiningen.

I enkelte tilfelle kan frostskaadene påvises så snart plantene fryser. Det er tilfelle hos planter som skifter farge eller sender ut en spesiell duft når de er drept. Det er også gitt eksempler på at frostskaadene først inntre en tid etter opptiningen av plantevevet.

De overjordiske organene hos plantene tåler som regel langt mer frost enn røttene. Det er også funnet mindre frostresistens hos røtter som vokser dypt ned i jorda enn hos de som vokser like under jordoverflaten. Hos høstoljevekster fant Torsell (1959) høyest frostresistens i terminale skudd, noe mindre i den hypokotyle stengeldelen, og minst i røttene. Hos de samme vekstene fant Torsell og Hellström (1955) at graden av frostskaade i ledningsvevet sannsynligvis var avgjørende for plantenes evne til å overleve frysingen. Også hos rødkløver og luserne er den nederste delen av hovedrota mest ømfintlig for frost (Sjøseth, 1957).

Hos treaktige vekster tåler både marg, ved og den innerste delen av barken mindre frost enn parenkymcellene i de ytre barklagene, mens kambicellene ser ut til å tåle mest frost. Celler i meristemer er i mange tilfelle funnet å være mer frostresistente enn andre celler, men dette gjelder ikke generelt. I røtter hos gras (*Poa* sp.) som var drept av frost, fant en at skadene var mest utbredt i cellene inntil ledningsstrengene. Dette cellevevet inneholder meristemceller som er nødvendig for dannelse av nye røtter slik at plantene kan regenerere og overleve (Beard og Olien, 1963).

Blomster, springende knopper, nydannede blad og skudd etc., er gjerne de organene som først blir skadd av frost, mens fullt utviklede organer er mer hardføre. Men resultatene er imidlertid svært variable i så måte.

I røtter hos hvete, rug og erter tålte rotbark og rothår minst frost, sentralsylinderen noe mer, mens cellene i meristemer var mest frostresistente (Biebl, 1962).

Forskjellen i frostresistens mellom ulike organer og cellevev hos plantene beror sannsynligvis på ulike plasmatiske forhold i cellene. I hvilken grad disse forhold gir utslag, beror både på indre og ytre faktorer. Plantenes evne til å overleve frost beror ikke bare på de organer eller cellevev som tåler mest frost, men i høy grad på frostresistensen hos de organer eller cellevev som er mest nødvendige for at plantene skal kunne regenerere og overleve.

3. Årsaker til frostskafer og frostresistens

Det er i tidens løp utført et meget omfattende forskningsarbeide for å finne ut hva som er den egentlige årsak til at cellene dør av frost og videre hva som ligger til grunn for ulik grad av frostresistens. En skal her kort nevne noen av de teorier og hypoteser som er satt fram i denne sammenheng.

I eldre tid mente en at ulik frostresistens hos planter berodde på ulik evne til å produsere nok respirasjonsvarme for å hindre frost i vevet. Seinere ble frostskaferne forklart ved sprengning av cellene på grunn av ekspansjon ved isdannelsen. Det ble imidlertid påvist at cellene ikke sprenges ved frysing fordi isen normalt dannes i cellemellomrommene, og at vevet kontraherer i stedet for å ekspandere under frysing.

Frostfelling av proteinstoffene er også fremsatt som forklaring på frostskaferne. Når vannet fryser ut av cellene, stiger

konsentrasjonen av forskjellige salter, og det kan føre til utfelling av proteinstoffene. Ved å sette sukker til presssaft fra planter, kan utfellingen hindres. Frostresistens er derfor satt i sammenheng med plantenes evne til å akkumulere sukker som kan beskytte proteinstoffene mot utfelling.

Det er gjort mange innvendinger mot denne teorien. Enkelte organismer, f.eks. noen algetyper med ekstremt høyt saltinnhold, har vist seg å tåle meget lave frysetemperaturer. En har også eksempler på økt frostresistens ved å indusere saltopptak. Videre er mange proteinstoffer oppløselige i sterke saltløsninger.

Noen forskere mener at det skjer en utfelling av plasmaproteiner p.g.a. dehydrering under extracellulær frysing, uten at det har noen direkte sammenheng med økt saltkonsentrasjon. Proteinutfellingen kan også skyldes økt konsentrasjon av organiske syrer. I muskelvev hos fisk mener en at denatureringen av proteinstoffene ved frysing skyldes økt konsentrasjon av frie fettsyrer.

En annen forklaring går ut på at protoplasmaet skades ad mekanisk vei p.g.a. sterk dehydrering ved extracellulær frost. Når cellene skrumper sammen, kan protoplasmastrukturen bli forstyrret slik at det oppstår skade og celledød. Men det er ennå ikke klarlagt hvilke forstyrrelser som inntreffer, og på hvilken måte skadene kommer i stand.

Levitt (1966) mener at spesifikke intracellulære stoffer som strukturelle proteiner, er hovedårsaken til frostskaader og frostresistens. Proteinmolekylene blir, p.g.a. dehydrering under frysingen, ført inntil hverandre og bundet sammen med disulfidbånd. Når så cellene reabsorberer vann ved opptining, kan ikke den opprinnelige proteinstruktur gjenopprettes, fordi disulfidbåndene holder molekylene tett sammen. Proteinene vil derfor denaturere og cellene kan dø; se fig. 10.

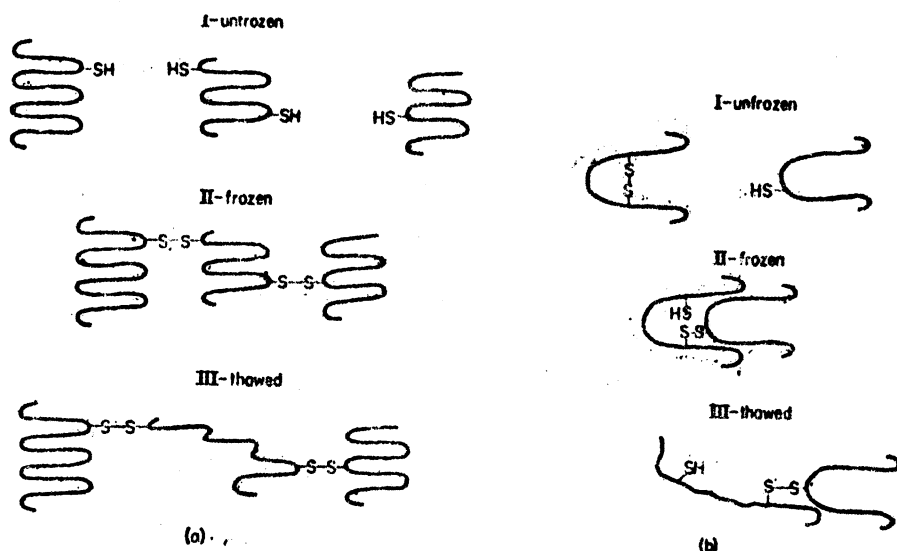


Fig. 10. Hypotetisk fremstilling av mekanismen for proteinforstyrrelse p.g.a. intermolekulære disulfidbånd (SS) (Levitt, 1962).

Som bevis for denne teori er det funnet økt innhold av protein-SH etter herdning. Videre er det påvist økt innhold av protein-SS når frost førte til skade, men ingen økning når plantene ikke ble skadd av frost.

Flere forskere mener at cellene bare kan skades av frost ved intracellulær isdannelse, dvs. når isen dannes inne i cellene. Direkte observasjoner i plantevev under naturlige forhold har imidlertid vist at isen dannes extracellulært, og at dette fører til dehydrering av celleinnholdet. Som tidligere nevnt, kan en likevel ikke se bort fra at det i spesielle tilfelle kan forekomme intracellulær frost hos planter også under naturlige forhold.

IV. Klimatiske og biologiske faktorer i samband med frost hos planter, spesielt i vegetasjonsperioden.

1. Frost i biologisk- og meteorologisk sammenheng.

Med frost i biologisk sammenheng menes som nevnt, at vann i

levende cellevev fryser til is. Frost i meteorologisk betydning kan defineres på ulike måter. Temperatur under 0°C blir vanligvis brukt som definisjon på frost i meteorologisk sammenheng, og det er det en i det følgende mener med dette begrep. Isdannelse i vevet hos de fleste planter kommer først i gang når temperaturen i omgivelsene synker noen grader under 0°C . Unntak herfra finner en hos svært frostømfintlige planter. Det samme vil være tilfelle dersom plantene er våte. Det utvendige vannet vil da fryse, og plantevevet blir "podet" med is utenfra.

Frysepunktet er svært forskjellig hos ulike planter, og det kan variere en del hos en og samme plante alt etter utviklingstrinn, vekstaktivitet, herdningsgrad etc. Lavt vanninnhold og dermed lavt damptrykk, høyt innhold av stoffer som binder vann, høy cellesaftkonsentrasjon etc., vil bidra til å senke frysepunktet. Hos svært mange plantearter ligger frysepunktet ved -2 til -5°C , men enkelte arter kan ha langt lavere frysepunkt, i alle fall i herdet tilstand. Frostømfintlige planter som f.eks. potet (riset) har et frysepunkt på ca. -1.5°C , men også hos slike vekster kan frysepunktet variere noe. Ulike organer hos en og samme plante kan også ha forskjellig frysepunkt.

Hvis det ikke er fritt vann på plantenes overflate, må temperaturen i omgivelsene synke noe under plantevevets frysepunkt før isdannelsen begynner. Dette kalles underkjølingspunktet. Når dette punktet er nådd, begynner isdannelsen, og p.g.a. frysevarmen, vil temperaturen stige raskt til plantevevets frysepunkt. Temperaturen i plantevevet vil holde seg ved dette nivå en tid, men synker så gradvis til temperaturen i omgivelsene. Dette går fram av figur 11.

Underkjølingspunktet kan variere svært mye hos en og samme plante, men det er ingen klar sammenheng mellom underkjølingspunkt og frostresistens (Kaku, 1964).

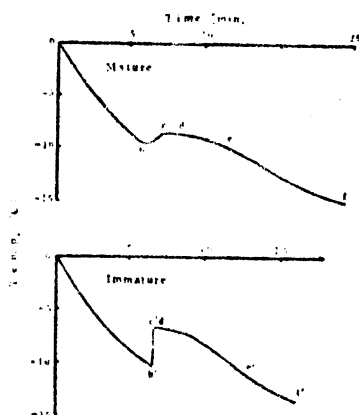


Fig. 11. Frysekurve for blad av Viburnum (Kaku, 1964).

Selv om plantene fryser, så behøver de ikke ta skade av frosten. Dette gjelder særlig for flerårige vekster i hvileperioden. Hos sommeranuelle vekster kan frost i vegetasjonsperioden føre til stor skade, selv om temperaturen bare synker 2-3 grader under 0°C .

Av det som er nevnt ovenfor, går det fram at frost i meteorologisk- og biologisk sammenheng ikke er identiske begreper. Da en del studenter ikke har gjennomgått kurs i meteorologi, skal en her nevne litt om frost i landbruksmeteorologisk sammenheng.

Frost i meteorologisk betydning kan inndeles på ulike måter. Frosten kan benevnes i forhold til det tidspunktet som den opptrer på, f.eks. vinterfrost, vårfrost, sommerfrost, høstfrost, nattefrost osv. Den kan også benevnes etter de meteorologiske forhold som opptrer i samband med frosten, f.eks. vindfrost, frost uten vind, barfrost osv. For å unngå misforståelser, kan det være hensiktsmessig å skille mellom frost i vegetasjonsperioden og frost i hvileperioden, dvs. vinterfrost. I vitenskapelig språkbruk betegnes frosten etter de

meteorologiske faktorer som ligger til grunn for dens opp-treden, f.eks. adveksjonsfrost (advektivfrost, sirkulasjonsfrost) og strålingsfrost (inversjonsfrost).

Adveksjonsfrost skyldes horisontal transport av kalde luftmasser, særlig fra nord og nordvest (polarluft). Det forekommer alltid mer eller mindre vind i samband med adveksjonsfrost, og en kan også kalle denne frosttype for vindfrost. På grunn av bevegelse i luftmassene, vil temperaturen være forholdsvis lik på forskjellige steder i terrenget.

Strålingsfrost forekommer i klare og vindstille netter. Utstrålingen blir større enn innstrålingen, og jordoverflaten blir avkjølt. Den sterkeste utstråling får en når luftfuktigheten er lav, fordi tilbakestrålingen fra atmosfæren da er svært liten. Luften nede ved jordoverflaten blir avkjølt ved ledning og konveksjon. Kald luft er som kjent tyngre enn varm luft, og den vil derfor flyte nedover i fordypninger i terrenget og danne kaldluftsjøer. Da det i slike situasjoner er vindstille, blir det en begrenset luftmengde som avkjøles og den kan derfor bli svært kald. Varmetransport fra luften over kaldluftsjiktet og nedover skjer ved ledning, og går derfor svært langsomt. Resultatet blir en meget stabil sjiktning av luftmassene nærmest bakken. Temperaturstigningen fra jordoverflaten og noen få meter over den kan bli stor, noe som går fram av figur 12.

Det er neppe helt korrekt å behandle adveksjonsfrost og strålingsfrost som to adskilte meteorologiske komponenter når det gjelder frost i vegetasjonsperioden. I tidsrommet april-oktober opptrer de to frosttypene sjelden eller aldri hver for seg. Strålingsfrost i denne perioden forekommer i samband med adveksjon av kjølige luftmasser, enten etter adveksjon, eller samtidig med den. Frosten benevnes etter den relative styrke av de to komponentene. Er adveksjonen i gang, slik at det er vind når utstrålingen begynner, betegnes frosten advek-

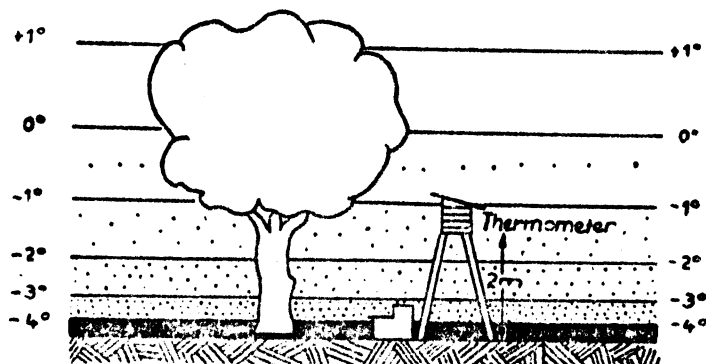


Fig. 12. Vertikal temperaturfordeling i en vindstille strålingsnatt (Schnelle, 1963).

sjonsfrost. Er derimot adveksjonen forbi, dvs. vindstille og ingen nevneverdig luftbevegelse, betegnes frosten strålingsfrost. En kan derfor ikke skille helt klart mellom årsakene til frosten i de to tilfellene. Vekselvirkningen mellom adveksjon av kalde luftmasser og strålingsfrost er vist i figur 13.

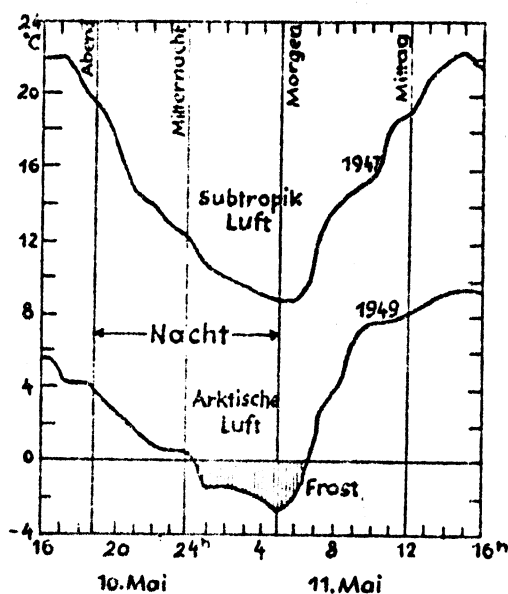


Fig. 13. Temperaturvariasjon 2 m over bakken i løpet av et døgn i to forskjellige år på samme sted (Schnelle, 1963).

De to kurvene i figuren viser forløpet av temperaturen i 2 m høyde i en klar natt, den 10. til 11. mai, på samme sted i to år, 1947 og 1949. Forløpet av de to kurvene er stor sett likt i begge årene, men bare i 1949 førte utstrålingen til frost. Årsaken til dette var at det i 1949 på forhånd (den 6. og 9. mai) var tilført kalde luftmasser. I dette tilfelle er det derfor en klar vekselvirkning mellom adveksjon av kjølig luft og strålingsfrost. Det er derfor to forutsetninger som må oppfylles om det skal bli frost i vegetasjonsperioden, nemlig adveksjon av kalde luftmasser, og klare netter med sterk utstråling. Det går fram av figuren at temperaturen er lavest tidlig om morgenen like før soloppgang. Frosten har i dette tilfelle vart i ca. 6 timer.

Den biologiske virkning av frost er sannsynligvis lik enten den opptrer i vegetasjonsperioden eller i vinterhalvåret. I begge tilfelle skjer det alt overveiende extracellulær isdannelse. Det er imidlertid sannsynlig at det i visse tilfelle kan forekomme intracellulær isdannelse hos enkelte vekster ved frost i vegetasjonsperioden. Under forhold med sterk utstråling og lav luftfuktighet, kan plantene bli underkjølt i nok så sterk grad. Hvis det kommer i stand isdannelse i sterkt underkjølte planter, f.eks. p.g.a. luftbevegelse e.l., kan frysingene skje så hurtig at cellene fryser innvendig. Frostømfintlige, sommeranuelle vekster har hverken evne eller mulighet til å herdes før frosten setter inn, og det er påvist at uherdet cellevev lettere fryser intracellulært enn herdet vev (Levitt, 1956, Olien, 1961). Som nevnt, fører intracellulær isdannelse under slike forhold til celledød.

Frost i vegetasjonsperioden kan i enkelte år føre til betydelig skade på ømfintlige vekster. Av jordbruksvekstene er det særlig poteter og vårkorn som er mest utsatt hos oss. Vanlig potet blir skadd av frost på riset når temperaturen synker noe under 0°C . Noen skade av betydning blir det vel først ved en temperatur på -2 til -4°C . Jo lavere temperatur desto lengre tid vil frosten vare, og det kan forsterke skadene i noen grad.

Frostskade på vårkorn forekommer særlig om høsten på selve kornkjernene. Hos oss er det havren som er mest utsatt. Den har sin største utbredelse i områder med hyppig frostfare om høsten, f.eks. Glåmdalen og de indre strøk av Østfold. Frostskadene kan føre til nedsatt avling og prisreduksjon p.g.a. dårlig kvalitet. Frostskadene fører videre til redusert spireevne, og kornet kan av den grunn bli uskikket til såvare. En skal gjenngi noen tall fra en undersøkelse over virkningen av frost på spireevnen hos havre (Sundstøl, 1966).

Tabell 2. Virkningen av frost på spireevnen hos havre.

| Frysedato | Vanninnhold % | Frysetid timer | Spireprosent | | | | |
|-----------|------------------|-------------------|-----------------|---------------|----|----|-----|
| | | | Ikke frosset | Temperatur °C | | | |
| | | | | -2.5 | -5 | -8 | -10 |
| 18/8 | 54 | 4 | 71 | 61 | 1 | 1 | 1 |
| 1/9 | 45 | 4 | 94 | 83 | 20 | 1 | 0 |
| 12/9 | 39 | 4 | 91 | 84 | 31 | 20 | 10 |
| 29/9 | 16 | 4 | 96 | 93 | 85 | | 91 |

En ser at på et svært tidlig modningsstadium blir spireevnen redusert allerede ved -2.5°C . Etter hvert som kornet modnes og vanninnholdet synker, øker frostresistensen i betydelig grad.

Ved frost i vegetasjonsperioden er det en rekke forskjellige faktorer som virker inn, både i meteorologisk og biologisk sammenheng. Lav luftfuktighet fører til sterk utstråling og liten tilbakestråling fra atmosfæren. Ved høy luftfuktighet og relativt lav temperatur kan det felles ut dogg, og kondensasjonsvarmen ved doggdannelse (600 cal. pr. g vann) kan redusere luftavkjølingen i vesentlig grad. Men dogg forekommer ikke alltid når det er nattefrost, og dersom doggen skyldes fordampning i løpet av natten, vil varmetapet ved fordampningen være av omtrent samme størrelsesorden som doggvarmen. Under gunstige forhold for doggdannelse, kan kondensasjonsvarmen ekvivalere bort imot halvdelen av varmetapet ved utstrålingen. Doggvarme fremkommer bare ved kondensasjon, ikke

ved befuktning, f.eks. av tåkedråper. Utfelling av rim på underkjølte planter vil også bidra til å redusere varmetapet, men rimdannelsen kan også ha en uheldig virkning på plantene, fordi utvendig rim kan føre til isdannelse i plantevevet.

Høy luftfuktighet kan også virke uheldig på plantene i samband med frost. Er det høy luftfuktighet og dertil liten luftbevegelse, vil fordampning og transpirasjon bli lav og fuktigheten i intercellulærrum og cellevegger høy. Ved temperaturfall under 0°C dannes små iskrystaller først på overflaten av plantedelene, og derfra kan isen bre seg innover i plantevevet.

Dersom luftfuktigheten er lav, vil også plantene være relativt "tørre". De kan derfor nedkjøles til relativt lav temperatur uten at det fører til isdannelse i vevet, dvs. plantene underkjøles. Men under slike forhold blir utstrålingen sterkere og temperaturen lavere enn ved høy luftfuktighet. Hvis det derfor kommer i stand isdannelse i sterkt underkjølte planter, f.eks. ved bevegelse e.l., kan skadene bli store både p.g.a. den relativt lave temperaturen, og dessuten fordi isdannelse i underkjølte planter går raskt, og faren for intracellulær frysing vil være tilstede.

Nedbør kan også virke inn på utfallet av nattefrost. Dersom det faller nedbør (regn) like før frosten setter inn, vil plantene være våte utvendig samtidig som intercellulærrum og cellevegger inneholder mye fuktighet. Så snart temperaturen synker under 0°C , vil det utvendige vannet fryse og i noen grad omgi plantene med en iskappe. Den frigjorte frysevarmen vil i første omgang beskytte plantene mot å fryse, men dersom ikke mere vann tilføres, vil den utvendige isen snart føre til isdannelse inne i plantevevet.

2. Jordbunnsmessige forhold og nattefrost.

Temperaturfallet ved nattlig utstråling beror ikke bare på meteorologiske faktorer, men også på jordbunnsmessige for-

hold på hvert enkelt sted. Både jordoverflaten og eventuell vegetasjon blir i løpet av dagen oppvarmet ved innstråling, og det vil dannes et forråd av varme. Varmeforrådet i lavtvoksende kulturer er imidlertid svært lite sammenlignet med det som er tilstede i det øverste jordlaget. Varmeforholdene i jorda henger sammen med bl.a. jordart og vanninnhold. Varmekapasiteten øker med jordas volumvekt, med den spesifikke varme av jordmaterialet og med vanninnholdet. Den spesifikke varme for vann er omtrent dobbelt så høy som for jordmaterialet, og våt jord er under ellers like forhold, relativt kald. Jord med relativt høyt vanninnhold har imidlertid god varmeledningsevne, og det har stor betydning ved sterk nattlig utstråling, fordi varmetransporten fra dypere lag og til jordoverflaten dermed blir stor. En våt jord skulle derfor være mindre utsatt for nattefrost enn en tørr, se figur 14.

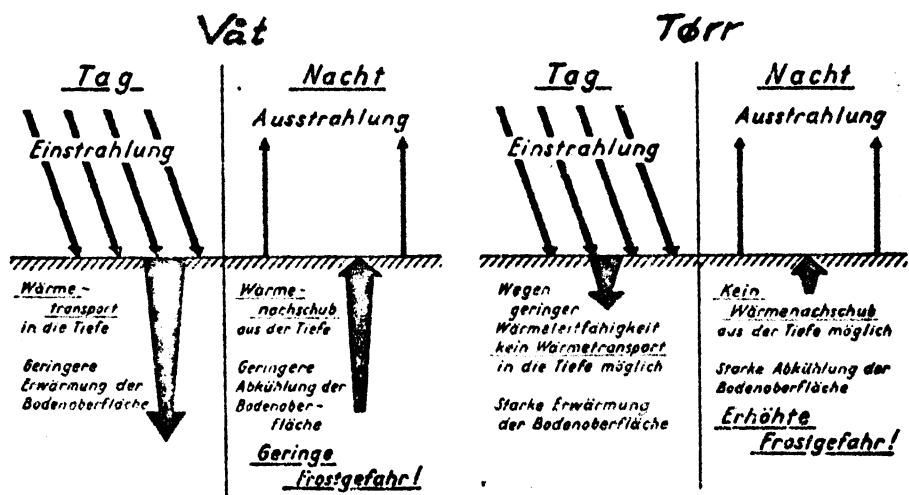


Fig. 14. Skjematisk fremstilling av varmevekslingen ved overflaten av våt og tørr jord (Schnelle, 1963).

Det er likevel ofte slik at relativt våt jord er mest utsatt for nattefrost. Årsakene til det kan være mange. Beliggenheten i terrenget kan bety mye. En våt jord vil dessuten miste mye av den innstrålte varme ved fordampning og det blir derfor relativt lite igjen av den tilførte energi til oppvarming av jordmassen.

Høy fuktighet kan derfor bidra relativt lite til å dempe temperaturfallet ved overflaten, og jorda blir derfor utsatt for nattefrost.

Jordoverflatens beskaffenhet har stor betydning for temperaturforholdene. Bearbeiding av det øvre jordlaget vil bryte varmeledningen fra dypere lag og dermed hemme varmetransporten til overflaten og det nærmeste luftlaget. I frostømfintlige kulturer som er utsatt for nattefrost seint på våren, bør en derfor være noe varsom med bearbeiding av jorda på det tidspunkt, fordi det kan øke frostfaren. I denne sammenheng skal nevnes at det kan være grunn til å være forsiktig med jordbearbeiding i frukttrebeplantinger på ettersommeren og tidlig på høsten. Bearbeiding av jorda vil stimulere veksten, modningen av skuddene blir forsinket og de kan dermed bli skadd av frost seinere på høsten.

Ved å dekke jordoverflaten med et eller annet varmeisolerende materiale, kan varmeledningen ut i atmosfæren reduseres, og jordtemperaturen blir derved noe høyere enn uten dekke. Men i netter med kraftig utstråling, blir luftlaget nærmest bakken sterkt avkjølt fordi varmetilførselen fra jorda er brutt. Et slikt dekke må derfor plasseres i en viss avstand fra bakken dersom det skal tjene som vern mot nattefrost. Dekket blir dermed varmeutstrålende overflate, og lufttemperaturen blir noe høyere under dekket enn utenfor. Figur 13 viser temperaturgradienten med og uten dekke plassert 1 m over jordoverflaten.

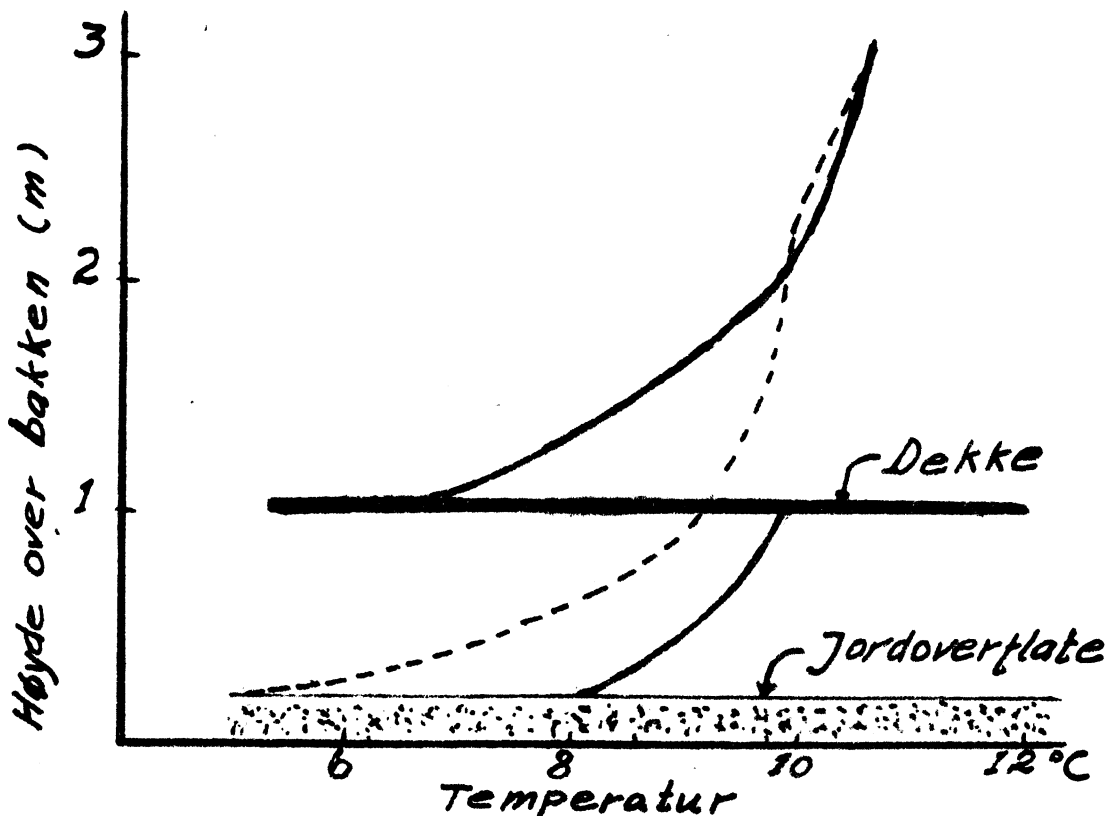


Fig. 15. Dobbelt inversjon ved dobbelt overflate (Schnelle, 1963).
----- temp.gradient uten dekke.
————— temp.gradient med dekke.

3. Ulike metoder for bekjempelse av nattefrost.

De mest anvendte metoder for å hindre eller dempe virkningen av nattefrost, er direkte oppvarming ved fyring med kull eller oljebrennere, røyklegging, luftblanding ved hjelp av store vifter og vanning.

Røyking mot nattefrost blir brukt en del også i vårt land. Det gjelder særlig om høsten for å hindre eller redusere frostskaider på korn, særlig havre. Et røykdekke virker i prinsippet på samme måte som skyer eller tåke under naturlige forhold. Den langbølgete utstrålingen fra jordoverflaten blir absorbert av vanddamp og karbonsyre i skyene eller tåken, og en stor del av denne strålingen blir reflektert og sendt tilbake til jordoverflaten, såkalt tilbakestråling. Dersom et

røyklag skal virke på samme måte, er det derfor av stor betydning at røyken er så fuktig som mulig. "Vanndråpene" i røyken bør også ha en viss minimumsstørrelse (ca. 10μ), for at de skal absorbere og reflektere den langbølgete strålingen best mulig. Jo større avstand fra jordoverflaten et røykdekke (sky- eller tåkelag) har, desto bedre frostbeskyttende virkning har det. Et tåkelag, f.eks. strålingståke, som ligger nede ved jordoverflaten har derimot ingen positiv virkning i så henseende, snarere tvert imot. Tåkeoverflaten blir sterkt avkjølt ved utstråling, og p.g.a. turbulens i tåkelaget vil temperaturen ved jordoverflaten synke. Dersom temperaturen synker under 0°C , vil tåkedråper som avsettes på plantene fryse til is med isdannelse i plantevevet som følge.

Som nevnt tidligere blir det frigjort varme når vann fryser til is, og det er grunnen til at vanning kan brukes for å motvirke frostskafer ved nattefrost. Varmeovergangen fra vann som fryser er større inn i plantevevet enn ut i luften omkring, og den frigjorte varmemengde vil derfor i vesentlig grad komme plantene tilgode. Så lenge det er fritt vann tilstede på alle plantedeler, vil temperaturen i vevet under isen holde seg mellom ca. 0 og -0.5°C . Men når alt vannet er frosset, og dersom ikke nytt vann tilføres, vil temperaturen både i isen og i plantevevet raskt synke til temperaturen i omgivelsene. Is har, som nevnt, svært god varmeledningsevne og den kan derfor ikke isolere plantene mot kulde.

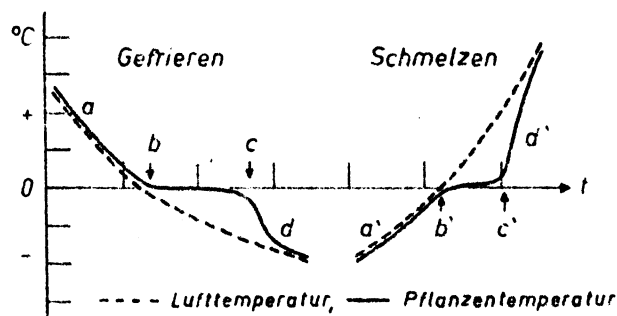


Fig. 16. Skjematisk framstilling av temperaturforløpet ved en våt plantedel som fryser og ved en isbelagt plantedel når isen smelter (Schnelle, 1963).
b, b' = fryse/smeltepunkt, c, c' = avsluttet frysing/smeltning.

Det er mange faremomenter ved vanning mot nattefrost. Dersom vanningen blir avbrutt før temperaturen har steget til over 0°C , vil plantene bli utsatt for frost. Når vanningen er igang, er det derfor viktig at sprederne roterer så fort at ikke alt vann får tid til å fryse mellom hver omdreining av sprederne.

Det er også svært viktig at vanningen begynner på riktig tidspunkt, dvs. ved riktig temperatur. Under forhold med sterk utstråling, er temperaturen ved plantene og i plantevevet ofte en god del lavere enn i en observasjonshytte 2 m over bakken. Dersom plantene dessuten er sterkt underkjølte når vanningen begynner, kan de fryse p.g.a. bevegelsene som vanningen forårsaker.

Varmetapet fra de isdekte plantene øker med synkende lufttemperatur og ved økende vindhastighet. Dersom det er vindstille, kan en vanningsstyrke på 2 mm pr. time, teoretisk sett, ekvivalere varmetapet ved -10°C . Ved lett luftbevegelse kan denne vanningsstyrke bare ekvivalere varmetapet ved -5°C , og ved noe mer luftbevegelse vil den frigjorte varmemengde ikke strekke til ved -5°C . Ved å øke vanningsstyrken f.eks. fra 2 til 4 mm pr. time, kan en ekvivalere varmetapet ved lavere temperaturer. Men store ismengder kan føre til mekaniske skader på plantene.

I England og Tyskland, der vanning mot nattefrost blir brukt i en viss utstrekning, er det oppnådd både gode og mindre gode resultater. Ikke sjelden har vanning ført til frostska-der, mens det uten vanning ikke ble noen skader.

Vanning kan også i noen grad indirekte bidra til å redusere frostfaren, fordi det vannet som faller på jordoverflaten øker jordas varmeledningsevne og dermed varmetransporten. Dessuten fører vanningen til økt luftfuktighet, og det kan dempe utstrålingen.

Såkalt indirekte vanning, dvs. vanning av jorda før nattefrosten setter inn, kan i noen grad forbedre varmekforholdene

i jord med dårlig varmekapasitet og varmeledningsevne, f.eks. tørr myrjord.

V. Relasjonen mellom frostresistens og noen morfologiske- og fysiologiske faktorer hos plantene

1. Morfologiske og anatomiske karakterer.

Det er gjort svært mange undersøkelser for å finne ut om det er noen sammenheng mellom morfologiske og anatomiske karakterer hos plantene og deres frostresistens, en kan nevne plantestørrelse, topp/rot-forholdet, internodiellengde, cellestørrelse, tykkelse på cellevegger m.m. For de fleste karakterers vedkommende er det funnet svært varierende resultater. Cellestørrelsen har likevel i mange tilfelle vist seg å ha nær tilknytning til frostresistensen. Planter med relativt små celler har i mange tilfeller vist seg mer frostresistente enn planter med relativt store celler. Men også her varierer resultatene svært mye. Det er videre klart at planter kan herdes i betydelig grad uten at cellestørrelsen avtar. Det viser seg ofte at dersom det eksisterer en nær sammenheng mellom morfologi og hardførhet, så er det en indirekte virkning av ulike fysiologiske faktorer.

2. Sukkerinnhold og celledaftkonsentrasjon

Sammenhengen mellom sukkerinnhold og frostresistens hos ulike planter har vært inngående undersøkt. Hos mange overvintrende vekster øker gjerne sukkerinnholdet jevnt utover høsten parallelt med økt frostresistens, enten ved hydrolyse av stivelse, eller på grunn av overskudd fra fotosyntese i forhold til respirasjon. Utover vinteren og våren minker sukkerinnholdet samtidig med at frostresistensen avtar. Et par eksempler på sesongvariasjon i sukkerinnhold er vist i figur 17 og 18.

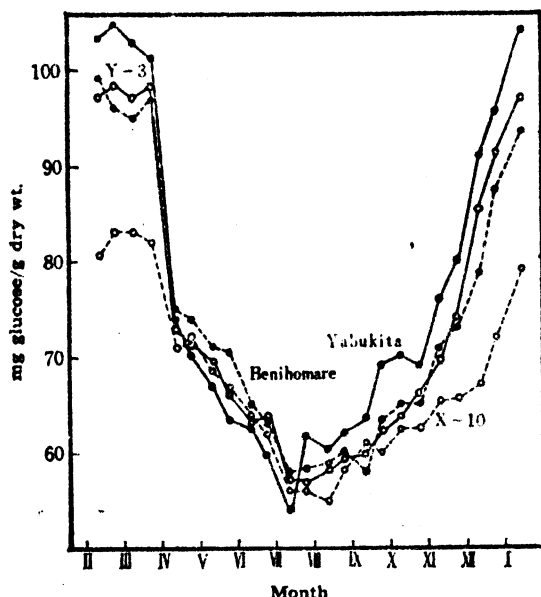


Fig. 17. Variasjon i totalsukkerinnhold i blad av tebusker til ulike tider i året (Simura og Sugiyama, 1965).

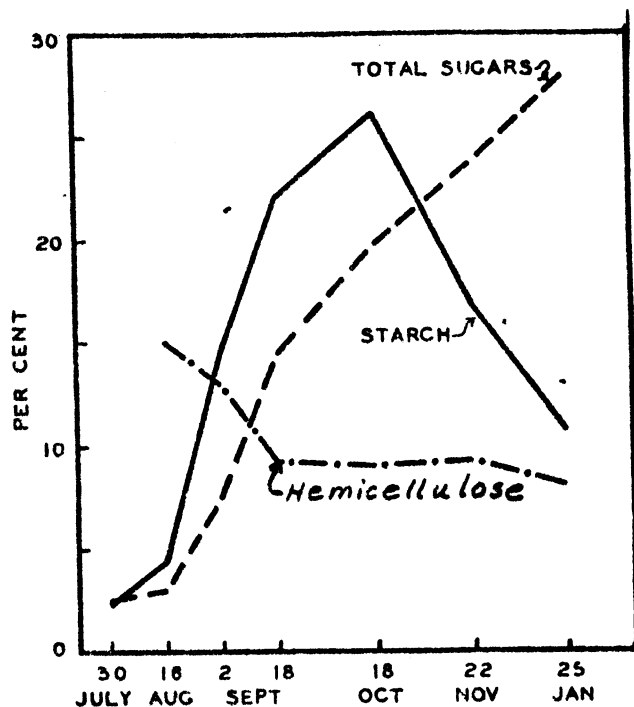


Fig. 18. Innhold av totalsukker, stivelse og hemicellulose i røtter av kløver til ulike tider i året (Smith og Graber, 1948).

I svært mange tilfelle er det funnet betydelig korrelasjon mellom høyt sukkerinnhold og høy grad av frostresistens, bl.a. hos ulike arter og sorter av vinterkorn, engvekster, rotvekster, busker og trær m.fl. (Andersson, 1944; Smith og Graber, 1948; Simura et al., 1965; Sakai og Yoshida, 1968). Hos enkelte planter øker sukkerinnholdet parallelt med enhver behandling som fører til økt frostresistens, og sukkerinnholdet minker parallelt med enhver behandling som fører til nedsatt frostresistens (Sakai, 1961).

Hos flerårige vekster som f.eks. enkelte treslag, foregår det en omdannelse av stivelse til sukker utover høsten og vinteren. Det har vist seg å være et nært samspill mellom lav temperatur og årstid når det gjelder forløpet av denne prosessen. Dersom slike vekster holdes ved relativ høy temperatur høst og vinter, minker ikke stivelsesinnholdet utover det som går med til respirasjon. Og dersom de samme vekstene holdes ved relativ lav temperatur utover våren og sommeren, så vil de på

tross av lav temperatur, regenerere stivelse, og sukkerinnholdet vil være relativt lavt. Den biokjemiske mekanismen for om-dannelse av stivelse til sukker og vice versa, er ikke helt klarlagt.

Det er i mange tilfelle funnet sterk korrelasjon mellom celledsaftkonsentrasjon og frostresistens. Men dette er også å vente siden variasjon i celledsaftkonsentrasjon for det meste beror på ulikt sukkerinnhold i vakuolene. Innholdet av elektrolytter i vakuolene varierer svært lite.

Det er utført mange forsøk med å tilføre plantene sukker for å øke frostresistensen. En har latt plantene absorbere sukker fra en løsning enten gjennom røttene eller gjennom bladene. Resultatene fra slike forsøk er variable. Noen ganger er det påvist god sammenheng mellom frostresistens og sukkerinfiltrasjon, andre ganger ikke. En har oppnådd bedre resultater med herdete enn med uherdete planter. Hos vinterhvetete ble det oppnådd bedre effekt av sukkerinfiltrasjon hos hardføre enn hos mindre hardføre sorter (Perkins og Andrews, 1960). Infiltrasjon med andre organiske stoffer som f.eks. glyserol, etylenglycol m.fl., har også hatt positiv virkning på frostresistensen. Det er sannsynlig at virkningen av infiltrasjon med ulike stoffer vesentlig er av osmotisk karakter, se figur 19.

En rekke undersøkelser viser imidlertid at det ikke er noen entydig eller generell overensstemmelse mellom sukkerinnhold/celledsaftkonsentrasjon og frostresistens (Sakai, 1962; Sjøseth, 1964; Levitt, 1966, Sakai og Yoshida, 1968). Noen planter med svært høyt sukkerinnhold viser liten eller ingen grad av frostresistens, f.eks. potet som er lagret ved lav temperatur, sukkerrør m.fl. Hos enkelte bartreslag som f.eks. gran og furu, er det funnet liten endring i sukkerinnhold og celledsaftkonsentrasjon i løpet av året, mens derimot frostresistensen varierer svært mye (figur 20).

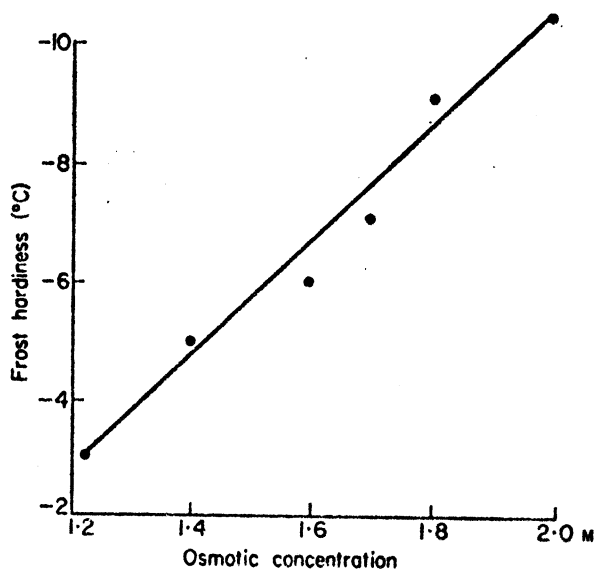


Fig. 19. Sambandet mellom cellesaftkonsentrasjon og frostresistens i blad av gardenia som var tilført glucose (Levitt, 1966).

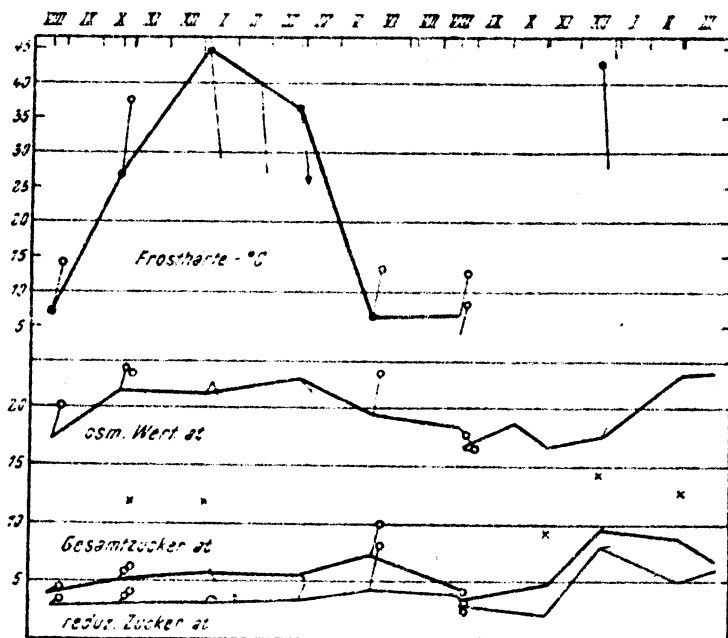


Fig. 20. Variasjon i frostresistens, osmotisk verdi og sukkerinnhold i nåler av furu til ulike tider i året (Pisek, 1953).

Hos noen algeformer er det endog påvist nedgang i frostresistens når de hadde tilgang på sukker. Det er videre mulig å senke frostresistensen ved hjelp av kjemiske stoffer, f.eks. cloroform, uten at celledaftkonsentrasjonen forandres.

Det er uklart om forskjellige typer av sukkerarter har noen spesifikk virkning på plantenes frostresistens.

Hos noen insekter øker innholdet av glyserol parallelt med økt herdning og frostresistens. Hos planter er det, med få unntak, funnet svært lavt innhold av glyserol eller lignende stoffer, og det er derfor tvilsomt om disse har noen betydning for plantenes frostresistens.

Enkelte undersøkelser kan tyde på at sukkeret i plantene ikke bare virker på celledaftkonsentrasjonen, men at det også har betydning for proteinstoffene i protoplasmaet under frysingen. Det er antatt at sukkeret legger seg som en "kappe" rundt proteinmolekylene i stedet for vannet som delvis fryser ut, og derved har en beskyttende effekt på proteinene under frysingen. Forbindelsen mellom sukker og protein kan komme i stand ved hydrogenbånd mellom OH-grupper i suktermolekylene og de polare gruppene i proteinet (Heber, 1959). I noen tilfeller er det funnet høyere sukkerinnhold i kloroplastene etter herdning enn i uherdet materiale.

Hos planter med nær sammenheng mellom sukkerinnhold og frostresistens, kan neppe hele økningen i frostresistens forklares ved økt sukkerinnhold. Kunstig økning av sukkerinnholdet hos planter fører til økt celledaftkonsentrasjon, og dermed mindre ismengde i vevet ved frysing. Men planter med høy grad av frostresistens har evne til å tolerere store ismengder i vevet uten å ta skade av det. Det er dessuten i mange tilfelle funnet at det meste av sukkerakkumuleringen skjer relativt tidlig om høsten, før plantene har oppnådd maksimal frostresistens. Det er derfor sannsynlig at en annen "primær resistensfaktor" må utvikles og tre i funksjon før en eventuell økning i sukkerinnholdet kan bidra til økt frostresistens (Levitt, 1966). Planter som mangler den "primære resistens-

faktor", kan bli drept av frost så snart de fryser, uansett om sukkerinnholdet er høyt. Hos planter som har en vel utviklet "resistensfaktor", øker frostresistensen etter hvert som sukkerinnholdet øker.

Hos nær beslektede sorter av vinterhvete og vinterrug er det funnet svært god overensstemmelse mellom sukkerinnhold og frostresistens (Åkerman, 1927, Andersson, 1944). Dette kan bero på at den "primære resistensfaktor" er noenlunde likt utviklet hos alle sortene, og at forskjellen i frostresistens, i vesentlig grad, beror på forskjell i sukkerinnholdet. Sakai og Yoshida (1968) mener at en slik "faktor" er knyttet til proteinstrukturen, særlig i plasmamembranen.

3. Vanninnhold.

Det er i mange tilfelle funnet et inverst forhold mellom vanninnhold i plantene og deres frostresistens. Vanninnholdet går gjerne ned utover høsten etter hvert som plantene modnes og herdes. Det er likevel ingen generell sammenheng mellom lavt vanninnhold og høy frostresistens. Enkelte sukulente planter som f.eks. arter av Saxifraga (sildre), kan ha et vanninnhold på 90-95%, men likevel vise betydelig frostresistens.

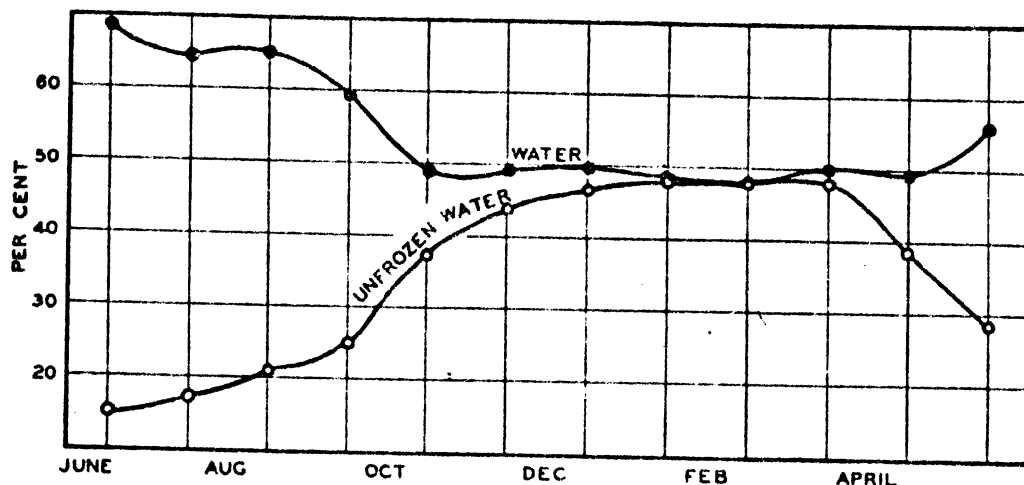


Fig. 21. Totalt vanninnhold kontra ufrysbart (bundet) vann i skudd av epletre (Smith, 1962).

Blund & physiöl.
1935

Tidligere ble det i en rekke tilfelle påvist korrelasjon mellom frostresistens og innhold av såkalt bundet vann (Levitt, 1956). Men det har senere vist seg at resultatene fra mange av disse undersøkelsene neppe er helt pålitelige, fordi metodikken ved bestemmelse av bundet vann har vært mangelfull (se side 12).

Det ligger nær å slutte at høyt innhold av bundet vann ville ha positiv virkning på plantenes frostresistens fordi mengden av frysbart vann da blir mindre, og sjansene for frostska-der tilsvarende redusert. Men dette holder ikke alltid stikk. Herdet materiale av kål overlevde frysingen når så mye som 2/3 av vannet frøs ut, mens uherdet materiale ikke overlevde om bare halvdel av vannet frøs (Levitt, 1966).

Ved å bestemme mengden av bundet vann i protoplasmaet, dvs. den vannfraksjonen som er kolloidalt bundet, ble det i kloroplast og grana fra kålblad funnet sammenheng mellom innhold av bundet vann og frostresistens. Mengden av bundet vann fremkom som vekttap etter tørking ved 105°C.

Tabell 3. Bundet vann i kloroplast og grana fra kålblad.

| Materiale | % vekttap ved tørking ved 105°C | | | |
|-------------|---------------------------------|--------|----------------|--------|
| | Tørket 2 veker | | Tørket 5 veker | |
| | Uherdet | Herdet | Uherdet | Herdet |
| Kloroplaser | 5.5 | 7.3 | 7.2 | 9.7 |
| " | 11.4 | 14.3 | 12.7 | 15.5 |
| " | 9.8 | 11.8 | 11.7 | 14.3 |
| Grana | 4.1 | 14.0 | 6.1 | 14.0 |

Vi ser at større vannmengde er bundet i det herdete materialet enn i det uherdete.

4. N-holdige stoffer

Det er utført en rekke undersøkelser over relasjonen mellom ulike N-holdige stoffer og plantenes frostresistens, men resultatene er svært variable. Den klareste sammenhengen er funnet mellom innhold av vannløselig protein og frostresistens. Dette er påvist bl.a. hos høsthvete (Johansson et al., 1955) og hos ulike busker og trær (Siminovitch og Briggs, 1953; Simura og Sugiyama, 1965), både ved herdning og ved avherdning. Resultatet fra en japansk undersøkelse over sesongvariasjonen i innhold av vannløselig protein er vist i figur 22.

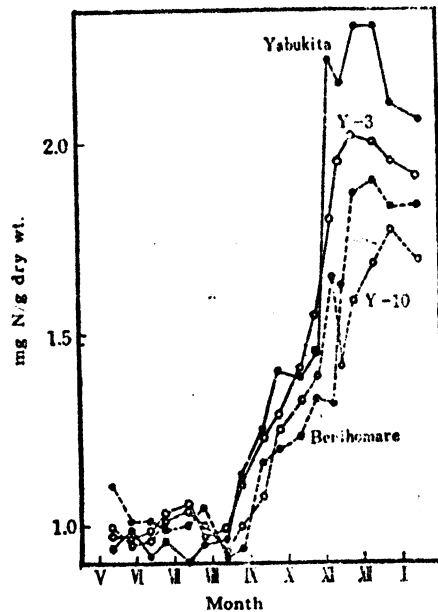


Fig. 22. Variasjon i innhold av vannløselig protein (mai-januar) i blad av tebusk (Simura og Sugiyama, 1965).

Resultatene fra flere undersøkelser tyder imidlertid på at det neppe er noen generell sammenheng mellom innholdet av løselig protein og frostresistens (Levitt, 1966; Sakai og Yoshida, 1968). Relasjonen mellom plantenes frostresistens og proteinstoffene er utvilsomt svært komplisert, og en kan ikke gå nærmere inn på dette her.

5. Andre stoffer.

En rekke forskjellige kjemiske substanser i plantene har vist seg å være mer eller mindre korrelert med frostresistensen, det gjelder f.eks. pentosaner, lipider, antocyaniner, tanniner, aminosyrer og amider m.fl. I flere undersøkelser er det påvist økt innhold av aminosyren prolin ved herdning og nedgang ved avherdning (Levitt, 1966). Det er også funnet en viss sammenheng mellom ascorbinsyreinnhold og frostresistens. Men for alle de nevnte stoffene er resultatene svært variable når det gjelder deres virkning på plantenes frostresistens.

Virkingen av frost og frostskaader på enzymer og enzymsystemer hos planter, er relativt sparsomt undersøkt. Når celler eller cellelev fryses langsomt ned til -20°C eller lavere, blir enzymene påvirket, ikke bare av lav temperatur, men også av høye konsentrasjoner av forskjellige stoffer, som kan influere på deres aktivitet.

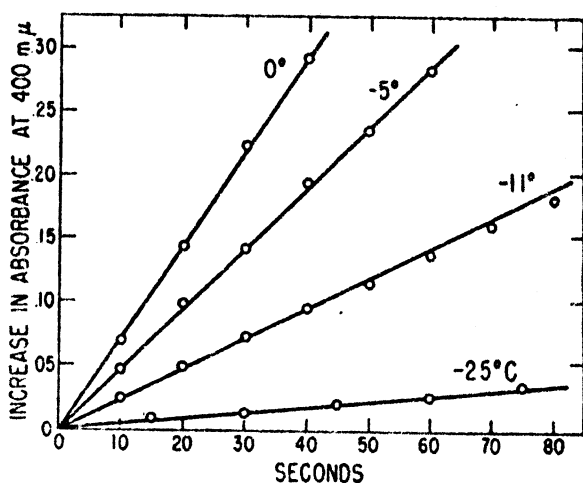


Fig. 23. Reaksjonshastighet ved ulike temperaturer for en fosfatasekatalysert reaksjon (Tappel, 1966).

Som det fremgår av figur 23 avtar enzymaktiviteten med synkende temperatur, men de fleste enzymene beholder noe av sin aktivi-

tet også ved svært lave temperaturer. Det er f.eks. funnet økt aktivitet hos enzymer både i mitochondrier og lysosomer når disse organellene er ødelagt av frost. Fosfolipase viser høyere aktivitet i frosset vev nær smeltepunktet enn i ufrosset vev nær 0°C . Dette beror trolig på en økning i konsentrasjon både av enzym og substrat i frosset vev.

Det er funnet økt aktivitet både av fosforylase og fosfatase i blad av betes ved herdning ved 0°C . Under avherdning ved 25°C , gikk aktiviteten igjen ned. Hos enkelte frukttrær er det funnet nedgang i innhold av vekststoffer utover høsten og vinteren. Nedgangen var størst hos de mest hardføre plantene.

I nyere undersøkelser er det påvist en "ny" protoplasmatiske faktor i samband med herdning og frostresistens. Det er protein-SH (sulfhydryl) og protein-SS (disulfid). Det er påvist økt innhold av SH ved herdning, og økt innhold av SS når frysingen har ført til skade (Levitt, 1966).

6. Permiabilitet og viskositet

Som nevnt tidligere, er permiabiliteten hos cellene svært viktig dersom de utsettes for frost. Mange undersøkelser viser at permiabiliteten for polare stoffer, f.eks. vann, øker etter hvert som plantene herdes (Levitt, 1956). Men dette foregår bare hos planter som har evne til å øke frostresistensen. Det er likevel ingen entydig sammenheng mellom frostresistens og permiabilitet. Hos enkelte treslag ble det funnet økt permiabilitet for vann parallelt med økt herdning fra oktober til januar, men permiabiliteten var fortsatt like høy utover våren, etter at plantene var avherdet.

Viskositeten, eller konsistensen i protoplasmaet har vært av betydelig interesse i samband med herdning og frostresistens. I noen undersøkelser, bl.a. Johansson et al. (1955), er det funnet økt viskositet med økt herdning og frostresistens. I andre undersøkelser er det funnet stikk motsatte resultater,

dvs. at viskositeten går ned, protoplasmaet blir mer tyntflytende etter hvert som cellene herdes (Levitt, 1956). Forklaringen på nedsatt viskositet ved herdning er at proteinstoffenes hydrofile karakter forandres, slik at herdet protoplasma er i stand til å binde mer vann enn uherdet. Ved dehydrering under frysing kan derfor det herdete protoplasmaet holde på mer vann og er dermed mindre viskøst enn det som ikke er herdet, og det kan bidra til økt frostresistens hos cellene.

Viskositeten er svært vanskelig å bestemme på en tilfredsstillende måte, og det kan være noe av årsaken til ulik oppfatning når det gjelder sammenhengen mellom viskositet og frostresistens. Plasmaets viskositet kan bestemmes bl.a. ved sentrifugering. Derved slynges plastidene mer eller mindre ut mot celleveggene, og fordelingen av plastidene nyttes som mål på viskositeten.

VI. Miljø og utvikling i relasjon til frostresistens

1. Herdning og avherdning

Hos en rekke flerårige og vinter-ettårige vekster øker frostresistensen utover høsten og første del av vinteren parallelt med synkende temperatur og kortere dag. På ettervinteren og utover våren skjer det gradvis en avherdning etter hvert som temperaturen stiger og daglengden øker. Variasjonen i frostresistens kan bli betydelig, fra et minimum i den første vekstfasen om våren, til et maksimum midtvinters. Planter som kan tåle -30 -40°C om vinteren, kan bli skadd av lett frost om våren etter at de er helt avherdet, se figur 24.

I tidligere avsnitt er det pekt på en del fysiologiske og kjemiske faktorer hos plantene som virker inn på herdningsprosessen. I grove trekk kan dette sammenfattes slik: Etter hvert som temperaturen synker og veksten stopper opp, øker

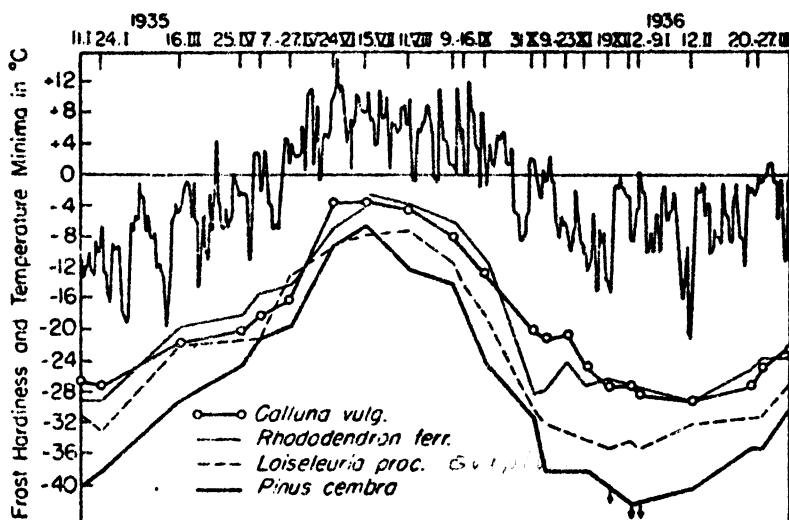


Fig. 24. Variasjonen i frostresistens sammenlignet med daglige minimumstemperaturer i løpet av året (Ulmer, 1937).

innholdet av forskjellige stoffer, særlig ulike typer av carbohydrater og N-holdige stoffer. Dermed øker innholdet av stoffer som binder vann, både kolloider og krystalloider, og innholdet av bundet vann øker. Både enzymer og vekststoffer spiller utvilsomt en viktig rolle under herdningsprosessen, men virkningen av disse i denne sammenheng kjenner vi lite til.

En rekke undersøkelser har vist at den naturlige herdningsprosessen, i alle fall i noen grad, kan etterlignes under kunstige vilkår i laboratoriet. Slike forsøk har bl.a. vist hvilken virkning ulike miljøfaktorer som temperatur, lys og daglengde (fotoperiode) har på plantenes herdning.

Under kontrollerte herdningsvilkår øker frostresistensen forholdsvis raskt den første tiden, men økningen blir etter hvert mindre, og etter en viss tid har plantene oppnådd maksimal herdning. Urteaktige vekster som f.eks. grasarter,

engbelgvekster og høstkorn, oppnår maksimal herdning etter 2-4 uker under gunstige herdningsvilkår.

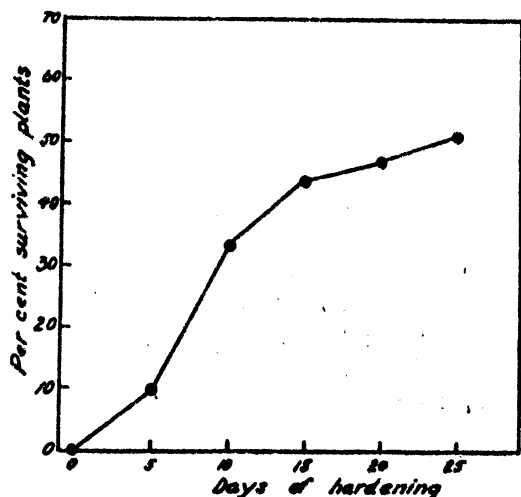


Fig. 25. Endring i frostresistens med varigheten av herdningen hos rødkløver (Sjøseth, 1964).

Årsaken til at effekten av herdningen avtar og stopper opp etter en viss tid, skyldes sannsynligvis en hemning av fotosyntesen samtidig med økt respirasjon p.g.a. akkumulering av assimilater (Andersson, 1944; Warren Wilson, 1966).

Den viktigste ytre faktor som påvirker herdningen er temperaturen. Forskjellige vekster kan imidlertid ha noe ulik optimal herdningstemperatur. En temperatur på ca. 0 til +1°C har i mange tilfelle gitt best resultat. Dette er bl.a. funnet hos rødkløver (fig. 26).

Enkelte treaktige vekster herdes imidlertid best ved en temperatur på noen grader under 0°C, dvs. i frossen tilstand (Sakai, 1965).

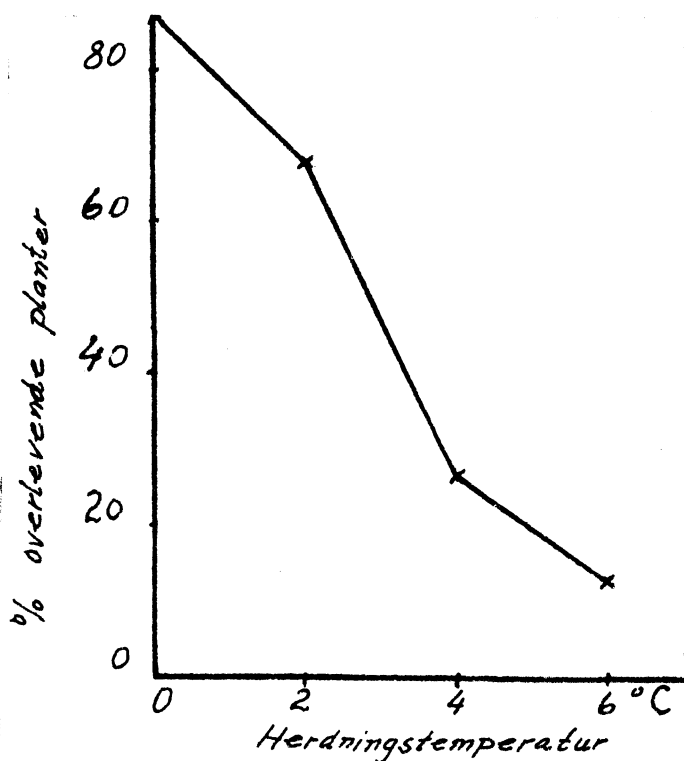


Fig. 26. Virkningen av ulik herdningstemperatur på frostresistens hos rødkløver (Sjøseth, ikke publiserte resultater.)

Flere undersøkelser har vist at urteaktige planter som høstkorn, engvekster m.fl., må ha tilgang på lys om de skal oppnå maksimal herdning (Andersson, 1944; Sjøseth, 1964).

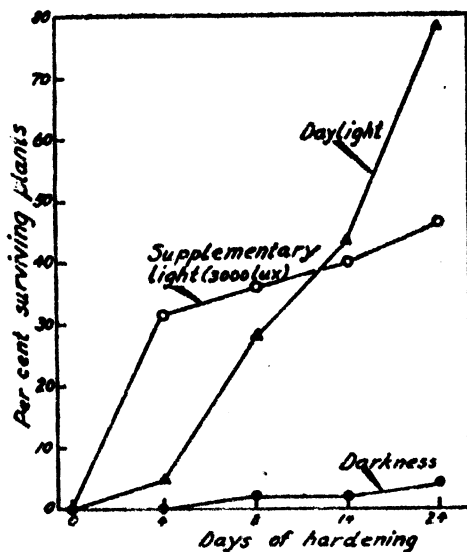


Fig. 27. Effekten av herdning i lys og mørke hos rødkløver (Sjøseth, 1964).

Det er derfor klart at fotosyntesen spiller en viktig rolle for herdningen hos slike vekster. Fotosyntesen avtar med synkende temperatur, men da Q_{10} for fotosyntese er betydelig lavere (1-2) enn for respirasjon (2-3), vil fotosyntesen få overvekt, og det fører til økt stoffproduksjon (Sjøseth, 1964).

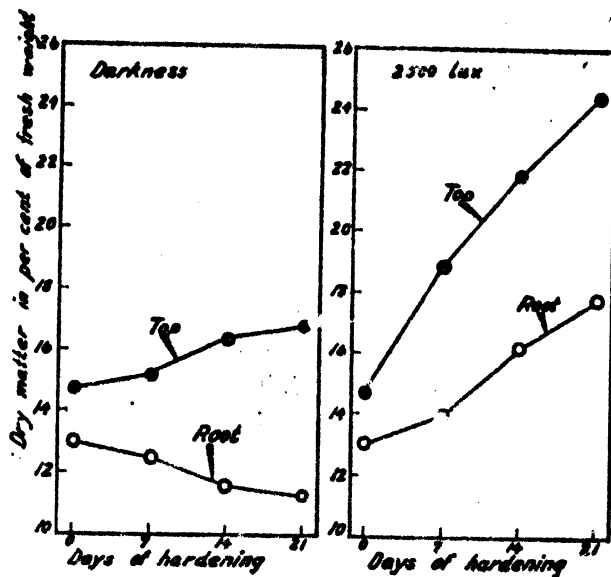


Fig. 28. Tørrstoffinnhold hos rødkløver ved herdning i lys og mørke (Sjøseth, 1964).

Enkelte vekster med høyt stivelsesinnhold kan herdes fullt ut også i mørke. Hos slike planter foregår det omdannelse av stivelse til sukker under herdningen. I en japansk undersøkelse med kvister av ulike *Salix*-arter, fant en at den mest effektive herdningstemperatur var -3°C , og den optimale temperatur for omdannelse av stivelse til sukker var $-3 - 5^{\circ}\text{C}$ (Sakai, 1965).

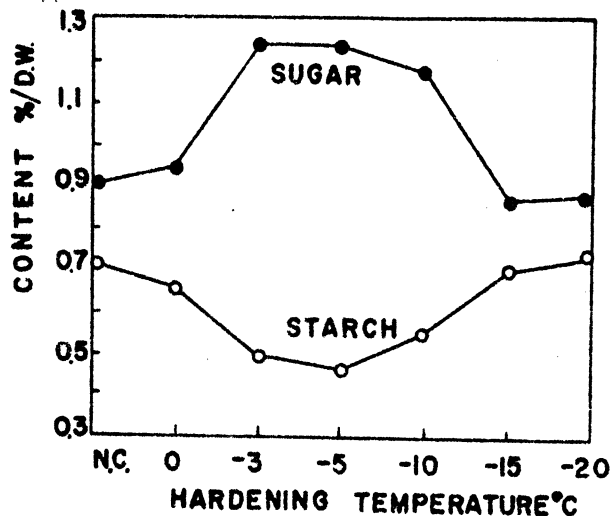


Fig. 29. Virkningen av temperatur på hastigheten av om-dannelse av stivelse til sukker hos *Salix* (Sakai, 1965).

Undersøkelse over virkningen av ulike daglengde (fotoperiode) på herdningsprosessen har gitt noe ulike resultater (Hodgson, 1964; Kohn og Levitt, 1965; Shih et al., 1967; Paulsen, 1968). Årsaken kan vel være at det i de forskjellige undersøkelsene er nyttet ulike lysintensitet, ulike varighet på herdningsperioden, eller plantemateriale som har vært adaptert under ulike daglengdeforhold. I en undersøkelse med norsk rødkløver, ga 12 og 18 timer fotoperiode best resultat m.h.p. frostresistens. Lengden av herdningsperioden var 21 dager, og temperaturen var 0 - +1°C.

Herdningen er, iallfall i noen grad, en autonom prosess, dvs. uavhengig av ytre vilkår. Planter som settes under herdningsvilkår om sommeren, oppnår bare ubetydelig økt frostresistens. Videre har det vist seg at hos enkelte treslag, f.eks. eik, furu, krossved m.fl., øker frostresistensen utover høsten og vinteren selv om plantene dyrkes i varmt veksthus. Slike planter taper heller ikke så lett sin resistens om de blir utsatt for høy temperatur etter at de er herdet (Biebl, 1962). Det er sannsynlig at herdningen beror på et nært samspill mellom både indre og ytre faktorer.

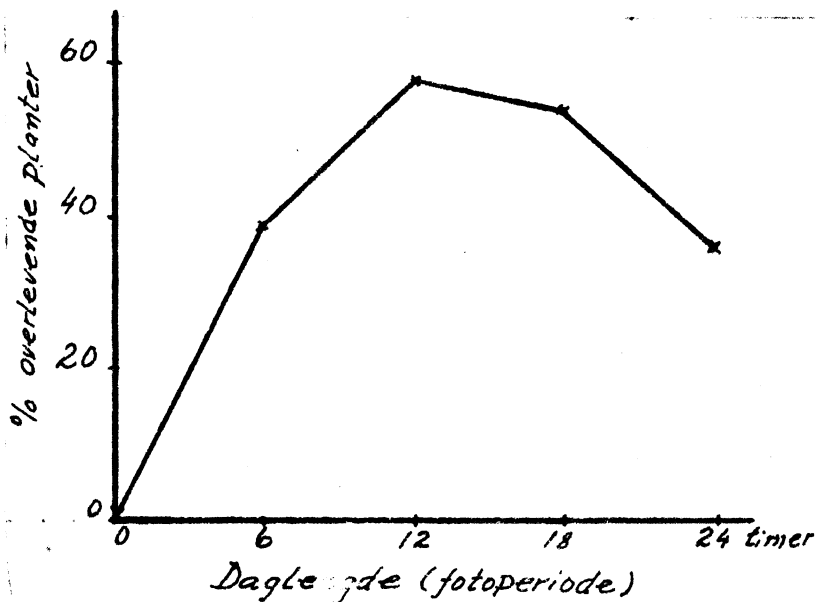


Fig. 30. Virkningen av ulik daglengthe på herdningen hos rødkløver (21 dager) (Sjøseth, ikke publiserte resultater).

Planter som er herdet og dermed frostresistente, taper vanligvis raskt denne egenskapen dersom temperaturen stiger opp til $+8-10^{\circ}\text{C}$. Et par dager ved så høy temperatur kan være nok til å avherde plantene totalt. Dette gjelder særlig for planter som ikke er i hvile eller som ikke har tilstrekkelig dyp hvile. Ved stigende temperatur vil fysiologisk aktivitet og vekst komme i gang, og plantene taper hardførheten svært fort.

2. Hvileperiode (dormancy)

Flerårige vekster går om høsten inn i en hvileperiode, dvs. vekstaktiviteten stopper opp, og skudd og knopper "modnes". Hvilten beror på et samspill mellom ulike vekstfremmende og veksthemmende stoffer (promoters og inhibitors) og visse

spirende frø av ulike sorter av vinterhvetete som er herdet ved $+1.5^{\circ}\text{C}$ fra 2 til 11 uker og deretter frosset ved -15°C i 16 timer (Andrews, 1960).

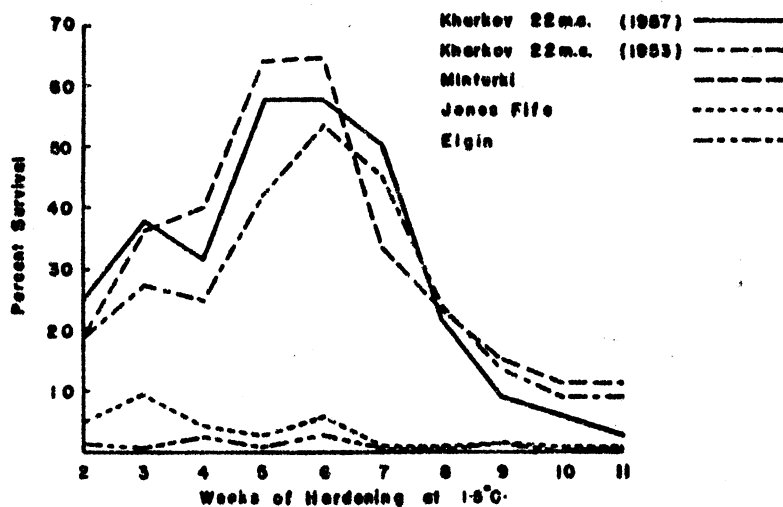


Fig. 31. Prosent overlevende spirer hos ulike sorter av vinterhvetete etter hardning og frysing (Andrews, 1960).

Hos vinterhvetete er det i mange tilfelle funnet sammenheng mellom sortenes hardførhet og vernaliseringsperiodens lengde. De sortene som trenger relativt lang vernaliseringsperiode er gjerne de mest hardføre. (Men en finner også eksempler på at lite hardføre sorter trenger relativt lang behandling for å bli fullt vernaliserte.)

Både vernalisering, hvile og hardning er utviklingsfysiologiske prosesser som i mange tilfelle henger nokså nøye sammen når det gjelder deres virkning på plantenes frostresistens og vinterhardførhet. Men ettersom forskjellige planteslag reagerer nokså ulikt, er det ikke mulig å påvise generelle sammenhenger mellom disse utviklingsfysiologiske fasene hos plantene og deres hardførhet.

4. Tilgang på næringsstoffer

Det er ikke funnet noen klar og entydig virkning av ulike næringsstoffer på plantenes frostresistens. I mange tilfelle har rikelig tilgang på nitrogen ført til nedsatt frostresistens, mens relativt store mengder fosfor og kalium har ført til økt frostresistens. Men i en del undersøkelser er det ikke påvist noen spesiell effekt av disse stoffene, og noen ganger har virkningen gått i motsatt retning (Wang, 1953; Levitt, 1956; Calder et al., 1965; Ljones et al., 1968). Virkningen av ulike næringsstoffer på plantenes frostresistens er utvilsomt indirekte og vil derfor variere med forholdene forøvrig. Overskudd eller mangel på ett eller flere stoffer, eller eventuell ubalansert næringstilgang, kan føre til nokså kompliserte reaksjoner hos plantene, og det er derfor neppe mulig å påvise noen generell effekt på frostresistens og hardførhet.

Rikelig tilgang på nitrogen stimulerer veksten og dermed utnyttelse og forbruk av karbohydrater, og det er vel årsaken til redusert frostresistens. Grunnen til at fosfor og kalium i mange tilfelle har ført til økt frostresistens, kjenner en lite eller ingenting til. Generelt er det vel slik at alle ytre faktorer som stimulerer veksten fører til nedsatt hardførhet, mens faktorer som bremser på veksten gjerne fører til økt hardførhet. Men disse relasjonene gjelder bare for planter som kan herdes og dermed øke sin hardførhet.

VII. Ulike metoder for bestemmelse av plantenes frostresistens

Det finnes en rekke forskjellige måter å gå fram på når det gjelder å bestemme plantenes frostresistens, og en kan her bare omtale de viktigste og mest anvendte metodene. Valg av metode må i første rekke baseres på det utstyret

som står til rådighet, på omfanget av forsøksopplegget og det plantematerialet som skal undersøkes.

En enkel fremgangsmåte for å skaffe opplysning om plantenes hardførhet, er å utføre sammenlignende forsøk under naturlige overvintringsvilkår, dvs. feltforsøk. Men vær- og klimaforhold varierer som kjent svært mye fra år til år, og en passende "testvinter", dvs. en vinter som gir et høvelig utslag, inntreffer bare med års mellomrom. Vinterhardførheten hos en vekst beror dessuten på en rekke ulike faktorer, og resultater fra feltforsøk kan derfor bare delvis gi opplysning om vedkommende plantes frostresistens. Det er derfor i den seinere tid utarbeidet laboratoriemetoder for undersøkelse av frostresistens hos ulike planter. Fordelene med laboratorieforsøk framfor feltforsøk er, at miljøfaktorene er under kontroll, og en kan utsette plantene for den belastning som i hvert tilfelle er ønskelig, det gjelder temperatur, frysetid, nedkjølings- og opptiningshastighet, etterbehandling etter frysing osv.

En kan skille mellom 4 faser ved gjennomføring av fryseforsøk: (1) Herdning av plantematerialet, (2) kuldebehandling, (3) behandling av plantene etter frysing og (4) bedømmelse av frostskaadene. Alle disse fasene må gjennomføres under best mulig kontrollerte og standardiserte vilkår, slik at det er mulig å oppnå reproduerbare resultater.

Herdningsprosessen har vi behandlet tidligere. Dersom en ikke har mulighet for kunstig herdning i klimaregulerte rom, kan plantematerialet stå ute utover høsten inntil herdning har funnet sted. Under kontrollerte betingelser går herdningen som regel langt raskere enn under naturlige vilkår, og hele plantematerialet kan få nøyaktig samme herdningsbetingelser.

Frysingen kan utføres på forskjellig vis alt etter utstyr og størrelse på plantematerialet. Under frysingen er det

nødvendig at hele plantematerialet får så lik temperatur som mulig (variasjonen bør ikke overstige $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$). Frysing av kløver og andre belgvekster har vist at en temperaturforskjell på under 1°C kan gi store utslag i frostska-
de.

Nedkjølingen bør skje gradvis til det temperaturnivå som på forhånd er funnet å gi passende utslag. Det er fordelaktig å fryse plantematerialet ved ulike temperaturer samtidig, da det ellers kan være vanskelig å treffe den temperatur som gir passende utslag. Dersom en har utstyr til det, termoelementer og punktskriver, bør temperaturen registreres inne i plantene.

Ved bruk av vanlig kjøleapparat, f.eks. fryseskap, er det liten fare for at nedkjølingen skal bli så hurtig at det fører til intracellulær isdannelse. En skal imidlertid være oppmerksom på at "tørre" planter kan underkjøles, og ettersom isdannelse i underkjølt vev går relativt hurtig, kan det medføre intracellulær isdannelse. Det samme er i noen grad tilfelle dersom plantene flyttes fra forholdsvis høy temperatur og direkte til den frysetemperatur som skal nyttes. Det er også av betydning om plantene fryses "nakne", dvs. uten at røttene står i jord eller lignende voksemedium.

Både nedkjølingshastighet og frysetid må avpasses i hvert enkelt tilfelle, da virkningen av disse faktorene varierer alt etter hva slags plantemateriale som skal undersøkes. Hevning av temperaturen etter endt frysing bør skje langsomt, f.eks. likt med nedkjølingshastigheten. En bør videre la plantene stå en tid ved $+2-3^{\circ}\text{C}$, før de flyttes til vanlig veksttemperatur.

Det er i prinsippet to ulike måter å gå fram på når en skal bestemme frostska-
der hos planter etter kuldebehandling. En kan enten bestemme andelen av overlevende respektivt døde planter, eller graden av skade som er påført plantene.

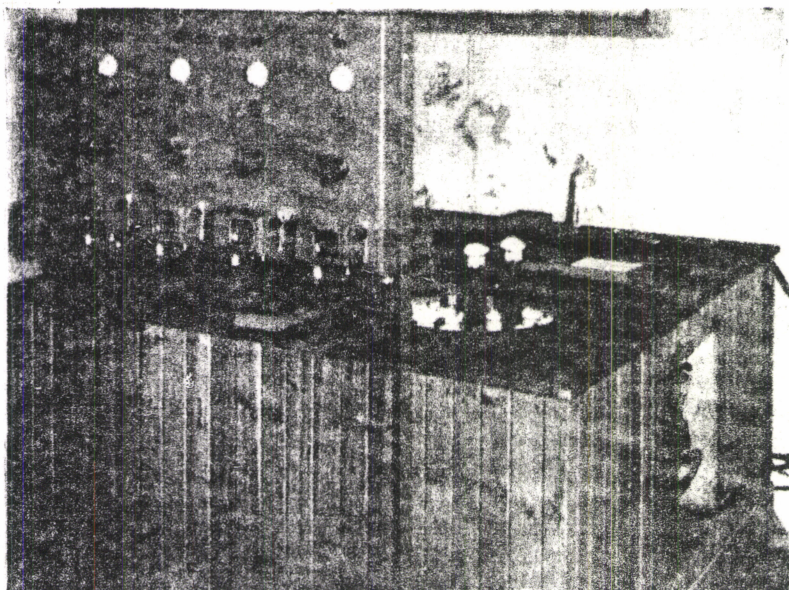


Fig. 32. Frysekabinett. Plantene fryses "nakne" i store reagensrør (Sjøseth, 1957).

Andelen av overlevende eller døde planter er vel det enkleste og mest brukte kriterium på frostresistens. Det kan imidlertid anføres visse innvendinger mot denne fremgangsmåten. Da det bare blir tatt hensyn til levende og døde planter, blir frostskafer som ikke fører til plantedød neglisjert. Det tar dessuten forholdsvis lang tid etter kuldebehandlingen før en kan bedømme om en plante er drept av frost eller om den vil overleve, og sluttresultatet kan i noen grad avhenge av de vilkårene som plantene får i perioden etter frysingen. Planter som er skadd av frost kan, dersom vilkårene er gode, overleve frysingen, men dø ut dersom vilkårene er ugunstige, f.eks. ved infeksjon av sjukdomsparasitter.

For å bedømme graden av skade som er påført plantene under frysingen, kan en bruke en tilfeldig valgt skala, f.eks. fra 0 til 10, der 0 = totalskadd planter og 10 = helt uskadd planter. I dette tilfelle bedømmes gjerne hvor stor del av bladarealet som er skadd av frost, eller om en vil, hvor stor del som er helt uskadd.

Denne fremgangsmåten kan også i noen grad føre til feilvurdering av plantenes frostresistens. For det første vil 50% skade på bladarealet hos en bladfattig og dårlig utviklet plante sannsynligvis bety mer, være mer alvorlig, enn hos en bladrik og vel utviklet plante. Hos flerårige vekster er det videre av stor betydning hvilke organer eller deler av organer som er viktig for at planten skal kunne overleve. Dersom viktige deler er uskadd, betyr det mindre om en stor prosent av plantens øvrige deler er skadd eller ødelagt av frost.

En kan også nytte frysetemperaturen som uttrykk for plantenes frostresistens. Ved å fryse plantematerialet ved flere ulike temperaturer, kan andelen overlevende planter eller graden av skade settes i relasjon til frysetemperaturen, og en kan grafisk beregne den temperatur som gir 50% skade på plantene (ED 50-temperatur, dvs. "the median effective dose"), eller 50% døde planter (LD-temperatur, "the median lethal dose") (Finney, 1952; Torsell, 1955).

Levitt, (1956) mener at frostresistens bør defineres som det antall °C som en plante må fryses under dens frysepunkt for at 50% av planten skal bli drept. Ved å gå ut fra en slik definisjon, vil planter med ulikt frysepunkt (ulik celledaftkonsentrasjon), men som blir drept så snart de fryser, ha frostresistens = 0. Definisjonen bygger altså på plantenes evne til å motstå frost etter at vevet er froset. Ved gjennomføring av mer praktisk betonte forsøk, gjør en neppe store feil om en ser bort fra eventuell forskjell i frysepunkt, men nytter antall °C under 0° som basis for bedømmelse av frostresistens.

Som nevnt er det mange vanskeligheter og feilkilder ved en skjønnsmessig og visuell bedømmelse av frostskaader hos planter. Det er derfor utarbeidet flere "indirekte" metoder som er basert på mer objektive måleprinsipper.

En av de mest brukte metodene bygger på saltdiffusjon av frostska dde celler. Dersom kuldebehandlingen har ført til skade i cellene, vil semipermiabiliteten i membranene slutte å fungere. Ved å plassere det frosne plantematerialet i vann, vil elektrolyttene fra de skadde eller drepte cellene diffundere ut i vannet. Måling av ledningsevnen i dette ekstraktet, gir indirekte et mål på frostska dde. Jo mer frostska dde, desto større mengde salter vil diffundere ut av cellene, og jo høyere blir ledningsevnen. Metoden utføres i korthet slik: Plantematerialet kuttet i biter, f.eks. 0.5-1.0 cm, og fryses ved bestemte temperaturer (plantematerialet må fryses i reagensrør, kolber e.l.). Etter frysing og opptining, fylles en viss mengde destillert vann på prøvene. Etter ekstraksjon under bestemte forhold, måles ledningsevnen i ekstraktet med passende målebro (Wheatstones bro) og målecelle. Plantep røven blir så drept ved oppvarming til ca. 100°C, og ny ekstraksjon og måling av ledningsevne blir utført. Denne måling gir uttrykk for total saltdiffusjon ved nevnte ekstraksjonsmetode. Ledningsevne etter frysing i % av total ledningsevne, gir så et uttrykk for frostska dde. For å eliminere eventuell forskjell i elektrolyttinnhold mellom ulike ledd av materialet, måles ledningsevnen i en kontrollprøve (ikke frosset) på samme vis som nevnt ovenfor (friskt og drept materiale), og denne verdi trekkes fra verdien for de frosne prøvene. En får på denne måte en indeks som gir uttrykk for frostska dde i forhold til det ubehandlede materialet (Thorsrud og Hjeltnes, 1963; Flint et al., 1966).

Denne metoden byr på mange fordeler, særlig hos vekster der det tar forholdsvis lang tid før virkningen av frost viser seg, og faren for f.eks. infeksjon og skade av sjukdomsparasitter eller annen ugunstig miljøpåvirkning kan influere på resultatet av frysingen. Metoden blir derfor mye brukt ved bestemmelse av frostska dde hos treaktige vekster (Wilner, 1962). For å oppnå reproduserbare resultater ved lednings-

evnemåling, er det svært viktig at arbeidet blir utført under nøyaktig kontrollerte og standardiserte vilkår.

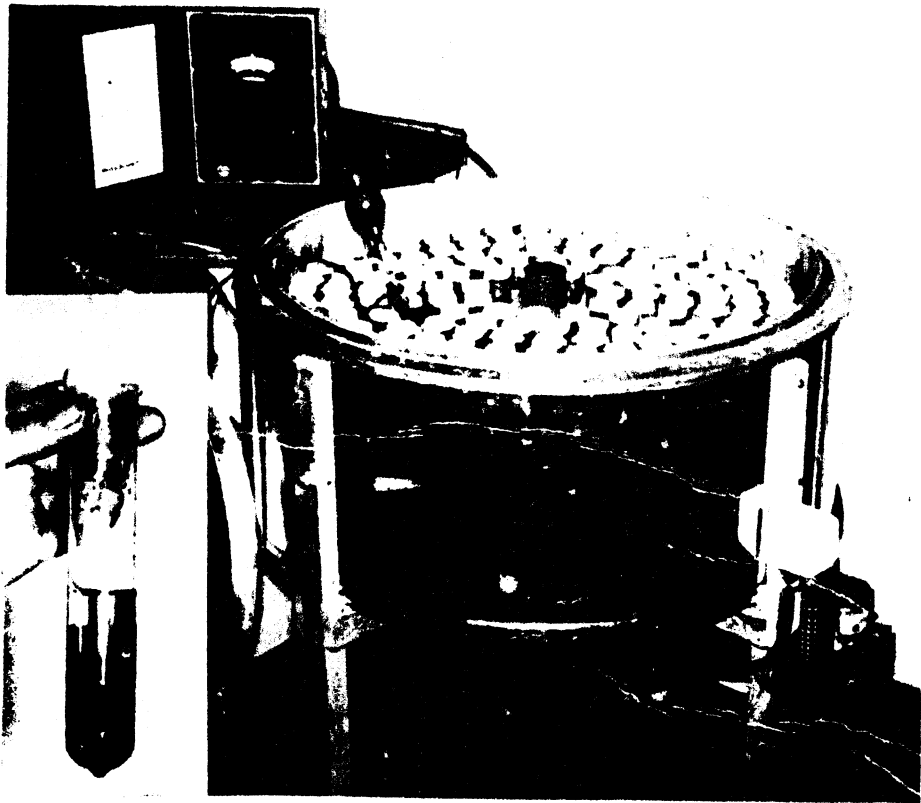


Fig. 33. Apparaturl ved bestemmelse av elektrisk lednings-
evne (Thorsrud og Hjeltnes, 1963).

Det er også utarbeidet metoder for å måle elektrisk mot-
stand in situ hos planter. På denne måten kan variasjon
i hardførhet registreres over en lengre periode, uten at
plantene forstyrres i nevneverdig grad. To klorerte sølv-
elektroder stikkes inn i plantevevet, og elektrodene for-
bindes med en egnet motstandsbru (Wilner, 1960; Calder og
MacLeod, 1965; Calder et al., 1966).

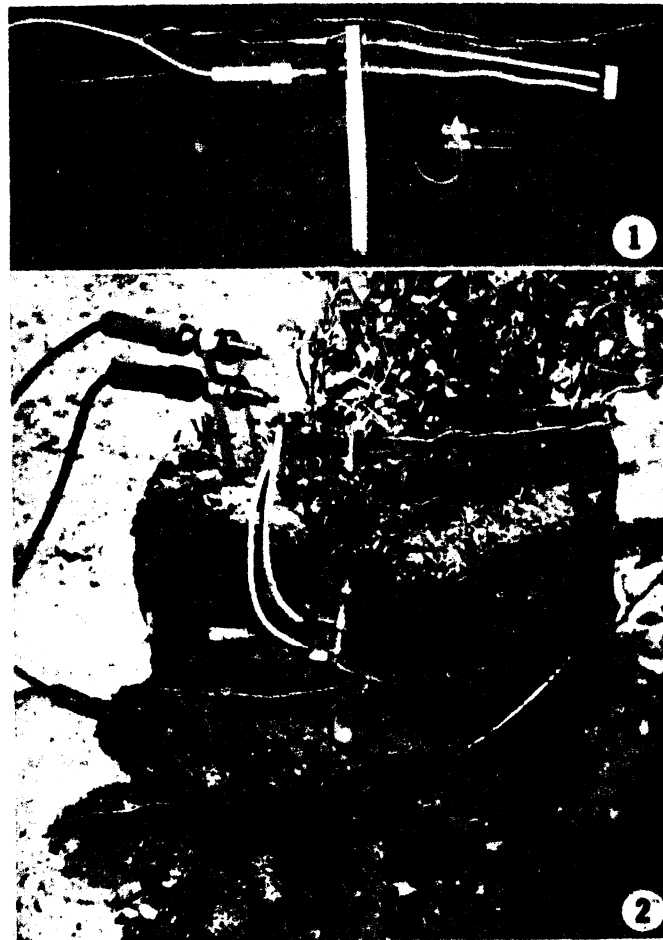


Fig. 34. Måling av elektrisk motstand in situ. 1. elektroder. 2. elektrodene på plass i en lusernerot (Calder og MacLeod, 1965).

Det er også utarbeidet andre metoder som bygger på elektriske måleprinsipper, uten at de har fått noen praktisk anvendelse.

Når cellemembranene slutter å fungere p.g.a. frostskaade, vil også organiske forbindelser "lekke" ut av cellene. Det er utarbeidet en metode som er basert på sammenhengen mellom mengden av aminosyrer, eller ninhydrin-positive stoffer, som diffunderer ut av cellene etter frysing og frostskaader. Metodikken er i prinsippet lik den som bygger på salt-diffusjon fra frostskaade celler. Mengden av amino-

syrer og andre ninhydrinpositive stoffer i ekstrakt av frosset plantemateriale bestemmes kolorimetrisk i forhold til en ekvivalent mengde glycin. Det er påvist svært god sammenheng mellom frostskafer og mengden av ninhydrinpositive stoffer hos flere vekster (Siminovitch et al., 1964).

Da organiske forbindelser, som f.eks. aminosyrer, særlig er konsentrert i levende celler, er det sannsynlig at denne metoden gir et bedre uttrykk for frostskafer i livsviktige cellelev enn elektrolytt-metoden. Særlig hos treaktige vekster, der andelen av døde cellelev er stor, kan skader i livsviktige vev som f.eks. cambium, bli maskert når saltdiffusjonen nyttes som mål på frostskaferne.

Vitalfarging blir også nyttet til å bestemme frostskafer i plantevev. Det er flere ulike fargestoffer som kan brukes, f.eks. indigocarmin, methylenblått, triphenyl-tetrazoliumclorid, nøytralrødt m.fl. Tetrazoliumsaltet er mye brukt. Det gir intens rød farge på levende cellelev, mens dødt vev ikke farges. Etter frysing snittes plantedelene og legges i en løsning av tetrazoliumclorid, f.eks. 0.10-0.5%, for en bestemt tid. Rødfargen av det uskadede vevet forårsakes av enzymer som reduserer tetrazoliumsaltet til triphenylformazan. En må være oppmerksom på at dersom plantevevet er infisert med bakterier, kan det føre til feil, fordi bakteriene også reduserer tetrazoliumsaltet (Torsell og Hellström, 1955). Ved å nytte en slik metode er det mulig å fastslå fordelingen av frostskafer i ulike organer og i ulike cellelev innenfor et organ.

Som nevnt er det mange fordeler med "indirekte" bestemmelse av frostskafer hos planter. Skadene kan registreres umiddelbart etter kuldebehandlingen, og metodene gir et objektivt, målbart uttrykk for omfanget av skadene. Fordelingen av skadene i ulike organer eller vevseksjoner kan bestemmes, om det er ønskelig. En skal imidlertid være oppmerksom på at evnen til å "komme seg" eller regenerere etter frysing og frostskafer, kan være svært ulik hos ulike planter, og slike forskjeller gir ikke disse metodene noen opplysning om. Det er derfor nødvendig å kontrollere resultatene med direkte visuell bedømmelse av frostskaferne.

VIII. Litteratur

- Andersson, G. 1944. Gas change and frost hardening studies in winter cereals. Lund. pp. 164.)
- Andrews, J. 1960. Cold hardiness of sprouting winter wheat as affected by duration of hardening and hardening temperature. Can. J. Plant Sci. 40, 94-103.
- Asahima, E. 1966. Freezing and frost resistance in insects. I "Cryobiology" (Harold T. Meryman ed.) p. 451-486. Academic Press, London and New York.
- Beard, J. And Olien, C. R. 1963. Low temperature injury in the lower portion of *Poa annua* L. crowns. Crop. Sci. 3, 362-363.
- Biebl, R. 1962. Protoplasmatische økologie der Pflanzen. 1. Wasser und Temperatur. Protoplasmatologia, Bd. XII.
- Buswel, A. M. and Rodebush, W. H. 1956. Water. Sci. Amer. 194, 76.
- Calder, F. W. and MacLeod, L. B. 1965. Effect of cold treatment of alfalfa as influenced by harvesting system and rate of potassium application. Can. Plant Sci. 46, 17-27.
- Calder, F. W. and MacLeod, L. B. 1965. An electrode implant device for in situ measurement of electrical resistance in alfalfa roots. Can. J. Plant Sci. 45, 612-613.
- Calder, F. W., MacLeod, L. B. and Hayen, R. I. 1966. Electrical resistance in alfalfa roots as affected by temperature and light. Can. J. Plant Sci. 46, 185-194.
- Cooper, J. P. 1963. Species population differences in climatic response. I "Environmental Control of plant growth" (L. F. Evans ed.) p. 381. Academic Press. New York and London.
- Daubenmire, H. F. 1959. "Plant and environment". 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, pp. 422.

- Dietrichson, J. 1962. Breeding for frost resistance. *Silv. Can.*, 10, 172-179.
- Finney, D. J. 1952. *Probit Analysis*. University Press. Cambridge. second ed. pp. 318.
- Flint, H.L., Boyce, B. R. and Beatlie, D. J. 1966. Index of injury - a useful expression of freezing injury to plant tissues as determined by the electrolytic method. *Can. J. Plant. Sci.* 47, 229-230.
- Greathouse, G. A. 1938. Conductivity measurements of plant sap. *Plant. Physiol.* 13, 553-569.
- Hamaya, T., Kurahashi, A., Takahashi, N. and Sakai, A. 1968. Studies in frost hardiness of the Japanese and the dahurian larch and their hybrids. *Bulletin of the Tokyo University Forests*, 64, 197-239.
- Heber, U. 1959. Beziehungen zwischen der Grösse von Chloroplasten und ihrem Gehalt an löslichen Eiweissen und Zuckern im Zusammenhang mit dem Frostresistenzproblem. *Protoplasma* 2, 284-298.
- Hodgson, H. J. 1964. Effect of photoperiod on development of cold resistance in alfalfa. *Crop Sci.*, 4, 302-305.
- Johansson, N. O., Albertsson, C. E. og Mansson, T. 1955. Undersökningar över höstvetets härdning och avhärdning. *Sverig. Utsadesförenings Tidskr.*, 82-96.
- Kaku, Shosuke, 1964. Undercooling points and frost resistance in mature and immature leaf tissues of some evergreen plants. *The Botanical Magazine, Tokyo*, 77, 283-289.
- Kohn, H. and Levitt, J. 1965. Interrelations between photoperiod, frost hardiness, and sulfhydryl groups in cabbage. *Plant Physiol.*, 40, 476-480.
- Levitt, J. 1956. "The hardiness of plants". Academic Press. New York. pp. 278.
- Levitt, J. 1966. Winter hardiness in plants. I "Cryobiology" (Harold T. Meryman ed.) p. 495-563. Academic Press, London and New York.

- Ljones, B., Thorsrud, J. og Sakshaug, K. 1968. Hovedeffekter og samspel av notrogengjødsling, kaliumgjødsling og skjering i forsøk med to eplesortar. Meld. Norg. Landbr. Høgsk., 48, 1-29.
- Luyet, B. J. 1966. Anatomy of the freezing process in physical systems. I "Cryobiology" (Harold T. Meryman ed.) p. 115-138.
- Mazur, P. 1966. Physical and chemical basis of injury in single-celled micro-organisms subjected to freezing and thawing. I "Cryobiology" (Harold T. Meryman ed.) p. 213-315. Academic Press, London and New York.
- Meryman, H. T. 1966. I "Cryobiology" (Harold T. Meryman ed.) p. 1-114. Academic Press, London and New York.
- Nielsen, H. M. and Lysgaard, C. P. 1956. Relationship between root and top growth and organic root reserves in lucerne. Royal Veterinary and Agricultural College. Copenhagen, Danmark. Yearbook 1956, 77-107.
- Olien, C. R. 1961. A method of studying stresses occurring in plant tissue during freezing. Crop. Sci., 1, 26-28.
- Parker, J. 1960. Survival of woody plants at extremely low temperature. Nature 187, 1133-1134.
- Paulsen, G. M. 1968. Effect of photoperiod and temperature on cold hardening in winter wheat. Crop Sci., 8, 29-32.
- Perkins, H. J. and Andrews, J. E. 1960. The effect of uptake of certain sugars and amino acids on the cold hardiness of young wheat plants. Naturwissenschaften, 24, 608-609.
- Runnels, L. K. 1966. Ice. Sci. Amer. Vol. 215, 118-126.
- Sakai, A. 1961. Effect of polyhydric alcohols on frost hardiness in plants. Nature, 189, 416-417.
- Sakai, A. 1965. Studies of the frost hardiness in woody plants. II. Effect of temperature on hardening. Plant Physiol. 41, 353-358.

- Sakai, A. 1965. Survival of plant tissue at super-low temperatures. III. Relation between effective prefreezing temperatures and the degree of frost hardiness. *Plant Physiol.* 40, 882-886.
- Sakai, A. 1966. Temperature fluctuation in wintering trees. *Physiol. Plant.* 19, 105-113.
- Schnelle, Fritz 1963. *Frostschutz im Pflanzenbau*. BLV Verlagsgesellschaft München Basel Wien.
- Shih, S. C., Jung, G. A. and Shelton, D. C. 1967. Effect of temperature and photoperiod on metabolic changes in alfalfa in relation to cold hardiness. *Crop Sci.*, 7, 385-389.
- Siminovitch, D. and Briggs, D. R. 1958. Studies on the chemistry of the living bark of black locust tree in relation to its frost hardiness. IV. Effect of ringing on translocation, protein synthesis and the development of hardiness. *Plant Physiol.* 23, 177-200.
- Siminovitch, D., Therrian, H., Gfeller, F. and Rheaume, B. 1964. The quantitative estimation of frost injury and resistance in black locust, alfalfa, and wheat tissue by determination of amino acids and other ninhydrin-reacting substances released after thawing. *Ca. J. Bot.* 42, 637-649.
- Simura, T. and Suglyama, N. 1965. Studies on the varietal differentiation of frost resistance in the tea plant. I. The seasonal change of frost resistance and its related physical and chemical properties of leaves. *Jap. J. Breeding* 15, 229-240.
- Smith, Dale and Graber, L. T. 1948. The influence of top growth removal on the root and vegetative development of biennial sweetclover. *Amer. Soc. Agron.* 40, 818-831.
- Smith, Dale, 1962. *Forage management*, 2nd ed. N.M.C. Brown Company, Iowa.
- Smith, A. U. 1961. *Biological effects of freezing and supercooling*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Sjøseth, H. 1957. Undersøkelser over frosterdighet hos engvekster. *Forskn. Fors. Landbr.* 8, 77-98.

- Sjøseth, H. 1964. Studies on frost hardening in plants. *Acta agric. Scand.* XIV, 178-193.
- Sundstøl, F. 1966. Virkningen av frost på spireevnen hos havre. *Meld. Norg. Landbr. Høgsk.* 40, (15), 1-28.
- Tappel, A. L. 1966. Effects of low temperature and freezing on enzymes and enzyme systems. I "Cryobiology" (Harold T. Meryman ed.) p. 163-177. Academic Press. London and New York.
- Thorsrud, J. og Hjeltnes, A. 1963. Undersøkelser over frosthærdigheten hos bringebær. *Forskn. Fors. Landbr.* 14, 99-117.
- Torsell, B. och Hellström, N. 1955. Investigations on oil turnips and oil rape. IV. Estimation of plant status. *Acta Agric. Scand.* V, 31-38.
- Torsell, B. 1959. Hardiness and survival of winter rape and winter turnip rape. *Växtodling. Plant. Husbandry.* Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB, pp. 168.
- Virtanen, I. A. and Nurmi, M. 1936. Studies on the winter hardiness of clovers. Effect of cutting on the carbohydrate reserves in red clover roots. *J. Agric. Sci.*, 26, 288-295.
- Walter, H. 1936. Die kryoskopische Bestimmung des osmotischen Wertes bei Pflanzen. *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Abt. XI, Teil 4.
- Walter, H. 1949. Über die Assimilation und Atmung der Pflanzen im Winter bei tiefen Temperaturen. *Ber. Deut. Botan. Ges.* 62, 47-50.
- Wang, L. C., Attce, D. J., and Truog, E. 1953. Effect of lime and fertility levels on the chemical composition and winter survival of alfalfa. *Agron. J.* 45, 381-384.

Wilner, J., Kalbfleisch, W., and Mason, W. J. 1960. Note on two electrolytic methods for determining frost hardiness of fruit trees. *Can. J. Plant Sci.* 40, 563-565.

Wilner, J. 1962. Electrolytic methods for evaluating winter hardiness of plants. *Can. Dept. Agr. Tech. Bull.* 4.

Wilson, Warren, J. 1966. An analysis of plant growth and its control in arctic environments. *Annals of Botany. N.S.* 30, (119), 382-402.

