



Alois Bilavčík, Olena Bobrova, Barbora Tunklová,
Pavol Suran, Jiří Zámečník a Miloš Faltus

Metodika stanovení mrazuvzdornosti generativních orgánů ovocných dřevin v průběhu začátku jejich vývoje v jarním období



Národní centrum zemědělského a potravinářského
výzkumu, v.v.i.



Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský
Holovousy s.r.o.

2025

Metodika je výstupem řešení projektu NAZV QK21010200 a institucionálního projektu CARC, v.v.i. č. MZE RO0423. Metodika proběhla oponentním řízením. O uplatnění metodiky byla dne 1. 12. 2025 uzavřena smlouva (č. QK21010200-2025-1) podle ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku. ÚKZÚZ, jako schvalovací orgán, vydal Osvědčení č. j. UKZUZ XXXXXX/2025 o uznání metodiky dne XX. 12. 2025.

Autoři:

RNDr. Alois Bilavčík Ph.D., CARC, v.v.i., Praha
Dr. Olena Bobrova, Ph.D., CARC, v.v.i., Praha
Ing. Barbora Tunklová, Ph.D. CARC, Praha
Ing. Pavol Suran, VŠÚO, Holovousy, s.r.o.
Ing. Jiří Zámečník, CSc., CARC, v.v.i., Praha
Ing. Miloš Faltus, Ph.D., CARC, v.v.i., Praha

Oponenti:

Mgr. Petr Maršík, Ph.D., Česká zemědělská univerzita v Praze
Bc. Tomáš Jan, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno

Metodika stanovení mrazuvzdornosti generativních orgánů ovocných dřevin v průběhu začátku jejich vývoje v jarním období

METODIKA

Metodika stanovení mrazuvzdornosti generativních orgánů ovocných dřevin v průběhu začátku jejich vývoje v jarním období

Pozdní jarní mrazy významně ohrožují stabilitu úrody ovocných dřevin v České republice, protože poškozují především jejich květní (generativní) orgány. Metodika popisuje standardizovaný laboratorní postup hodnocení mrazuvzdornosti květních orgánů v raných fenofázích pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Jednoleté výhony vybraných genotypů se odebírají na jaře, z pupenů jsou připraveny vzorky pro DSC a gravimetricky je stanoven obsah vody. Pomocí DSC se určují onsety krystalizace a tání vody a podíl krystalické vody při chlazení a ohřevu, které korelují s mírou poškození květních struktur. Tyto parametry umožňují porovnat fyziologickou toleranci generativních orgánů mezi odrůdami za kontrolovaných podmínek a odhadnout jejich relativní mrazuvzdornost. Metodika je využitelná pro výběr perspektivních, mrazuvzdornějších genotypů ve šlechtění a pro podporu rozhodování o protimrazových opatřeních v ovocnářské praxi. V podmínkách České republiky představuje první komplexní postup využívající DSC k hodnocení mrazuvzdornosti květních orgánů ovocných dřevin.

Klíčová slova: ovocné dřeviny; květní orgány; detekce mrazového poškození; DSC

Methodology for dormant berry bud cryopreservation

Late spring frosts substantially threaten yield stability of fruit trees in the Czech Republic by damaging their floral (generative) organs. This methodology describes a standardised laboratory procedure for assessing frost tolerance of floral organs in early phenological stages using differential scanning calorimetry (DSC). One-year-old shoots of selected genotypes are sampled in spring, floral buds are prepared as DSC samples and their water content is determined gravimetrically. DSC is used to determine the onset temperatures of ice crystallisation and melting and the fraction of crystalline water during cooling and heating, which correlates with the degree of damage to floral structures. These parameters enable comparison of the physiological tolerance of generative organs among cultivars under controlled conditions and provide a basis for estimating their relative frost tolerance. The methodology supports the selection of more frost-tolerant genotypes in breeding programmes and informs decisions on frost protection in orchards. To our knowledge, it represents the first comprehensive DSC-based protocol for evaluating frost tolerance of floral organs of fruit trees in the Czech Republic.

Key words: flower organs; detection of frost damage; DSC

Národní centrum zemědělského a potravinářského výzkumu, v.v.i.
2025

Obsah:

I.	Cíl metodiky.....	7
II.	Úvod	7
	a) Klimatické změny.....	7
	b) Poškození rostlin mrazem	7
	c) Význam stanovení mrazuvzdornosti	8
III.	Vlastní popis metodiky	10
	a) Princip metody	10
	b) Materiál	11
	c) Postup měření	14
	2. Termické měření na DSC	15
	3. Stanovení obsahu vody	15
	4. Analýza dat	15
	d) Vyhodnocení měření	16
	e) Shrnutí měření.....	18
IV.	Srovnání novosti postupů	19
V.	Popis uplatnění metodiky	19
VI.	Ekonomické aspekty.....	19
VII.	Seznam použité související literatury.....	20
VIII.	Seznam publikací, které předcházely metodice.....	21
IX.	Dedikace.....	22
X.	Jména oponentů	22

I. Cíl metodiky

Cílem této metodiky je, na základě principů mrazového poškození, uvést metodické postupy pro určování odolnosti květních orgánů ovocných dřevin v jejich raných fenofázích. Právě během jarního rašení dochází v České republice často k poškození ovocných dřevin, především jejich generativních orgánů, a proto je znalost jejich citlivosti k mrazovým stresům zásadní jak pro šlechtění, tak pro informované rozhodování o aplikaci protimrazových opatření.

II. Úvod

a) Klimatické změny

Cílem této metodiky je, na základě principů mrazového poškození, uvést metodické postupy pro určování odolnosti květních orgánů ovocných dřevin v jejich raných fenofázích. Právě během jarního rašení dochází v České republice často k poškození ovocných dřevin, především jejich generativních orgánů, a proto je znalost jejich citlivosti k mrazovým stresům zásadní jak pro šlechtění, tak pro informované rozhodování o aplikaci protimrazových opatření.

Nízké teploty patří mezi hlavní limitující faktory ovlivňující geografické rozšíření i produktivitu rostlin, přičemž mrazové poškození představuje značný ekonomický problém v oblastech mírného pásu i subtropů. Navzdory probíhajícímu globálnímu oteplování se riziko poškození rostlin mrazem během vegetačního období může dále zvyšovat, zejména když předčasný nástup vegetace předběhne výskyt posledních jarních mrazů. V České republice jsou v posledních letech tyto škody velmi časté; například produkce meruněk byla v roce 2020 v důsledku jarních mrazů přibližně čtvrtinová ve srovnání s předchozím rokem (Buchtová 2020) a v roce 2024 došlo k největšímu poškození za posledních 100 let. Klimatické změny se projevují teplejšími zimami, urychlením fenologie a vyšší zranitelností květů a pupenů vůči pozdním mrazům (Cosmulescu, 2008; Augspurger, 2013; Chawla a kol., 2021; Osorio-Marín a kol., 2024). Pozdní jarní mrazy pak mohou zcela zničit úrodu, zejména u peckovin, jako je švestka, jejichž pupeny patří k nejcitlivějším (Ozhereleva a Bolgova, 2023; Nesheva a Bozhkova, 2021). Typickým scénářem poškození v mírném pásu je teplé období v březnu následované náhlým mrazem v dubnu (Augspurger, 2013). Z těchto důvodů se současný výzkum zaměřuje jak na zlepšení tolerance vůči mrazu a podporu stabilního podchlazování květních orgánů, tak na implementaci adaptačních strategií v ovocnářství (Wisniewski a kol., 2016; Iurea a kol., 2020). Rostoucí význam získává i detailní sledování fenologických fází, protože právě generativní orgány jsou s postupujícím vývojem stále náchylnější k poškození mrazem, zejména pokud průběh počasí podporuje rychlý růst a tím i ztrátu jejich fyziologické odolnosti.

b) Poškození rostlin mrazem

K poškození rostlin mrazem dochází tehdy, když teploty klesnou pod kritické hodnoty, které jsou pro dané pletivo letální. Mrazuvzdornost je komplexní znak ovlivněný genetickými predispozicemi, fyziologickým stavem rostliny a aktuálními podmínkami prostředí. Základním mechanismem poškození je vznik ledu – intracelulární krystalizace, která je vždy fatální v důsledku destrukce membránových struktur, a extracelulární krystalizace, která způsobuje dehydrataci buněk a může

vést i k mechanickému poškození pletiv rostoucími ledovými krystaly (Chalker-Scott, 1992; Zámečník a kol., 1994; Wisniewski a kol., 1997). U kvetoucích výhonů je šíření ledu ovlivněno stupněm podchlazení, rychlostí poklesu teploty, stavem pletiv i přítomností anatomických bariér, které mohou pohyb ledových krystalů zpomalovat a v některých případech i zcela blokovat.

Rozsah mrazového poškození se zvyšuje s klesající teplotou a pro popis citlivosti rostlinných struktur se používají tzv. kritické teploty (T_c), tedy hodnoty teplot vyvolávající určité procento poškození (Sakai a Larcher, 1987). V ovocnářství se nejčastěji pracuje s hodnotami T_{c10} , T_{c50} a T_{c90} , které odpovídají 10 %, 50 % a 90 % poškozených pupenů nebo květů. Tyto hodnoty se během fenologického vývoje dramaticky mění – generativní orgány jsou nejodolnější v počátečních fázích nalévání pupenů, zatímco s postupujícím vývojem jejich odolnost prudce klesá. U meruňky se například T_{c90} v rané fázi rašení pohybuje kolem $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, ve fázi zvětšujícího se kalichu okolo $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$, během fenofáze balonového poupěte kolem $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a v plném květu již jen okolo $-6,4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hodnota T_{c10} ve fázi plného květu se navíc přibližuje k bodu mrazu a dosahuje přibližně $-2,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Proebsting a Mills, 1978). Nejcitlivější strukturou bývá semeník, u něhož se poškození projevuje nejdříve. Tento pokles tolerance během krátkého období před kvetením je typický pro většinu ovocných dřevin, jejichž generativní orgány patří z hlediska jarního mrazu k nejohroženějším.

Mrazuvzdornost rostlin se během roku dynamicky mění. Na podzim při vstupu do dormance dochází k otužování, kdy se zvyšuje obsah jednoduchých cukrů, prolinu a dalších kryoprotektivních látek, které stabilizují membrány a zvyšují toleranci k dehydrataci (Keller a Loescher, 1989; Palonen, 1999; Bilavčík a kol., 2012). Po dosažení zimního maxima odolnosti následuje s jarním oteplováním postupná ztráta tolerance, avšak rostliny si do určité míry uchovávají schopnost opětovného otužení, pokud dojde ke krátkodobému ochlazení. Tato flexibilita je však u generativních orgánů omezená: jejich odolnost po započetí rašení rychle klesá a nelze ji již významně zvýšit.

Procesy vzniku a šíření ledu lze sledovat různými metodami. Magnetická rezonance umožňuje přímé zobrazení toku vody a vzniku ledových struktur (Ishikawa a kol., 1997), zatímco elektronová mikroskopie poskytuje detailní obraz poškození pletiv (Ashworth 1990; Endoh a kol., 2014). V posledních letech se stále častěji uplatňuje také infračervená (IR) termografie, která bezkontaktně zaznamenává teplotu povrchu vzorků a vizualizuje teplotní odezvy během ochlazování a ohřívání (Wisniewski a kol., 1997; Fuller a Wisniewski, 1998; Hacker a Neuner, 2007; Wisniewski a kol., 2008; Livingston a kol., 2018). IR termografie umožňuje v reálném čase sledovat teplotní změny spojené s krystalizací a táním ledu, protože tyto procesy vytvářejí měřitelné tepelné rozdíly mezi vzorkem a okolím. Tato metoda poskytuje rychlou vizualizaci mrazových reakcí, avšak nedokáže kvantifikovat množství krystalizované vody ani přesně určit teploty začátku krystalizace. Mnohem přesnější metodou pro stanovení mrazuvzdornosti je diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), která umožňuje přesné určení teplot krystalizace a tání i množství krystalizované vody ve vzorku. DSC poskytuje kvantitativní informace, které IR termografie ani jiné vizuální metody nabídnout nemohou. Termická charakterizace rostlinných pletiv a orgánů je nezbytným předpokladem pro posouzení mrazové odolnosti generativních orgánů u širokého spektra genotypů ovocných dřevin, protože právě teplota ledové krystalizace úzce odpovídá reálnému poškození dané struktury (Proebsting a Mills, 1978; Meng a kol., 2007). Tato skutečnost činí DSC klíčovým nástrojem pro přesné stanovení mrazuvzdornosti a pro interpretaci rizika poškození pupenů v terénních podmínkách.

c) Význam stanovení mrazuvzdornosti

Hodnocení mrazuvzdornosti je nezbytné pro pochopení zranitelnosti různých druhů a genotypů ovocných dřevin i pro určení jejich adaptačního potenciálu vůči měnícím se klimatickým

podmínkám. Informace o tom, jak extrémně nízké teploty ovlivňují klíčové fenofáze, zejména rašení pupenů a kvetení, jsou zásadní pro predikci úrody i pro dlouhodobé plánování pěstebních strategií (Bacelar a kol., 2024). Identifikace odolných odrůd umožňuje pěstitelům činit informovaná rozhodnutí o výsadbách v lokalitách náchylných k teplotním výkyvům, a tím minimalizovat riziko ekonomických ztrát. Mrazuvzdornost je také nezastupitelným parametrem při vývoji adaptačních opatření — od cíleného šlechtění tolerantních genotypů až po optimalizaci managementu sadů a ochranných technologií.

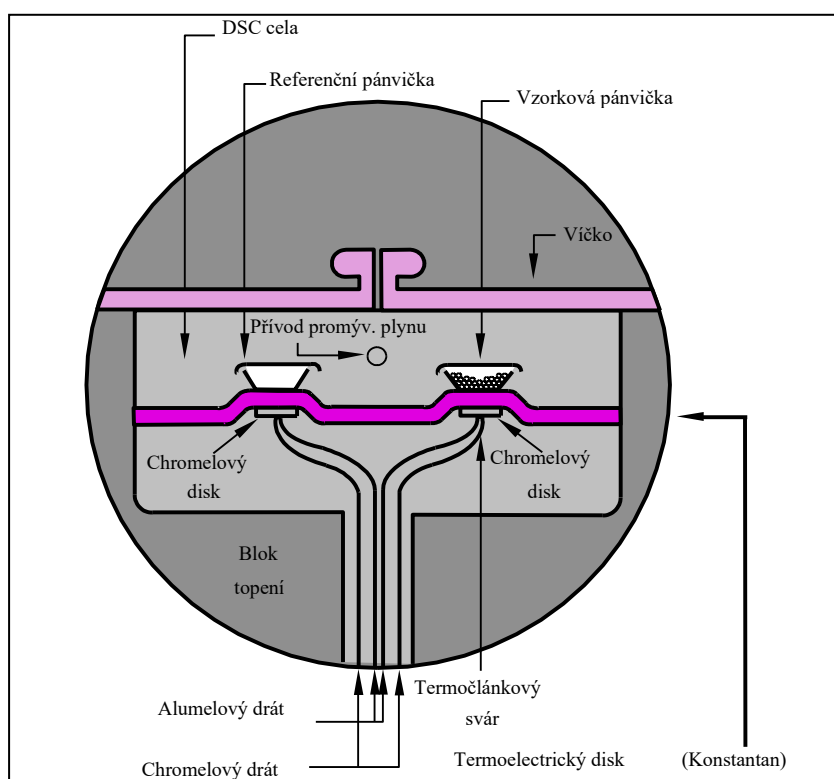
Zásadní význam má rovněž pochopení fyzikálních procesů, které se odehrávají uvnitř pupenů během chladových epizod. Studium teplotních fázových přechodů vody, především teplot krystalizace a tání, poskytuje klíčové poznatky o tom, kdy dochází k poškození buněk. Tyto informace jsou využitelné jak při laboratorním testování, tak při predikci terénních rizik a při modelování pravděpodobnosti poškození v závislosti na konkrétních podmínkách stanoviště. Stanovení mrazuvzdornosti je proto jedním z nejdůležitějších nástrojů pro zajištění dlouhodobé produktivity a udržitelnosti ovocných sadů v podmínkách častějších výkyvů počasí a extrémních jarních mrazů.

III. Vlastní popis metodiky

Další části metodiky popisují **principy metody** postup **přípravy materiálu**, postup **vlastních experimentů** a následné **vyhodnocení mrazuvzdornosti**.

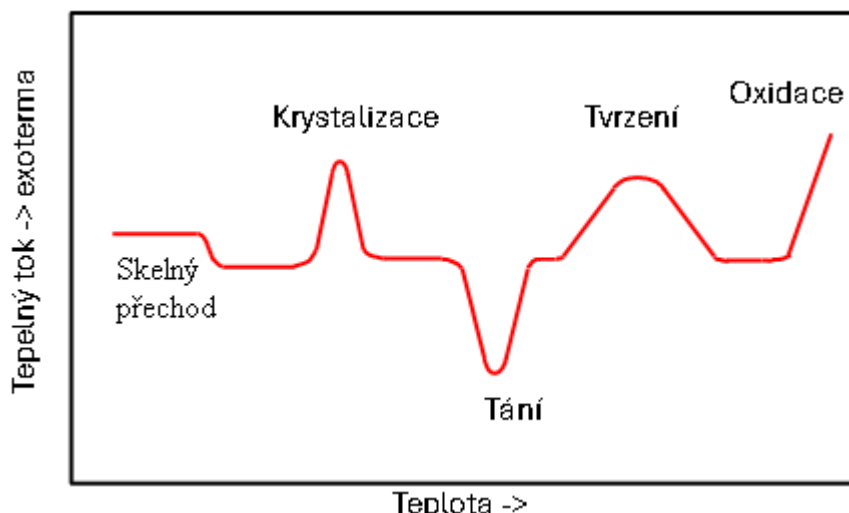
a) Princip metody

Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) je termická metoda, pomocí které lze měřit a definovat procesy fázových a skelných přeměn ve vzorcích. Pomocí DSC lze sledovat exotermické a endotermické charakteristiky a změny tepelné kapacity (ΔC_p). DSC lze využít ke stanovení skelného přechodu, teploty mrznutí, tání a varu, krystalizačního času a teploty, podílu krystalinity, specifické tepelné kapacity, reakčního tepla a tepla fúze, oxidační a teplotní stability, rychlosti a stupně tvrzení, reakční kinetiky a čistoty látek. Princip této metody spočívá ve vystavení vzorku řízenému poklesu či vzestupu teploty a měření tepla uvolněného nebo přijatého na dvou (eventuelně třech) měřených místech, z nichž na jednom, měřícím místě, je vzorek v DSC pánvičce a na druhém, referenčním místě, se nachází většinou prázdná pánvička. Schéma měřicí komory DSC viz Obrázek 1.



Obrázek 1. Schéma měřicí komory diferenčního skenovacího kalorimetru – DSC (upraveno dle TA Instruments, Inc.)

Teplo se buďto měří přímo, podle výkonu nutného k udržení měřicího místa na stejné teplotě jako referenční místo, anebo se vypočítává z teplot měřených na místě vzorku a reference. První systém se nazývá „power compensation“ DSC systém a druhý „heat flow“ DSC systém. Pomocí DSC lze měřit vzorky od teplot blízkých se teplotám kapalného dusíku, typicky v rozmezí přibližně -150 až 600 °C. Schematické znázornění fázových přechodů a skelného přechodu (T_g), viz Obrázek 2.



Obrázek 2. Schematický termogram z diferenčního skenovacího kalorimetru (DSC).

Při DSC měření se používá lineární rychlost chlazení a ohřevu. Vzhledem k časovému rozložení experimentů se používá nejčastěji rychlost $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Při termické charakterizaci sledovaného materiálu se používají hodnoty získané především při ohřevu, protože při mrazení může docházet k podchlazení vzorku. I když stupeň podchlazení koresponduje s termickou charakteristikou vzorku, má částečně stochastický charakter. Následně po nukleaci ve vzorku dojde k uvolnění velkého množství tepla najednou, což může vést k narušení regulace chlazení, a tím k nežádoucímu nerovnoměrnému poklesu programované teploty nebo dokonce k dočasnému ohřevu vzorku. Množství uvolněného tepla ze vzorku po nukleaci závisí jednak na navázce a dále na měrném skupenském teple tání látek ve vzorku (pro vodu je 335 J g^{-1}). Při ohřevu dochází k fázovému přechodu z pevného skupenství do kapalného pozvolněji, a proto k výše zmíněným nelineárním rychlostem dochází v mnohem menší míře. Vzhledem k vysoké senzitivitě a reprodukovatelnosti měření je možné považovat variabilitu způsobenou samotným DSC přístrojem za minimální.

Pro měření v diferenčním skenovacím kalorimetru se používají pánvičky z různých materiálů a objemu, který je však i u největších pánviček maximálně stovky μl . Vzhledem k tomu, že se vzrůstající velikostí pánvičky/vzorku klesá citlivost, jsou nejčastěji používány hliníkové pánvičky o objemu $40\text{ }\mu\text{l}$.

b) Materiál

1. Přístrojové vybavení

Pro stanovení mrazuvzdornosti generativních orgánů ovocných dřevin pomocí diferenční skenovací kalorimetrie je třeba disponovat následujícím přístrojovým vybavením:

Vybavení pro uskladnění rostlinného materiálu po jeho odběru ze sadu před vlastním mrazením:

- skladovací mrazicí box či chladnička nastavitelné na $2\text{-}4\text{ }^{\circ}\text{C}$

Vybavení pro stanovení hmotnosti a obsahu vody ve vzorku:

- laboratorní analytické váhy s přesností na 5 desetinných míst

- laboratorní sušárna s nastavitelnou teplotou v rozmezí 85–105 °C

Přístroj pro měření termických charakteristik:

- diferenční skenovací kalorimetr (např. DSC Discovery X3, TA Instruments, USA), viz Obrázek 3 vlevo
- lis pro hermetické uzavření pánviček do DSC (např. Tzero Press, TA Instruments, USA), viz Obrázek 3 vpravo
- Hermetické hliníkové DSC pánvičky, 40 ml (např. Tzero Pan, TA Instruments, USA)



Obrázek 3. Diferenční skenovací kalorimetr DSC Discovery X3, TA Instruments, USA, vlevo. Lis pro hermetické uzavření pánviček do DSC Tzero Press, TA Instruments, USA, se zalisovanou pánvičkou v distančním přípravku (modrý) vpravo.

Záznamy a výpočty:

- PC
- SW pro zpracování termogramů (TRIOS, TA Instruments, USA)
- statistický SW

2. Chemikálie

V následujícím seznamu jsou uvedeny všechny chemikálie potřebné pro měření mrazuvzdornosti.

Krátkodobé uchování rostlinného materiálu

- kohoutková voda
- dezinfekční prostředek na bázi chlornanu sodného
- sacharóza

Kalibrace DSC

- destilovaná voda (pro kalibraci DSC)

Proplachovací plyn pro DSC

- plynný dusík 5.0 s velmi nízkým obsahem vody

3. Drobné pomůcky

Následující pomůcky jsou potřebné pro stanovení mrazuvzdornosti generativních orgánů ovocných dřevin pomocí diferenční skenovací kalorimetrie:

Práce s generativními orgány a jejich uskladnění před analýzou:

- zahradnické nůžky
- zahradnický nůž
- provázek
- jmenovky
- popisovače
- PE pytlíky
- nádoby na krátkodobé uskladnění rostlinného materiálu

Příprava rostlinného materiálu pro měření:

- zahradnické nůžky
- pinzety
- jehla
- filtrační papír
- Petriho misky o průměru 6–10 cm
- váženky
- PE sáčky

4. Rostlinný materiál

Výchozím materiál pro měření mrazuvzdornosti generativních orgánů ovocných dřevin byl odebírán v průběhu jarního období ze sadů Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy, s.r.o. Pro experimenty byly odbírány jednoleté výhonů vybraných odrůd a genotypů meruňky, slivoně, třešně a jabloně. Výhony byly dobře vyztřalé a bez známek poškozění biotickými či abiotickými činiteli. Pro charakterizaci mrazového poškozění byla vybrána fenofáze vývoje generativního pupene zelené špičky, příklad viz Obrázek 4.



Obrázek 4. Výhon třešně 'Early Korvik' ve fázi zelené špičky.

c) Postup měření

Postup termického měření mrazuvzdornosti generativních pupenů ovocných dřevin lze rozdělit do čtyř postupných kroků:

- Příprava vzorku pro měření v DSC
- Termické měření na DSC
- Stanovení obsahu vody ve vzorku
- Analýza termogramu

1. Příprava vzorku pro měření v DSC

Nejdříve byly označeny popisovačem a zváženy prázdné hliníkové hermeticky uzavíratelné pánvičky pro měřené vzorky. Tři dobře vyztřalé a nepoškozéné generativní pupeny, odříznuté ze třech různých výhonů, byly položeny na mírně navlhčený filtrační papír v Petriho misce. Poté byl každý pupen jednotlivě umístěn do 40 ul hliníkové pánvičky řeznou ránou na dno, viz Obrázek 5, přikryt hliníkovým víčkem a hermeticky uzavřen v lisu na vzorky. V případě druhů a fenofází, u kterých byly květních pupenů již tak velké, že by se nevešly do hliníkové pánvičky, byla z květného pupene vyříznuta mrazově nejcitlivější část, pestík, a co nejrychleji hermeticky uzavřena

v pánvičce. Hermeticky uzavřené pánvičky byly zváženy na analytických vahách pro vložení hmotnostních údajů do DSC přístroje.



Obrázek 5. Květní pupeny třešně 16821. Připravené před termickým měřením, vlevo, vnitřní část květního pupene v 40 μl hermetické pánvičce před hermetickým uzavřením, vpravo.

2. Termické měření na DSC

Hliníkové pánvičky se vzorky byly vloženy do autosamplerové části DSC Discovery X3, který umožňuje měření třech vzorků současně. Výhoda použití autosampleru spočívala ve standardizovaném umístění vzorků na měřící místa do cely. Jako reference sloužila prázdná hliníková pánvička. Měření probíhalo při průtoku plynného dusíku 50 ml min^{-1} a vzorkovací frekvenci $0,2 \text{ s bod}^{-1}$. Nastavený program měření byl:

- Ustálení: $20,00 \text{ }^\circ\text{C}$
- Rychlost chlazení: $10,00 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ do $-50,00 \text{ }^\circ\text{C}$
- Izoterma: $5,0 \text{ min}$
- Rychlost ohřevu: $10,00 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ do $-50,00 \text{ }^\circ\text{C}$

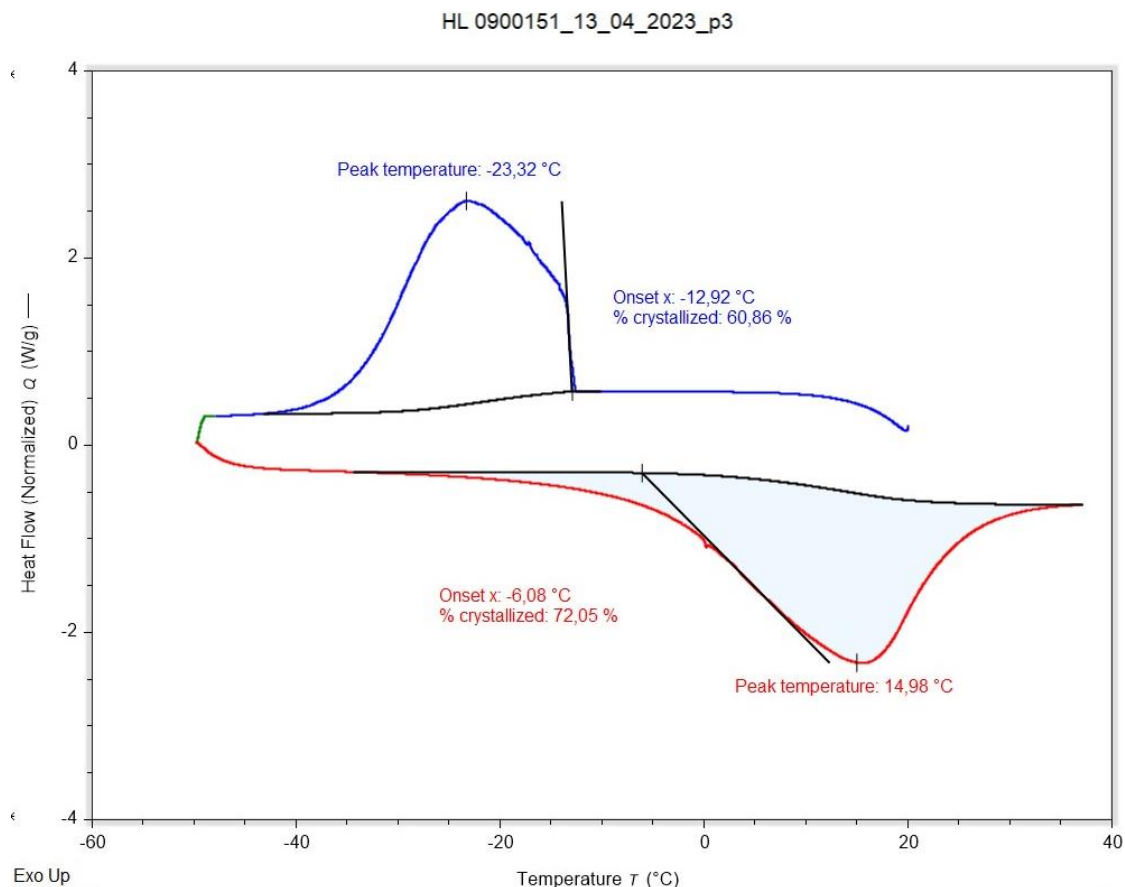
3. Stanovení obsahu vody

Po skončení měření bylo u všech pánviček najednou propíchnuté jehlou víčko a na Petriho misce byly vloženy do sušárny nastavené na $105 \text{ }^\circ\text{C}$ a sušeny po dobu minimálně 2 dnů do konstantní hmotnosti. Obsah vody ve vzorcích byl stanoven gravimetricky, jako podíl rozdílu mezi čerstvou hmotností a sušinou k čerstvé hmotnosti, což odpovídá relativnímu obsahu vody v čerstvém materiálu. U každého vzorku byla stanovena i absolutní hmotnost vody pro správný výpočet termických charakteristik.

4. Analýza dat

Pro analýzu termogramů získaných měřeními byly vloženy do každého jednotlivého datového souboru u každého vložena v SW Trios odpovídající absolutní hmotnost vody. Při termické analýze byla použita pro specifické skupenské teplo tání vody použita konstanta $333,4 \text{ Jg}^{-1}$. U každého měření byly analyzovány onsety píku krystalizace (exotermie) a tání (endotermie) a plochy těchto píků. Plochy píků po vložení výše uvedených hodnot absolutní hmotnosti vody a konstanty

odpovídaly množství krystalické vody ve vzorku. Ukázka termogramu s vyhodnocenými termickými charakteristikami viz Obrázek 6.



Obrázek 6. DSC termogram generativního pupene slivoně HL0900151 s vyhodnocení onsetů píků krystalizace a tání a plochy píku krystalizované vody při chlazení (modrá křivka) a ohřevu (červená křivka). V horní části křivky je výrazný pík krystalizace během chlazení s vyznačenými krystalizačními onsety a v dolní části křivky je pík tání během ohřevu. Rychlost chlazení a ohřevu byla $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

d) Vyhodnocení měření

Hlavními parametry termických měření pro porovnání mrazové odolnosti květních orgánů ovocných dřevin jsou teploty onsetu píků krystalizace a tání, nikoli jejich maxima, protože maxima píku výrazně ovlivňuje hmotnost vzorku, rychlost skenování a geometrie pánvičky. Dalším důležitým parametrem je entalpie fázového přechodu, která je úměrná ploše píků. Podle entalpie krystalizace a tání bylo možné vypočítat podíl vody v generativních pupenech, který zkrystalizoval během chlazení a opět roztál během ohřevu.

Ukázka porovnání termických charakteristik u skupiny odrůd a genotypů na příkladu slivoně viz Tabulka 1. Obecně lze předpokládat, že nižší teploty onsetu krystalizace a tání, stejně jako nižší procento krystalické vody, naznačují u daného genotypu či odrůdy vyšší odolnost proti mrazu. Z termogramů je zřejmé, že teploty krystalizace a tání při chlazení a ohřevu nejsou totožné. Rozdíl mezi těmito parametry ukazuje, jak velká je tendence pupenů konkrétního genotypu k

podchlazení. Vyšší schopnost podchlazení umožňuje pupenům přežít prudké poklesy teploty vzduchu, protože se snižuje pravděpodobnost předčasné nukleace ledu.

Tabulka 1. Onsety píků krystalizace (modře) a tání (červeně) vody a procento krystalizované vody během chlazení (modře) a ohřevu (červeně) v generativních orgánech testovaných genotypů a odrůd slivoně. Data jsou uvedena jako průměr ± SE.

Slivoň	Onset píku (°C)				Množství krystalické vody (%)			
	krystalizace		tání		chlazení		ohřev	
	průměr	SE	průměr	SE	průměr	SE	průměr	SE
HL 0400011	-11,8	0,73	-5,7	0,52	79,7	0,83	85,4	1,02
HL 0600012	-9,8	0,82	-4,2	1,48	77,1	0,88	81,7	1,98
HL 0624	-10,9	1,53	-5,7	0,94	80,1	2,03	82,9	0,58
HL 0635	-13,7	0,24	-3,8	1,49	77,3	2,49	77,8	2,23
HL 0800032	-19,1	0,30	-4,4	0,20	75,7	1,63	86,5	2,82
HL 0800084	-8,1	0,12	-5,1	0,65	81,1	1,26	87,8	1,31
HL 0900045	-15,6	0,96	-5,6	0,93	77,0	1,57	85,4	1,42
HL 0900090	-7,7	0,78	-6,0	0,43	80,5	1,71	85,5	1,06
HL 0900097	-17,3	1,53	-6,6	0,72	79,2	2,08	85,3	1,15
HL 0900134	-11,2	1,35	-5,6	0,65	79,9	1,00	87,1	1,02
HL 0900151	-11,7	1,41	-5,5	0,71	80,2	1,11	90,4	2,31
HL 0900208	-14,8	0,70	-6,8	1,25	78,8	1,06	86,4	2,21
HL 0900227	-11,1	0,87	-6,0	0,68	80,3	1,15	87,1	1,51
HL 9900004	-10,8	0,49	-4,7	2,06	78,2	2,23	85,0	4,12
HLT 1-10	-10,6	0,81	-1,5	0,33	77,5	1,60	85,4	0,66
'D. velkoplodá'	-8,0	0,36	-5,7	0,09	77,1	2,46	80,3	3,49
'Gabrovská'	-8,2	0,35	-5,1	0,69	77,5	1,33	81,0	1,42
'Presenta'	-9,7	0,28	-5,7	0,42	78,1	1,02	85,2	1,24
'Tophit'	-8,7	0,12	-4,9	1,00	77,8	1,60	80,6	1,83
'Toptaste'	-11,7	2,85	-6,0	0,66	77,7	4,72	82,6	6,06

Charakterizace výsledků na příkladu slivoně

Nejvyšší hodnoty onsetu krystalizace testovaných pupenů slivoní (fenofáze rašení pupenů – zelená špička) v roce 2023 vykazovaly položky HL 0900090, Domácí velkoplodá, HL 0800084, Gabrovská a Tophit. Nejnižší hodnoty onsetu krystalizace testovaných pupenů slivoní (fenofáze rašení pupenů – zelená špička) v roce 2023 vykazovaly položky HL 0800032, HL 0900097, HL 0900045, HL 0900208 a HL 0635.

Nejvyšší hodnoty onsetu tání testovaných pupenů slivoní (fenofáze rašení pupenů – zelená špička) v roce 2023 vykazovaly položky HLT 1-10, HL 0635, HL 0600012, HL 0800032 a HL 9900004. Nejnižší hodnoty onsetu tání testovaných pupenů slivoní (fenofáze rašení pupenů – zelená špička) v roce 2023 vykazovaly položky HL 0900208, HL 0900097, HL 0900227, Toptaste a HL 0900090.

Nejvyšší hodnoty rozdílu onsetu tání a krystalizace (schopnosti podchlazení) testovaných pupenů slivoní (fenofáze rašení pupenů – zelená špička) v roce 2023 vykazovaly položky HL 0800032, HL 0900097, HL 0900045, HL 0635 a HLT 1-10. Nejnižší hodnoty onsetu tání testovaných pupenů slivoní (fenofáze rašení pupenů – zelená špička) v roce 2023 vykazovaly HL 0900090, Domácí velkoplodá, HL 0800084, Gabrovská a Tophit.

Nejvyšší hodnoty množství krystalizované vody během chlazení testovaných pupenů slivoní (fenofáze rašení pupenů – zelená špička) v roce 2023 vykazovaly položky HL 0800084, HL 0900090, HL 0900227, HL 0900151 a HL 0624. Nejnižší hodnoty množství krystalizované vody během chlazení testovaných pupenů slivoní (fenofáze rašení pupenů – zelená špička) v roce 2023 vykazovaly položky HL 0800032, HL 0900045, HL 0600012, Domáci velkoplodá a HL 0635.

Nejvyšší hodnoty množství krystalizované vody během ohřevu testovaných pupenů slivoní (fenofáze rašení pupenů – zelená špička) v roce 2023 vykazovaly položky HL 0900151, HL 0800084, HL 0900134, HL 0900227 a HL 0800032. Nejnižší hodnoty množství krystalizované vody během ohřevu testovaných pupenů slivoní (fenofáze rašení pupenů – zelená špička) v roce 2023 vykazovaly položky HL 0635, Domáci velkoplodá, Tophit, Gabrovská a HL 0600012.

Nejvyšší hodnoty rozdílu množství krystalizované vody během chlazení a ohřevu testovaných pupenů slivoní (fenofáze rašení pupenů – zelená špička) v roce 2023 vykazovaly položky HL 0800032, HL 0900151, HL 0900045, HLT 1-10 a HL 0900208. Nejnižší hodnoty množství krystalizované vody během chlazení testovaných pupenů slivoní (fenofáze rašení pupenů – zelená špička) v roce 2023 vykazovaly HL 0635, Tophit, HL 0624, Domáci velkoplodá a Gabrovská.

e) Shrnutí měření

Při posuzování mrazové odolnosti rostlin se tradičně provádějí pozorování na venkovních stanovištích. Tato pozorování mají nezastupitelný význam v hodnocení mrazuvzdornosti, avšak z hlediska variability výskytu mrazových epizod, a především s ohledem na nemožnost standardizace podmínek, je nutné využívat také laboratorní metody. Jednou z metod vhodných pro posouzení mrazové odolnosti jsou termická měření, která charakterizují chování vody při mrznutí v rostlinných pletivech a orgánech. Teploty krystalizace vody a její krystalizovaný podíl jsou parametry úzce korelující s mírou poškození dané struktury (Proebsting a Mills, 1978; Meng a kol., 2007). Termická charakterizace tak umožňuje porovnat fyziologickou toleranci generativních orgánů mezi jednotlivými odrůdami či genotypy, a to za kontrolovaných a reprodukovatelných podmínek, které nelze v terénu zajistit. Pro porovnání poškození květních orgánů v průběhu jejich vystavení nízkým teplotám byla vytvořena tato metodika, která charakterizuje vnitřní fyziologické parametry generativních orgánů ovocných dřevin, jako je obsah vody, podíl krystalické vody a teploty onsetu krystalizace a tání. Uvedený postup hodnocení mrazového poškození generativních orgánů ovocných dřevin bude na pracovišti CARC, v.v.i., v Praze-Ruzyni ve spolupráci s VŠÚO Holovousy s.r.o. aplikován pro stanovení mrazuvzdornosti nových perspektivních genotypů ovocných dřevin.

IV. Srovnání novosti postupů

Navržená metodika přináší ucelený postup pro hodnocení citlivosti květních (generativních) orgánů ovocných dřevin k mrazovému poškození v raných fenologických fázích. Metodika poskytuje standardizované laboratorní a hodnoticí přístupy umožňující definované stanovení mrazuvzdornosti, a tím podporuje jak šlechtitelské programy, tak rozhodovací procesy při volbě a načasování protimrazových opatření v ovocnářské praxi. V České republice dosud nebyl publikován obdobný komplexní postup zaměřený na přesné stanovení odolnosti květních orgánů ovocných dřevin vůči raným jarním mrazům.

V. Popis uplatnění metodiky

Uživatelem této metodiky budou odborné instituce, a to prostřednictvím Ovocnářské unie České republiky, z. s., Holovousy 129, 508 01. Tato metodika umožní exaktní a efektivní testování mrazové odolnosti květních orgánů vybraných ovocných dřevin a bude využitelná jak při šlechtění, tak v rámci rozhodovacích procesů týkajících se aplikace protimrazových opatření.

VI. Ekonomické aspekty

Hodnocení mrazuvzdornosti generativních orgánů ovocných dřevin je klíčové pro dlouhodobou udržitelnost a bezpečné zachování genových zdrojů, protože právě citlivost květních pupenů k jarním mrazům zásadně ovlivňuje plodnost i perspektivu využití jednotlivých genotypů ve šlechtění i pěstitelské praxi. V současnosti se proto ukazuje jako nezbytné hodnotit odrůdy a genotypy nejen podle agronomických znaků, ale také podle jejich fyziologické odolnosti k nízkým teplotám. Metodika založená na diferenční skenovací kalorimetrii (DSC) umožňuje provést toto hodnocení standardizovaně, reprodukovatelně a nezávisle na proměnlivých terénních podmínkách. Výhodou je, že analýza květních pupenů může být provedena v krátkém časovém období před rašením, s minimálními nároky na materiál, a poskytuje jednoznačné kvantitativní ukazatele, jako jsou onsety krystalizace a tání či podíl krystalické vody, které spolehlivě odrážejí citlivost jednotlivých genotypů. Pro uživatele je tato metodika ekonomicky výhodná zejména tím, že nevyžaduje rozsáhlou experimentální infrastrukturu nad rámec standardního DSC přístroje, jenž je v moderních laboratorních podmínkách dostupný a samotná analýza jednoho vzorku vyjde přibližně na sto Kč. Umožňuje také rychle porovnat široké spektrum genotypů a identifikovat ty, které jsou vhodné pro dlouhodobé pěstování v oblastech s častými výkyvy jarních teplot. Její největší přínos spočívá ve snížení rizika ztráty genotypů, jejichž mrazová tolerance by jinak byla odhadována pouze na základě nestabilních terénních pozorování, a v podpoře šlechtitelských programů zahrnujících odolnost generativních orgánů jako jeden z hlavních selekčních znaků.

Analýza ekonomické efektivity ochrany proti jarním mrazům navíc ukazuje, že investice do protimrazových opatření mohou mít významný finanční přínos. Například v evropských sadovnických oblastech byla uvažována ochrana s použitím aktivních metod (vrtulníky, větrné stroje, zavlažování), přičemž studie uvádějí, že při průměrné roční frekvenci mrazových událostí a průměrných výnosech lze očekávat zachráněnou úrodu v řádu desítek procent ztraceného objemu bez ochrany. Pokud by se v konkrétní sadařské praxi jenom u meruněk dosáhlo snížení ztrát o pouhých 10 % a průměrná hodnota produkce v dané lokalitě činila přibližně 140 tis. Kč ha⁻¹ (50 Kč kg⁻¹; 2,8 t ha⁻¹), znamenal by tento efekt přínos kolem 10,5 mil. Kč při celkové rozloze sadů meruňky

v ČR (přibližně 750 ha v roce 2019). V kontextu této metodiky pak platí, že identifikace mrazuvzdorných genotypů a jejich využití ve šlechtění i výsadbě umožňuje snížit riziko ztráty celé úrody – toto snížení rizika lze chápat jako „zajištěnou hodnotu“ genotypu vyjádřenou v podobě zachráněného výnosu. Nejen aktivní protimrazová ochrana, ale i samotná selekce odrůd podle jejich mrazové tolerance tak představuje významný finanční přínos, který by měl být zohledněn při ekonomickém rozhodování v ovocnářské praxi.

VII. Seznam použité související literatury

- Augspurger, C.K. (2013). Reconstructing patterns of temperature, phenology, and frost damage over 124 years: spring damage risk is increasing. *Ecology*, 94(1), 41-50.
- Bacelar, E., Pinto, T., Anjos, R., Morais, M. C., Oliveira, I., Vilela, A., & Cosme, F. (2024). Impacts of climate change and mitigation strategies for some abiotic and biotic constraints influencing fruit growth and quality. *Plants*, 13(14), 1942.
- Bilavčík A, Zámečník J, Grospietsch M, Faltus M, Jadrná P, 2012 Dormancy development during cold hardening of in vitro cultured *Malus domestica* Borkh. plants in relation to their frost resistance and cryotolerance. *Trees*. 26(4):1181-92.
- Buchtová I., 2020 Situační a výhledová zpráva Ovoce 12/2020. Ministerstvo zemědělství, Praha, https://eagri.cz/public/web/file/666701/SVZ_Ovoce_12_2020.pdf
- Chalker-Scott L., 1992 Disruption of an ice-nucleation barrier in cold hardy *Azalea* buds by sublethal heat stress, *Annals of Botany* 70:409-418.
- Chawla, R., Sheokand, A., Rai, M.R., Kumar, R., & Sadawarti (2021). Impact of climate change on fruit production and various approaches to mitigate these impacts. *The Pharma Innovation Journal*, 10(3), 564-571.
- Cosmulescu, S., Baciú, A., Cichi, M., Gruia, M., & Ciobanu, A. (2008). Phenologic changes in plum tree species in the context of current climate changes. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture*, 65(1).
- Fuller MP., Wisniewski M., 1998 The use of infrared thermal imaging in the study of ice nucleation and freezing of plants. *J Therm Biol* 23:81–89.
- Hacker J., Neuner G., 2007 Ice propagation in plants visualized at the tissue level by infrared differential thermal analysis (IDTA). *Tree Physiol* 27:1661–1670.
- Iurea, E., Chelaru, S., Gherghel, M.I., Sîrbu, S., Turcu, C.I., Ungureanu, I.V., & Perju, I. (2020). The influence of low temperatures during blooming in fruit growing trees species. *Current Trends in Natural Sciences*, 9 (17), 341-345.
- Ishikawa M., Price, W.S., Ide H., Arata Y, 1997 Visualization of freezing behaviors in leaf and flower buds of full-moon maple by nuclear magnetic resonance microscopy. *Plant Physiology*, 115(4):1515-1524.
- Keller JD, Loescher W.H., 1989 Nonstructural carbohydrate partitioning in perennial parts of sweet cherry. *J Amer Soc Hortic Sci*, 114, 969-975.
- Livingston DP., Tuong TD., Murphy JP., Gusta LV., Willick I., Wisniewski ME., 2018 High-definition infrared thermography of ice nucleation and propagation in wheat under natural frost conditions and controlled freezing. *Planta*, 247(4):791-806.

- Meng QR., Liang YQ., Wang WF., Du SH., Li YH., Yang JM., 2007 Study on supercooling point and freezing point in floral organs of apricot. *Agricultural Sciences in China*, 6(11):1330-1335.
- Nesheva, M., & Bozhkova, V. (2021). Spring frost damages of plum and apricot cultivars grown in the region of Plovdiv, Bulgaria. *Scientific Papers. Series B, Horticulture.*, 65(1), 194-197.
- Osorio-Marín, J., Fernandez, E., Vieli, L., Ribera, A., Luedeling, E., & Cobo, N. (2024). Climate change impacts on temperate fruit and nut production: a systematic review. *Frontiers in Plant Science*, 15.
- Ozhereleva, Z.E., & Bolgova, A.O. (2023). Selection for breeding use of plum varieties resistant to spring frosts from the bioresource collection of VNIISPK. *Vestnik of the Russian agricultural science*, (6), 65-70.
- Palonen P., 1999 Relationship of seasonal changes in carbohydrates and cold hardiness in canes and buds of three red raspberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 124(5):507-13.
- ProebstingELJr., Mills HH., 1978 Low temperature resistance of developing flower buds of six deciduous fruit species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 103:192–198.
- Sakai A, Larcher W, 1987. Frost survival of plants. New York NY: Springer-Verlag. 1-20
- Wisniewski, M., Artlip, T., & Norelli, J. (2016). Dealing with frost damage and climate change in tree fruit crops. *New York State Fruit Quart*, 24, 25-28.
- Wisniewski M., Glenn DM., Gusta L., Fuller M., 2008 Using infrared thermography to study freezing in plants. *Hortscience* 43:1648–1651.
- Wisniewski M., Lindow SE., Ashworth E., 1997 Observations of ice nucleation and propagation in plants using infrared video thermography. *Plant Physiol* 113:327–334.
- Zámečník J., Bieblova J., Grospietsch M, 1994 Safety zone as a barrier to root-shoot ice propagation. *Plant and soil*, 167(1):149-155.

VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Bobrova, O., Bilavcik, A., Zamecnik, J., Faltus, M. (2023). Water state of apricot stem cuttings during dehydration. In IV International Symposium on Plant Cryopreservation 1421 (pp. 11-20).
- Faltus, M., Bilavcik, A., Hammond, S. D. H., Zamecnik, J. (2022). Vitrification process control by DSC. *Cryobiology*, 109, 23-24.
- Bilavcik, A., Faltus, M. and Zamecnik, J., (2021). The survival of pear dormant buds at ultra-low temperatures. *Plants*, 10(11), 2502.
- Zamecnik, J., Faltus, M., Bilavcik, A. (2021). Vitrification solutions for plant cryopreservation: Modification and properties. *Plants*, 10(12), 2623.
- Bilavcik, A., Zamecnik, J., Faltus, M. (2015) Cryotolerance of apple tree bud is independent of endodormancy. *Frontiers in plant science*, 6, 13.
- Bilavčík, A., Zámečník, J., Grospietsch, M., Faltus, M., Jadrná, P. (2012) Dormancy development during cold hardening of *in vitro* cultured *Malus domestica* Borkh. plants in relation to their frost resistance and cryotolerance. *Trees*, 26(4), 1181-1192.

IX. Dedikace

Metodika je výstupem řešení projektu NAZV QK21010200 a institucionálního projektu CARC, v.v.i. č. MZE RO0423.

X. Jména oponentů

Odborný oponent:

Mgr. Petr Maršík, Ph.D.

Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha – Suchdol

Oponent ze státní správy:

Bc. Tomáš Jan

Oddělení zkoušek odlišnosti, uniformity a stálosti, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Hroznová 2, 656 06 Brno

Název: Metodika stanovení mrazuvzdornosti generativních orgánů ovocných dřevin v průběhu začátku jejich vývoje v jarním období

METODIKA

Autoři (podíl na práci): RNDr. Alois Bilavčík Ph.D. (50 %)
Dr. Olena Bobrova, Ph.D. (20 %)
Ing. Barbora Tunklová, Ph.D. (15 %)
Ing. Pavol Suran (5 %)
Ing. Jiří Zámečník, CSc. (5 %)
Ing. Miloš Faltus, Ph.D. (5 %)

Vydal: Národní centrum zemědělského a potravinářského výzkumu, v.v.i.
Drnovská 507, 161 00, Praha 6 – Ruzyně

Metodika je veřejně přístupná na adrese www.carc.cz

Náklad: elektronická podoba

Vyšlo v roce 2025, první vydání

Vydáno bez jazykové úpravy

Kontakt na autory: alois.bilavcik@carc.cz
olena.bobrova@carc.cz
barbora.tunklova@carc.cz
pavol.suran@vsuo.cz
jiri.zamecnik@carc.cz
milos.faltus@carc.cz

Titulní fotografie: Alois Bilavčík
Fotografie v textu: Alois Bilavčík

© Národní centrum zemědělského a potravinářského výzkumu, v.v.i., Praha, 2025
ISBN: 978-80-7427-451-0

