

Ultraschallemissionen bei Gefrier-Tau-Vorgängen in Koniferenholz

Stefan MAYR, Verena ZUBLASING, Universität Innsbruck, Innsbruck, Österreich
Silvia KIKUTA, Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich

Kurzfassung. Die Wassersäule in den Leitelementen des pflanzlichen Xylems kann durch Trockenheit oder Gefrier-Tauvorgänge abreißen. Die Entstehung derartiger „Embolien“ bedingt eine Verringerung der hydraulischen Leitfähigkeit verursacht in der Regel Ultraschallemissionen. Es wird angenommen, dass Gefrier-Tau induzierte Embolien durch Ausgasen gelöster Luft während des Frierens und Ausdehnung der Blasen während des Tauvorganges entstehen („bubble formation“-Hypothese). Die Emboliebildung ist dabei von der Größe der gebildeten Blasen und von der Zugspannung in der Wassersäule abhängig.

Zur Untersuchung der Gefrier-Tau induzierten Bildung von Embolien wurden in einer Kälte-Wärmetestkammer Gefrierversuche mit unterschiedlich stark wassergestressten Proben durchgeführt. Die während der Temperaturzyklen emittierten Ultraschallsignale wurden dabei in verschiedenen Koniferenarten der Gattungen *Juniperus*, *Larix*, *Picea* und *Pinus* analysiert. Ultraschallemissionen traten ausschließlich in wassergestressten Proben und jeweils nur während des Gefriervorganges auf. Wassergesättigte- oder vollständig ausgetrocknete Proben zeigten hingegen keine akustische Aktivität. Wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen führten zu einer Zunahme der kumulativen Ultraschallsignale bei wassergestressten Proben, ebenso verursachten tiefere Minimumtemperaturen eine größere Zahl von Ultraschallsignalen.

Die beobachteten Ultraschallemissionen stehen wahrscheinlich in Zusammenhang mit der Bildung der Gasblasen, die nur unter Zugspannung zu Ultraschallemissionen führt. Die Zunahme der Ultraschallemissionen bei wiederholten Gefrier-Tau-Zyklen korreliert mit der in früheren Freiland- und experimentellen Studien beobachteten Zunahme hydraulischer Leitfähigkeitsverluste. Die Veränderung der akustischen Aktivität bei unterschiedlichen Minimumtemperaturen könnte auf Unterschiede im Wasserpotential oder in den akustischen Eigenschaften des Eiskörpers zurückzuführen sein.

1. Einleitung

Der pflanzliche Wassertransport basiert auf einem System zusammenhängender Wassersäulen, die die Übertragung von Wasserpotentialgradienten zwischen Blättern und Wurzeln und damit die Wasserversorgung der Pflanze gewährleisten [1]. Unterbrechungen dieser Wassersäulen – sogenannte Embolien – verringern die hydraulische Leitfähigkeit und führen zu Wasserstress in den zu versorgenden Pflanzenteilen [2].

Im Wesentlichen ist die Entstehung von Embolien auf zwei Ursachen zurückzuführen: Trockenstress und Gefrier-Tau-Vorgänge. Bei Trockenstress kann ein tiefes Wasserpotential zum Einbrechen von Luft in die Gefäße des Leitgewebes (Xylem) führen [2, 3, 4]. Bei Gefrier-Tau-Vorgängen wird angenommen, dass während des Gefriervorganges Luftblasen ausgasen, da Luft nur sehr schwer in Eis löslich ist. Beim Auftauen lösen sich diese Luftblasen normalerweise wieder in der umgebenden Flüssigkeit auf [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11]. Der in der Blase – aufgrund der Oberflächenspannung (T) an der Grenzschicht von Gas und Flüssigkeit - herrschende Druck

(P_B) wird durch das Gesetz von La Place (1) beschrieben. Er ist indirekt proportional zum Durchmesser (D_B) der Gasblase [12].

$$P_B = 4T/D_B \quad (1)$$

Ist die Zugspannung des umgebenden Xylemsaftes (P_X) jedoch größer als P_B , kann die Blase expandieren und eine Embolie verursachen. Da in weiten Leitgefäßen eine große Menge an Luft im Saft gelöst ist, bilden sich beim Frieren größere Blasen mit geringerem P_B (Abb. 1). Die Anfälligkeit gegenüber Gefrier-Tau-induzierten Embolien ist deshalb bei weitlumigen Gehölzen (z.B. ringporige Laubhölzer) besonders hoch. Koniferen mit ihren kurzen und engen Leitelementen (Tracheiden) galten hingegen als nahezu völlig resistent [5, 8, 13, 14].

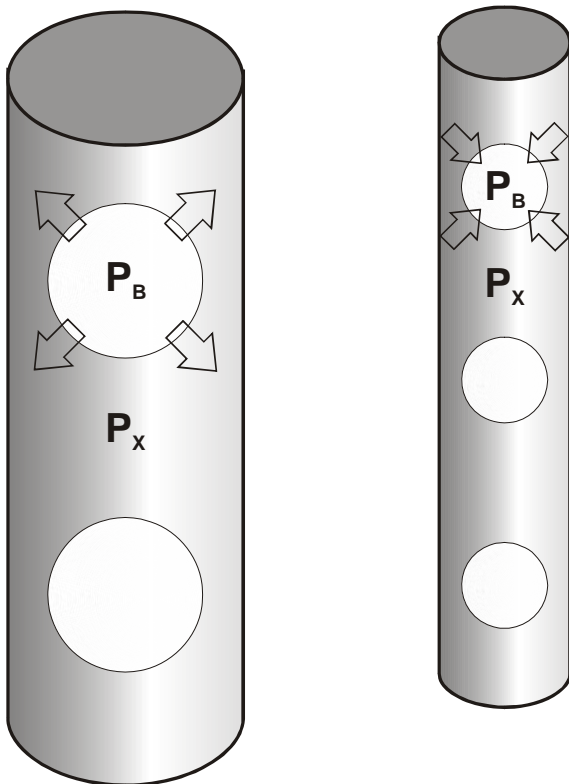


Abbildung 1

In weiten Gefäßen (links) bilden sich beim Einfrieren relativ große Gasblasen aufgrund der größeren Menge an im Xylemsaft gelösten Gasen. In englumigen Leitelementen (z.B. Koniferentracheiden) entstehen hingegen nur kleine Blasen (rechts). Entsprechend dem Gesetz von La Place dehnen sich diese Blasen aus, wenn das Wasserpotential im Xylemsaft (P_X) stärker negativ als der in der Blase herrschende Druck (P_B) ist. Deshalb sind Arten mit kleinen Leitelementen wesentlich resistenter gegenüber Gefrier-Tau-induzierten Embolien. Modifiziert nach [12].

In einer vorhergehenden Studie konnte allerdings belegt werden, dass Koniferen bei wiederholten Gefrier-Tauzyklen und gleichzeitigem Trockenstress Embolien erleiden [15]. Junge Fichten wiesen bei einem Wasserpotential von -3.5 MPa nach 100 Gefrier-Tau Zyklen einen Emboliegrad von 100% auf. Der Effekt der Temperaturzyklen war bei mäßigem Trockenstress am höchsten, bei gesättigten und vollständig ausgetrockneten Proben zeigte die Temperaturbehandlung keine Auswirkungen (Abb. 2). Die Ergebnisse dieser Studie lassen sich nicht durch die klassische „bubble formation“ – Hypothese erklären, da die Bedingungen für ein Auflösen der Blase während des Tauprozesses bei allen Temperaturzyklen konstant waren. Trotz gleich bleibender Bedingungen kam es jedoch in den meisten Leitelementen zu einer Wiederauflösung gebildeter Blasen beim ersten, nicht jedoch bei einem der darauffolgenden Zyklen. Ultraschallanalysen [16] zeigten dabei akustische Aktivitäten während des Frierens von Fichtenästen nicht jedoch während des Tauvorganges. In Studien an *Fraxinus*, *Malus*, *Pyrus*, *Pinus* und *Cornus* sowie an *Juglans* und *Euonimus* wurden ebenfalls Signale während des

Frierens beobachtet [17, 18]. Auch diese Studien deuten darauf hin, dass die Entstehung Gefrier-Tau induzierter Embolien durch die „bubble formation“ - Hypothese vielleicht nicht vollständig erklärt wird.

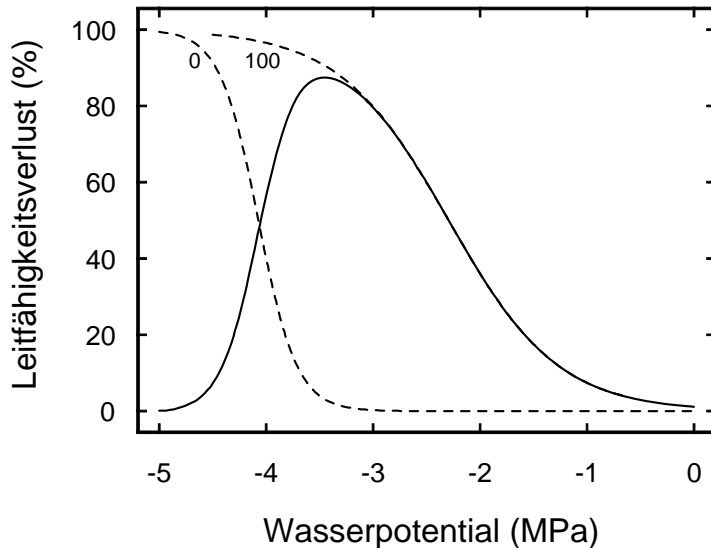


Abbildung 2
Leitfähigkeitsverluste bei unterschiedlich stark ausgetrockneten Fichtenproben. Ein Teil der Proben wurde zusätzlich 100 Gefrier-Tauzyklen ausgesetzt. Die volle Linie zeigt den Effekt der Temperaturbehandlung, der in Kombination mit Trockenstress (Kurve 0) zu hohen Leitfähigkeitsverlusten führt (Kurve 100). Modifiziert nach [16].

In der vorliegenden Studie wurde die Emboliebildung im Holz verschiedener Koniferen während Gefrier-Tau-Vorgängen mittels Ultraschalltechnik analysiert. Dazu wurden aufgesättigte-, unter Trockenstress stehende und vollständig ausgetrocknete Astproben in einem Temperaturschrank wiederholten Temperaturzyklen ausgesetzt und die Ultraschallemissionen registriert. Diese Messungen sollten eine Untersuchung der Auswirkungen wiederholter Gefrier-Tau-Zyklen und unterschiedlicher Minimumtemperaturen ermöglichen.

2. Material und Methoden

Ein Großteil der Experimente wurde an Fichte (*Picea abies* L. Karst) durchgeführt, weitere Untersuchungen erfolgten an Weißtanne (*Abies alba* Miller), Wacholder (*Juniperus communis* L.), Lärche (*Larix decidua* L.), Zirbe (*Pinus cembra* L.), Rotföhre (*Pinus sylvestris* L.) und Latsche (*Pinus mugo* Turra). Zweige dieser Arten wurden im Botanischen Garten der Universität bzw. in Waldbeständen in der Umgebung von Innsbruck geerntet und in Nylonsäcken verpackt ins Labor transportiert. Dort wurden alle Äste ca. 5 cm unter Wasser zurück geschnitten und zur Aufsättigung für mindestens 12 Stunden eingefrischt sowie mit Nylon abgedeckt. In der Folge wurden von jeder Art einige Äste auf ein Wasserpotential nahe der oberen Verwundbarkeitsschwelle für trockenheitsinduzierte Embolien ausgetrocknet (Tabelle 1). Das Wasserpotential wurde dazu immer wieder mit der Scholander-Methode bestimmt (Model 1000 Pressure Chamber, PMS Instrument Company, USA). Weiters wurden Äste für 24 Stunden im Trockenschrank bei 80°C ausgetrocknet.

Tabelle 1

Wasserpotentiale trockenheitsgestresster Äste bei der Messung gefrier- tau induzierter Embolien. Die zum Vergleich angegebene Verwundbarkeitsschwelle P_{10} (Potential bei Austrocknung bis zu einem Leitfähigkeitsverlust von 10%) von *Juniperus communis*, *Larix decidua*, *Picea abies*, *Pinus cembra* und *Pinus mugo*, stammen aus [19], jene von *Pinus sylvestris* aus [20] und jene von *Abies alba* aus [21].

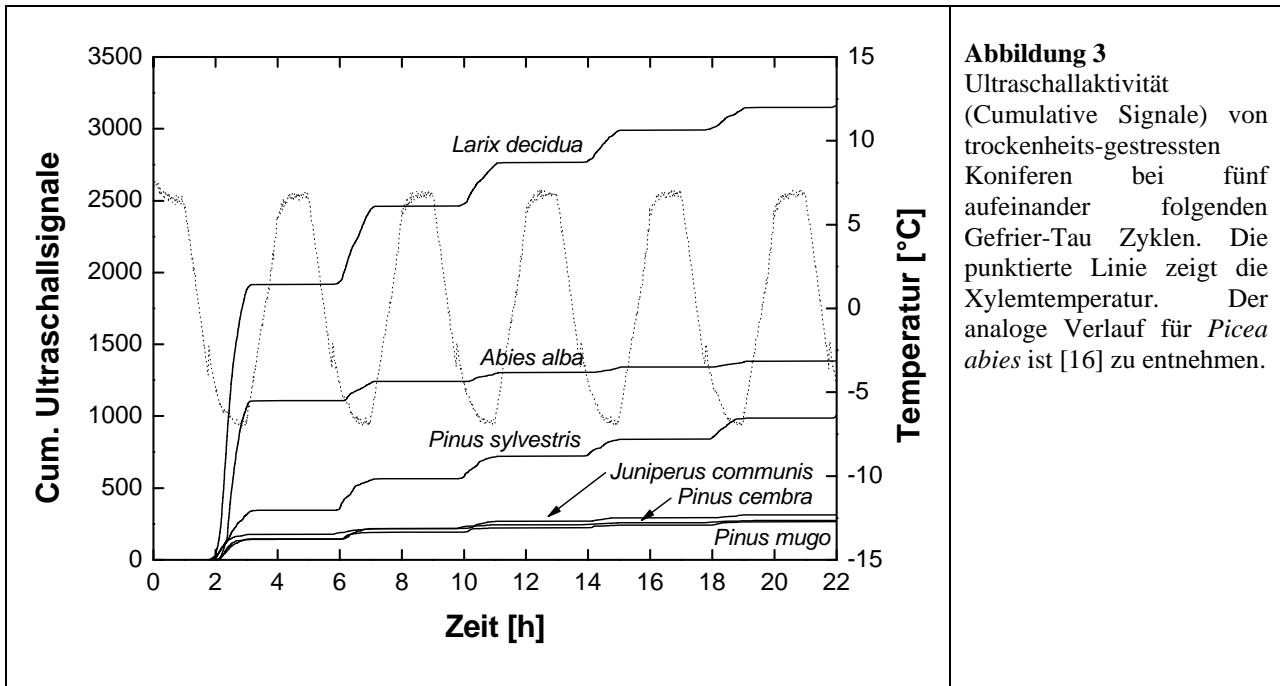
Art	Potentialbereich [MPa]	P_{10} [MPa]
<i>Abies alba</i>	-2,3 bis -2,5	$-2,78 \pm 0,29$
<i>Juniperus communis</i>	-3,6 bis -4,0	$-5,00 \pm 0,13$
<i>Larix decidua</i>	-1,8 bis -2,0	$-2,86 \pm 0,14$
<i>Picea abies</i>	-2,2 bis -2,5	$-2,98 \pm 0,13$
<i>Pinus cembra</i>	-2,1 bis -2,4	$-2,99 \pm 0,1$
<i>Pinus mugo</i>	-2,2 bis -2,5	$-3,31 \pm 0,03$
<i>Pinus sylvestris</i>	-1,8 bis -2,0	$\sim -2,4$

Für die Gefrier-Tau-Experimente wurde eine Kälte-Wärmetestkammer (MK 53 Binder, Deutschland) verwendet. Für das Standardexperiment wurden je fünf Temperaturzyklen zwischen $+6^{\circ}\text{C}$ und -8°C programmiert, wobei ein Zyklus 4 Stunden dauerte. Zusätzlich wurden Experimente mit einer absinkenden Minimumtemperatur von -8 , -16 und -32°C durchgeführt. Kammer- und Xylemtemperatur wurden mit Thermoelementen gemessen und mittels Datalogger (PC-200W, Campbell Scientific LTD, UK) aufgezeichnet.

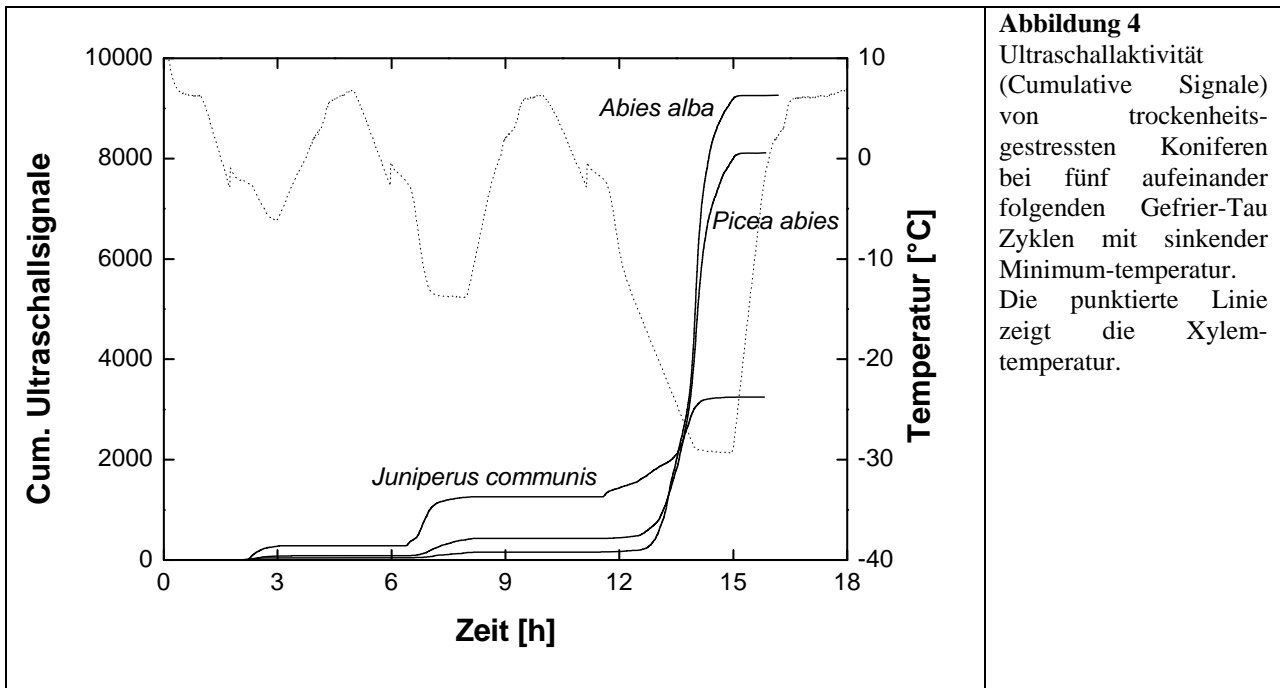
Die Ultraschallmessungen erfolgten mittels einem PCI-2 System (Physical Acoustics, Deutschland). Die Astproben wurden dazu mit Parafilm umwickelt (Austrocknungsschutz), anschließend wurde in einem etwa 1 cm^2 großen Bereich die Rinde und der aufliegende Parafilm entfernt und je ein 150 kHz Resonanzsensor (R15/C, 80-400 kHz) mittels Klemme befestigt. Als Kopplungsmittel wurde auf die entrindete Stelle Silikonfett aufgetragen. Die Vorverstärkung betrug 40 dB, der Schwellenwert für die Signalregistrierung 45 dB. Peak definition time, hit definition time und hit lockout time wurden auf 200 μsec , 800 μsec und 1000 μsec eingestellt.

3. Ergebnisse

Bei den unter Trockenstress stehenden Proben wurden bei allen Arten Ultraschallemissionen während der Gefrier-Tau-Experimente registriert (Abb. 1). Diese Emissionen starteten jeweils zum Zeitpunkt des Einfrierens – exakt mit dem Erscheinen der Gefrierexotherme im Temperaturverlauf des Xylemsaftes traten jeweils die ersten Ultraschallsignale auf. Im Gegensatz dazu wurden während des Tauvorganges keine Ultraschallsignale aufgezeichnet. Bei wiederholten Temperaturzyklen traten bei jedem Gefriervorgang erneut Ultraschallemissionen auf, die Zahl der Signale nahm jedoch von Zyklus zu Zyklus ab. Aufgesättigte Proben emittierten kaum und vollständig ausgetrocknete Proben keinerlei Ultraschallsignale (Daten nicht präsentiert). Die Unterschiede in der Zahl der Ultraschallsignale sind auf die unterschiedlich gute akustische Kopplung der Sensoren an die Astproben zurückzuführen.



Ein Absinken der Minimumtemperatur bei aufeinander folgenden Gefrier-Tau-Zyklen führte zu einer Zunahme der Ultrschallaktivität (Abb. 4). Bei einer minimalen Xylemtemperatur von -8°C im ersten Temperaturzyklus wurden weniger als 25% der Aktivität im zweiten Zyklus bei -16° registriert. Kontrollexperimente belegen, dass dieser Effekt ausschließlich auf die Minimumtemperatur und nicht auf geringfügige Unterschiede in der Gefriereschwindigkeit zurückzuführen ist (Daten nicht präsentiert). Alle getesteten Arten wiesen bei diesen Experimenten ähnliche Muster in der Ultrschallaktivität auf.



4. Diskussion

Untersuchungen an der alpinen Waldgrenze haben gezeigt, dass Gefrier-Tau-Zyklen in Kombination mit Trockenstress während des Winters von enormer Bedeutung für den Wasserhaushalt von Koniferen sind [15, 22, 23]. Da diese an der Waldgrenze während jeder Wintersaison mehr als 100 Frostzyklen ausgesetzt sind [24, 25], entstehen im Holz massive Embolien – in strengen Wintern beträgt der Leitfähigkeitsverlust bis zu 100 %! Damit könnten Gefrier-Tau induzierte Embolien ein wesentlicher Faktor für das Überleben von Bäumen in dieser Höhenlage darstellen. Da die Ursache für die Entstehung der alpinen Waldgrenze noch nicht bekannt ist, erscheint die Aufklärung der Vorgänge bei der Bildung dieser Embolien von Bedeutung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen – analog zu den Resultaten einer Vorstudie [16] mit *Picea abies* – dass die Kombination aus Trockenstress und Gefrier-Tau-Zyklen zu Ultraschallemissionen führt (Abb. 3). Da in einer hydraulischen Untersuchung die Induktion von Embolien aufgrund des Kombinationsstresses von Trockenheit und Gefrier-Tau-Ereignissen bei Koniferen nachgewiesen wurde [15], könnten die beobachteten Ultraschallemissionen mit der Bildung von Embolien in Zusammenhang stehen. Die Ergebnisse der bis jetzt vorliegenden Studien lassen dabei folgende Hypothesen bzw. Schlussfolgerungen zu:

1. Die Ultraschallsignale werden durch die Entstehung von Embolien verursacht. Für diese Hypothese spricht, dass sowohl bei hydraulischen Experimenten [15, siehe auch Freilandstudie 23] als auch bei den präsentierten Experimenten wiederholte Temperaturzyklen zu einer Zunahme des Emboliegrades bzw. der Ultraschallaktivität führten. Dies konnte außerdem mit Färbemethoden und Cryo-Elektronenmikroskopie belegt werden [16]. Daraus wäre allerdings zu schließen, dass die Emboliebildung während des Gefriervorganges und nicht – wie in der „bubble formation“-Hypothese dargestellt – während des Tauens geschieht. Zahlreiche Studien mit Angispermen, die aufgrund ihrer weiten Tracheen wesentlich anfälliger für Gefrier-Tau induzierte Embolien sind, belegen allerdings eindeutig die „bubble formation“-Hypothese [6, 7, 8, 9, siehe auch Einleitung], sodass ein direkter Zusammenhang zwischen Embolieentstehung und Ultraschallemissionen als eher unwahrscheinlich angesehen werden muss. Eventuell handelt es sich bei dem durch die Ultraschallaktivität angezeigten Prozess jedoch um einen andern Mechanismus der Emboliebildung, der nur bei Koniferen bzw. englumigem Holz auftritt. Möglicherweise muss dabei auch das extrem negative Wasserpotential von Eis berücksichtigt werden, das zu einer ähnlichen Embolieinduktion wie bei Trockenstress führen könnte [16, 26, 27]. Damit könnte auch die mit sinkender Minimumtemperatur zunehmende Ultraschallaktivität erklärt werden (Abb. 4). Das stärker negative Wasserpotential bei tieferen Eistemperaturen würde zu einer vermehrten Entstehung von Embolien führen.

2. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist anzunehmen, dass die Ultraschallaktivität nur die Entspannung der Wassersäule bei der Bildung der Blasen während des Einfrierens anzeigt. Dies würde erklären, warum bei aufgesättigten Proben keine Ultraschallsignale emittiert werden [siehe auch 16]. In diesem Fall ist das Wasserpotential nahe null und die Wassersäule entspannt, sodass keine Energie bei der Bildung der Blasen frei wird. Bei negativem Wasserpotential können hingegen Druckwellen bei der Entspannung der Wassersäulen durch die sich ausdehnenden Gasblasen entstehen. Dies würde in Einklang mit der „bubble-formation“-Hypothese stehen und auch die relative Abnahme der Signale bei aufeinander folgenden Gefrier-Tau-Zyklen erklären: Bei zunehmenden Emboliegrad würden immer weniger unter Zugspannung stehende Wassersäulen Energie freisetzen. Der beobachtete Effekt bei unterschiedlichen

Minimumtemperaturen (Abb. 4) müsste dann auf unterschiedliche akustische Eigenschaften des Eises zurückzuführen sein.

Bei der vorliegenden Studie erwies sich die akustische Methode als wertvoller methodischer Ansatz, da sich Effekte bei einzelnen Gefrier-Tau-Zyklen untersuchen ließen. Im Gegensatz dazu werden bei Koniferen mit anderen Methoden (z.B. hydraulische Techniken) eine Vielzahl von Temperaturzyklen benötigt um messbare Resultate zu erzielen [15]. Leider lassen sich die emittierten Ultraschallsignale jedoch noch nicht eindeutig einem bestimmten Vorgang im gefrierenden Holz zuordnen, sodass Schlussfolgerungen nur in Kombination mit anderen Messmethoden möglich sind. Wir planen weitere Experimente mit neuen methodischen Ansätzen um die Gefrier-Tau-induzierte Entstehung von Embolien in Koniferen besser zu verstehen.

Referenzen

- [1] Tyree MT, Zimmermann MH (2002) Xylem structure and the ascent of sap. Springer Verlag, Berlin.
- [2] Tyree MT, Davis SD, Cochard H (1994) Biophysical perspectives of xylem evolution: Is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction ? IAWA J 15: 335-360
- [3] Sperry JS, Tyree MT (1990) Water-stress-induced xylem embolism in three species of conifers. Plant Cell Environ 13: 427-436
- [4] Hacke UG, Sperry JS (2001) Functional and ecological xylem anatomy. Persp Plant Ecol Evol Syst 4: 97-115
- [5] Sucoff E (1969) Freezing of conifer xylem and the cohesion-tension theory. Physiol Plant 22: 424-431
- [6] Ewers FW (1985) Xylem structure and water conduction in conifer trees, dicot trees and lianas. Int Ass Wood Anat Bull 6: 309-317
- [7] Lo Gullo MA, Salleo S (1993) Different vulnerabilities of *Quercus ilex* L. to freeze- and summer drought-induced xylem embolism: an ecological interpretation. Plant Cell Environ 16: 511-519
- [8] Davis SD, Sperry JS, Hacke UG (1999) The relationship between xylem conduit diameter and cavitation caused by freezing. Am J Bot 86: 1367-1372
- [9] Lemoine D, Granier A, Cochard H (1999) Mechanism of freeze-induced embolism in *Fagus sylvatica* L.. Trees 13: 206-210
- [10] Sperry JS, Robson DJ (2001) Xylem cavitation and freezing in conifers. In Bigras FJ, Colombo SJ, eds, Conifer cold hardiness. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 121-136
- [11] Pittermann J, Sperry JS (2003) Tracheid diameter is the key trait determining the extent of freezing-induced embolism in conifers. Tree Physiol 23: 907-914
- [12] Pittermann J, Sperry JS (2006) Analysis of freeze-thaw embolism in conifers. The interaction between cavitation pressure and tracheid size. Plant Physiol 140: 374-382
- [13] Hammel HT (1967) Freezing of xylem sap without cavitation. Plant Physiol 42: 55-66
- [14] Sperry JS, Nichols KL, Sullivan JEM, Eastlack SE (1994) Xylem embolism in ring-porous, diffuse-porous, and coniferous trees of northern Utah and interior Alaska. Ecology 75: 1736-1752
- [15] Mayr S, Gruber A, Bauer H (2003) Repeated freeze-thaw cycles induce embolism in drought stressed conifers (Norway spruce, stone pine). Planta 217: 436-441
- [16] Mayr S, Cochard H, Ameglio T, Kikuta S (2007) Embolism formation during freezing in the wood of *Picea abies*. Plant Physiol 143: 60-67
- [17] Weiser RL, Wallner SJ (1988) Freezing woody plant stems produces acoustic emissions. J Amer Hort Sci 113: 636-639
- [18] Kikuta S, Richter H (2003) Ultrasound acoustic emissions from freezing xylem. Plant Cell Environ 26: 383-388
- [19] Mayr S, Hacke U, Schmid P, Schwienbacher F, Gruber A (2006) Frost drought in conifers at the alpine timberline: xylem dysfunction and adaptations. Ecology 87: 3175-3185
- [20] Cochard H (1992) Vulnerability of several conifers to air embolism. Tree Physiol 11: 73-83
- [21] Zimmermann J (2006) Austrocknungsversuche mit Koniferen. Resistenz gegenüber Embolien in den

Leitgefäßen heimischer Nadelbäume. Bakkalaureatsarbeit, Universität Innsbruck.

- [22]Tranquillini W (1976) Water relations and alpine timberline. In Lange OL, Kappen L, Schulze ED, eds, Ecological studies. Analysis and synthesis, Vol 19. Springer Verlag, Berlin, pp 473-491
- [23]Mayr S, Wolfschwenger M, Bauer H (2002) Winter-drought induced embolism in Norway spruce (*Picea abies*) at the Alpine timberline. *Physiol Plant* 115: 74-80
- [24]Groß M, Rainer I, Tranquillini W (1991) Über die Frostresistenz der Fichte mit besonderer Berücksichtigung der Zahl der Gefrierzyklen und der Geschwindigkeit der Temperaturänderung beim Frieren und Auftauen. *Forstwiss Centralbl* 110: 207-217
- [25]Mayr S, Wieser G, Bauer H (2006) Xylem temperatures during winter in conifers at the alpine timberline. *Agr For Met* 137: 81-88
- [26]Sparks JP, Campbell GS, Black RA (2001) Water content, hydraulic conductivity, and ice formation in winter stems of *Pinus contorta*: a TDR case study. *Oecologia* 127: 468-475
- [27] Améglio T, Cochard H, Ewers FW (2001) Stem diameter variations and cold hardiness in walnut trees. *J Exp Bot* 52: 2135-2142