HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	超低温における植物組織の生存
Author(s)	酒井, 昭
Citation	低温科學. 生物篇, 14, 17-23
Issue Date	1956-11-26
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/17582
Type	bulletin (article)
File Information	14_p17-23.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Akira SAKAI 1956 Survival of Plant Tissue at Super-Low Temperatures. *Low Temperature Science, Ser. B. 14.* (With English résumé p. 23)

超低温における植物組織の生存*

酒　井　　昭

(低温科学研究所　生物学部門)

(昭和31年7月受理)

I.

液体空気や液体窒素で極端な低温度に冷されても，ある種の生物は死なないことが知られている。このような場合，生物が死なないための一つの条件は生物が予め充分に脱水されている事と，そのような強度の脱水状態におかれても，生物が害を受けない事である。Becquerel[2] (1932) は commercial buffercup (*Ranunclus*) の球根が含水量9.6%になるまで乾かしてから，液体空気中に18日間入れておいた場合は生存していたが，最初の含水量が多い場合は死んで了つたことを報告している。同様な結果はいろいろの種子についても得られているが，更に彼はクマムシ，ワムシ，粘菌，コケ，藻類を充分乾燥してから，液体空気中に2週間おいたがそれらは生きていたことを報告[3),4)]している。

Lockelt and Luyet[6] (1951) は空気中でかわかした小麦の種子 (含水量：10%) を2分間液体窒素中にさらした後，播種した場合は92%の発芽率を示したが，最初に50%の水を含んでいるものは全部死んでしまうことを見ている。之等の例では予め生物を強く脱水して，凍り易い状態の水を出来るだけ取り去つている。また用いた生物はかように強く脱水されても死なない状態にあるものばかりである。

致命的障害を与えないで生物を超低温まで冷却する他の方法は硝子化[1]する (vitrify) ことである。氷の結晶核が出来る温度範囲と，結晶の成長速度の大きい温度範囲を結晶が生ずるのに要する時間よりも，短時間に通過させてしまう事が出来れば，生物も又硝子状態 (viterous state) になる可能性がある。硝子化された場合は氷が出来ていないから，細胞は致命的害を受けないと考えられる。Luyet and Gehenio[8] (1938) はミズゴケの葉で，Luyet[7] (1937) は10～63%の濃度の gelatin gels，新鮮な卵白，イボタの葉の切片を材料として，Goetz and Goetz[5] (1938) は酵母 (*Saccharomyces cerevisae*) で硝子化に成功している。含水量の大小は硝子化に非常に大きな条件となつているので，彼等はあらかじめいろいろの程度に脱水した場合について実験している。これらの事実からある一群の生物，組織，細胞にとつて，細胞内に凍結が起らなければ非常な低温度でも，低温度自身は致命的障害を及ぼすものでない事が判る。

* 北海道大学低温科学研究所業績　第349号

上に述べたように予め充分乾燥して凍り易い状態にある水が除かれておれば，硝子化の時のように極端に早く冷却する必要はないと考えられる。従来，脱水の方法としては乾燥のみが用いられていた。細胞が細胞外凍結の状態におかれると，温度の降下につれて細胞内の水は細胞から奪われて細胞内容は濃縮されてゆく。その程度が進むと，遂に細胞内は容易に凍りうる水は殆んどなくなるといつてよいであろう。かような状態にある細胞を液体窒素のような超低温に入れても細胞内には凍結は起こらず，したがつて細胞は死なないという可能性は充分考えられる。但しこの場合も細胞が強度の脱水に耐え得ることが必要である。この予想を確かめるために耐凍性の強い状態の木本類について行なつた二，三の実験の結果を述べる。

II.

材料はクワ (*Morus bombycis*, Koidz.) 品種タキノカワとイヌコリヤナギ (*Salix lntegra* Thunb), ポプラ (*Populus sieboldi* Mig.) の1年生枝条を用いた。材料は1月から2月上旬までの間に採集した枝を用いた。その季節に於いてはヤナギ，ポプラは −40°C の凍結に，クワは −25°C の凍結に少なくとも1日間は耐えうる。

実験1. 冷却速度が大きい時には，耐凍性の大きい細胞でも細胞内凍結を起こすから，それをしらべるために1cmの長さに切つたクワの枝の小片を糸でしばつて，いろいろの温度に冷やされたアルコール中に投入して種々の速度で冷した*。10°C の枝条を −10°，−20°，−30°C に冷やされた100 cc のアルコール中に入れて急冷，30分後に取り出して皮層柔細胞の生存率を調べた。第1表に示すように，枝小片とアルコールとの温度差が40°C の時には皮層柔細胞は細胞内凍結を起して殆んど死んでしまう。温度差が30°C 位の時は約半数が死んでいる。温度差が20°C 以内の時は殆んど全細胞が生存している。温度差が40°C 以上ある時は冬季の耐凍性の大きい皮層柔細胞でも，殆んど細胞内凍結を起こして死んでしまうので，10°C の室温から液体窒素中に小片を投入した場合には，温度差が約200°C あるから細胞は細胞内凍結を起して死んでしまうと思われる。

第1表 10°C より各温度のアルコール中に piece を入れて急冷した後の皮層柔細胞の生存率

材料：クワ (タキノカワ)

処理温度 (°C)	試料との温度差 (°C)	生存率 (%)
− 30	40	5～10
− 20	30	30～40
− 10	20	80～90

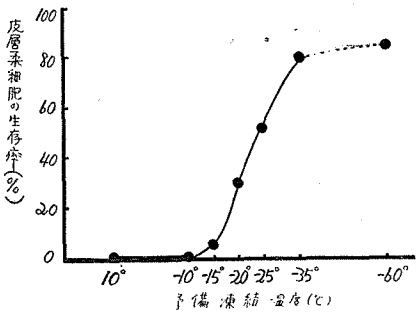
予め −10°，−15°，−20°，−30°，−35°C 及び −60°C** の恒温箱に1cmの長さの枝の小片を入れて，5～16時間細胞外凍結*** を起こさせて，細胞内の水をいろいろの程度に脱水しておいてから，小片を糸にしばり錘をつけて液体窒素中に入れる。10分後液体窒素から小片

* この際枝がアルコール中に沈むように同温度に冷された錘を枝につけた。

** −30°C の低温室中のデュワー瓶中にドライアイスを入れて −60°C の温度にした。

*** 用いた時期，条件では過冷却は，氷点下数度で破れて細胞外凍結が起る。

を取り出して，−30°C の低温室に1時間おいてから室温に取り出して，原形質分離法で皮層柔細胞の生存率を比較した。第1図に示すように室温から直接液体窒素中に入れた場合は勿論 −10°，−15°C の温度で細胞外凍結させてから液体窒素中に入れた場合も，殆んど全ての細胞が死んでしまう。然し −20°C で細胞外凍結を起こさせておいてから，液体窒素中に入れた場合には，20～30% の細胞が生きている。−25°C では40～60%，−20°～−35°C では 80% 以上の細胞が生存している。−30°C で凍らせ，次に −60°C に3時間入れてから，液体窒素中に浸した場合でも生存細胞の割合は，−30°～−35°C の場合よりややよい程度に過ぎない。以上の実験結果は15例の平均で各実験例とも大体同じ傾向を示していた。従つて −10°C や −20°C の温度で細胞外凍結を起こし，細胞内の水がある程度脱水されても，まだ細胞内に容易に凍りうる水が残つていることになる。之に対して −30°～−35°C の凍結では細胞外凍結による脱水の結果，残つた水は非常に凍りにくいものと思われる。



第1図　各温度で予備凍結後液体 N_2 で10分間処理後の生存率
材　　料：　クワ（タキノカワ）
実験期日：　1月～2月上旬

験実 2.　次に −30°C で16時間細胞外凍結の状態においた後，小片を液体窒素中に10分間入れてから，−30°C の温度に移す。1時間たつて小片の温度が −30°C になつた後，再び液体窒素に5分間入れる。このようなことを5回繰り返してみた。第2表に示すように，1回だけ液体窒素に入れた場合も，5回入れた場合も，殆んど同じ生存率を示している。この事は −30°C での細胞外凍結で細胞内の容易に凍りうる水は殆んどなくなつている事を示すものと思われる。

第2表　−30°C と −190°C の間で5回温度変化を繰返した後の皮層柔細胞の生存率
材料：　ク　ワ（タキノカワ）

	対　照 (%)	5回繰返した場合 (%)
No. 1	85	80
No. 2	75	70

実験 3.　次に液体窒素中にいろいろの時間浸しておいた場合，時間的要因がどのような影響を及ぼすかを調べてみた。第3表から明かなように，60日間液体窒素中に入れておいても，10分後と同様な生存率を示した。その際生存細胞の中性赤による染色の度合も，原形質分離型も正常であつた。又等調の3倍の平衡塩溶液中で原形質分離させてから，水道水で原形質復帰をさせ，更に高張液で原形質分離させる。かように分離と復帰を3回繰り返したが，その間に死ぬ細胞は殆んどなかつた。（写

第3表　各時間枝条小片を液体 N_2 中に入れておいた後の皮層柔細胞の生存率
材料：　ク　ワ（タキノカワ）

液体 N_2 中の時間	10分	60分	1 日	15日	60日
生 存 率 (%)	80～90	80～90	80～90	80～90	80～90

真1)。従つて少なくとも60日間液体窒素中に入れておいても，皮層柔細胞は生存していたとみなす事が出来る。

実験4. 次にクワの枝条の小片（長さ1.5 cm）を0°Cから裸のままで−94°C* まで冷した。0°Cから−60°Cまでの冷却速度は約1°C/1分で，−9°〜−94°Cの温度に1時間30分さらした。−94°Cから直接室温に取り出して皮層柔細胞の生存をしらべたが殆んど生きていた。(写真2)

実験5. クワの皮層柔細胞は非常に耐凍性が大きいが髄周辺組織，髄線，perycyleの組織は精々−25°〜−30°Cの温度に1日間おくと害されるので，クワの枝条全体としては，冬期耐凍性の最も大きい時でも，−30°C以下の低温度には数時間以上は耐えられない。然しポプラ，ヤナギは−30°〜40°Cの温度にも長期間耐え得るので，木本類の中でも耐凍性の大きい之等の枝条を前記の方法で予め細胞外凍結させてから，液体窒素中に入れた後でも発芽してくるかどうかを調べてみた。

枝条を7〜10 cmの長さに切つて−10°，−20°，−30°Cの各温度で16時間細胞外凍結を起こさせてから，糸でしばり錘をつけて液体窒素中に1時間入れておく。−30°Cの部室に取り出して1時間おいてから，室温に出して水挿した。温室中で1箇月間水挿してから枝条の害の度合を調べた。10°Cから直接または−10°Cで予め凍結させてから，液体窒素に入れた場合は皮層組織も完全に死んでいた。−20°，−30°Cから液体窒素に入れた場合には皆発芽し，ヤナギは発根もしていた。然しながらポプラもヤナギも髄，髄周辺組織，材部は少し褐変していた。その度合は−20°Cでも−30°Cでも同じであつた。次に同じ長さのポプラ，ヤナギの枝条を綿で包み，更にヴィニール布につつんで−30°Cに16時間予備凍結させてから，液体窒素中に1時間入れて取り出し，1箇月間水挿後調べたが，殆んど正常に近く発芽発根していたし，髄，髄周辺組織が僅かに褐変していただけで材，靱皮部は正常であつた。同様な条件で液体窒素中に20日間入れておいたが，やはりいずれも発芽，発根した。前と同様髄部のみが褐変していた。(写真5)

又ポプラ，ヤナギの枝条（長さ7 cm）を0°Cより−94°Cまで（0°〜60°Cの間の冷却速度が約1°C/1分）冷した。その際一方は裸のまま，他方はヴィニール布で枝条を包んでおいた。裸の方は発芽しなかつたし，枝条は完全に死んでいたが，ヴィニール布に包んだ方は発芽したが，髄，材部，perycycleはかなり褐変していた。此の方法では−60°Cまでの冷却がかなり早いため害が多いものと思われる。(写真6)

実験6 クワの皮層組織から切りとつた，2×1 mmの1細胞層のうすい小さい切片が硝子化しうるかどうかしらべてみた。5°Cの部室で魔法瓶に液体窒素を入れ，絹糸の先端にほそい針金を結びつけ，その針金の尖端をとがらし，そこにワセリンを少量つけて切片の端を固着

* 東洋製作所製 −100°Cまで冷却出来る chilling unit を用いた。

した。その切片を液体窒素を入れた魔法瓶中に急激に入れた。5分後液体窒素中から5℃の空気中に取り出し融解したところ，切片の全細胞が死んでいた。この原因は融解温度が低かつた，つまり融解速度が小さすぎたため，あたためる途中で細胞内凍結が起つたことにあると思われる。そこで液体窒素から出した瞬間に30℃の水に切片を入れて急にあたためてみた。このように急激に融解したばあいは液体窒素中に5～60分入れておいても，切片中の全細胞の約80%が原形質分離をした。之等の細胞は硝子化していたとみてよいであろう。(写真3, 4)

III.

生物が超低温に耐えうるためには，超低温にさらす前に，細胞内の凍り易い状態にある水を出来るだけ取り除いておくことが必要であるが，従来のように予め乾燥する方法では，使用する材料に大きい制約があつて，木本類等の枝条については之を行なうことが出来なかつた。予め細胞外凍結によつて細胞内の水をある程度除去しておいてから，液体窒素に入れるという方法は大きな材料にも広く利用できる。但しこの方法も耐凍性の大きいものに限られることは言うまでもない。

クワの皮層組織は−30°～−35℃附近の温度で細胞外凍結によつて細胞内の凍り易い水は殆んどなくなるものとみなされる。この温度は植物の種類によつて，また同一種の植物でもその組織部位によつて異なると想像される。細胞外凍結によつて細胞内の凍りやすい水が殆んど奪われてしまうある温度範囲があるらしい。この温度範囲以下では細胞内凍結はもはや起こらず，従つて温度の絶対値の大きさはあまり問題でないようである。即ち−30℃から直接−190℃に急冷しても，又−190℃に少なくとも60日間入れておいても，クワの皮層柔細胞は何の害も受けない。ポプラ，ヤナギでも−30℃で16時間凍結させた後，直接−190℃に入れ15日間放置されたものも正常に発芽している。クワの皮層柔細胞の硝子化の結果をも合せ考えると低温度自身は生物に対して一次的な影響を与えないと言つてよいであろう。然しながら細胞外凍結によつて，強く脱水されると，多くの植物や組織は致命的傷害を受ける。例えばクワでは髄周辺組織，髄線等の組織は−25°～−30℃の温度で致命的害を受けるので，枝条全体としては−25℃(1日間の凍結の場合)が限界温度である。然し皮層柔細胞はこのような強度の脱水に耐えられる。細胞外凍結の方法で超低温に耐えうるためには，その植物及び組織の耐凍性の大きさが−30℃での凍結に少なくとも数日間以上耐えられることが必要のようである。これについては更に調べる予定である。

枝条の小片を冷却して行くとき，組織によつて又同一組織でもその部位によつて，細胞外凍結の結果，脱水される速さと量がことなるものと思われるが，その点については今のところ何も判つていない。然し冷却速度が小さい程割合均等に脱水されると思われる。耐凍性の強い冬期間の木本類の細胞でも，冷却速度があまりに大きいと細胞内凍結が起る。然し強度の脱水に耐えうる組織では，細胞内凍結が起らないように，ゆつくりと冷やして行くならば，室温か

ら絶対0°Cの近くの温度までも細胞外凍結の状態で害なく冷やしてゆくことも可能であろう。

Scholander[9] 等 (1953) はアラスカの Umiat, Fairbanks で採集したヤナギ，ハンノキ，マツ，カバ，ポプラの凍結した枝を綿栓をほどこした試験管の中に入れて，液体酸素 (約—183°) の中に18時間さらしてから取り出して挿木したところ，どの種類も発芽の少しの徴候も示さなかつた。然し対称は1週間後に正常に発芽したことを報告しているが，彼等の用いた種類は北極圏内の材料であり，殊にそれらの芽は非常に耐凍性が大きく，強度の脱水に充分耐えうると思われるので，著者のヤナギ，ポプラの結果からみて，凍結による脱水が充分であつたならば液体酸素にさらされても発芽したであろうと思われる。

摘　要

1. クワの皮層組織を細胞外凍結によつて予め細胞内の凍りやすい水を充分除いてから，直接液体窒素でいろいろの時間 (最大60日間) 冷したが殆んど全ての細胞は生きていた。又同様の方法でヤナギ，ポプラの枝を液体窒素中に15日間入れた後に水挿したが正常に発芽した。ただ髄周辺組織，髄線が少し害されていた程度である。

2. 植物組織を細胞外凍結の状態で温度を下げて行くと細胞は脱水され，ある程度脱水された後は細胞内は凍結しなくなる。細胞外凍結によりこの程度に脱水される温度範囲は植物の種類によつて，又同一種の植物でも組織によつて，また冷却する条件によつても異なる。冬期間のクワの皮層組織ではこの温度は —30°～—35°C である。

文　献

1) 青木　廉 1949 細胞と超低温. 低温科学, ***2***, 261.
2) Becquerel, P. 1932 L'anhydrobiose des tubercules des renoncules dans l'anzote liquide. Comptes Rendus Séances Acad. Sci., Paris, ***194***, 1947.
3) Becquerel, P. 1951 La suspension de la vie des algues, lichens, Mousses aux confins du zéro absolut et rôle de la synérèse réversible pour leur survive au dégel exliquaut l'existence de la fiore polaire et des hautes altitudes. Comptes Rendus Séances Acad. Sci., Paris, ***232***, 22.
4) Becquerel, P. 1950 La suspension de la vie au-dessous de 1/20°K absolute par démagnétisation adiabatique de l'alun de fer dans le vide le plus élevé. Comptes Rendus Séances Acad. Sci., Paris, ***231***, 261.
5) Goetz, A and S. S. Goetz 1938 Vitrification and crystallization of protophyta at low temperatures. Proc Amer. Philos. Soc., ***79***, 361.
6) Lockett, M. C. and B. J. Luyet 1951 Survival of frozen seeds of various water contents. Biodynamica, ***7***, 67.
7) Luyet, B. J. 1937 The vitrification of organic colloids and of protoprasm. Biodynamica. No. ***29***, 1.
8) Luyet, B. J. and P. M. Gehenio 1938 The survival of moss vitrified in liquid air and its relation to water content. Biodynamica, No. ***42***, 1.
9) Scholander, P. F., W. Flagg, R. J. Hock and Irving 1953 Studies on the physiology of frozen plants and animals in arctic. J. Cell. Comp. Physiol., ***42***, Suppl. 1, 1.

Résumé

Using willow, poplar and mulberry trees in winter. the resistance to the super-low temperatures of frost hardy trees which have been previously dehydrated by extracellular freezing at different temperatures (—10°～—30°C) was studied. For the purpose of dehydrating in various degrees, pieces from the same twig of mulberry tree were frozen for 16 hours at —10°, —20°, —25°C and ca. —30°C respectively and then quickly immersed in liquid N_2 for 10 minutes. After these treatments the percentage of the undamaged parenchyma cells of the cortex of the twigs was determined by the usual plasmolysis test. The percentage values obtained are as follows: O in the case of the prefreezing at —10°C, about 20 at —20°C and 80–90 at —30°～—35°C (Fig. 1). Further very long immersion in liquid N_2 (60 days) showed no harmful effect on the plasmolysing capacity of the parenchyma cells which had been sufficiently prefrozen at —30°C (Photo. 1) and these cells which had been in very frost-hardy state were not injured even when they were cooled down to —94°C under low cooling rate without prefreezing (Photo. 2). But the twig piece as a whole becomes gradually damaged, because the bud, xylem- and perycletissues are less resistant to freezing at —30°C for 24 hours than the parenchyma cells.

The twig of willow and poplar which are usually completely resistant to freezing at —40°C for 48 hours, could not withstand the immersion in liquid N_2 for 1 hour without prefreezing, but after the prefreezing at temperature below —20°C, the twigs so frozen put forth normally buds after immersion in liquid N_2 for 20 days (Photo. 5).

From these facts it seems that there is a definite temperature zone in which almost all of easily freezable water in the cell may be drawn from the cell interior by gentle extracellular freezing, and that the cells in this state are not injured even when exposed to deep temperatures. In the case of the parencyma cells in the cortex of mulberry tree, this zone lies around —30°C.

The thin sections from the cortical tissue of mulberry tree were rapidly cooled down in the liquid N_2 and then warmed in cold (5°C) and warm water (30°C) respectively. All the cells in the section warmed slowly are completely damaged, whils 80 per cent of the parenchyma cells showed the normal plasmolysis when warmed rapidly (Photo. 3, 4). This fact suggests that the plant tissues which are frost-hardy may be easily vitrified.

写真 1. −30℃で予備凍結後液体 N_2 中に 60 日間入れておいてから取出し，室温で融解後，3 Mol. 平衡塩溶液で皮層柔細胞を原形質分離させたもの。
材料： ク　ワ（タキノカワ）　350×

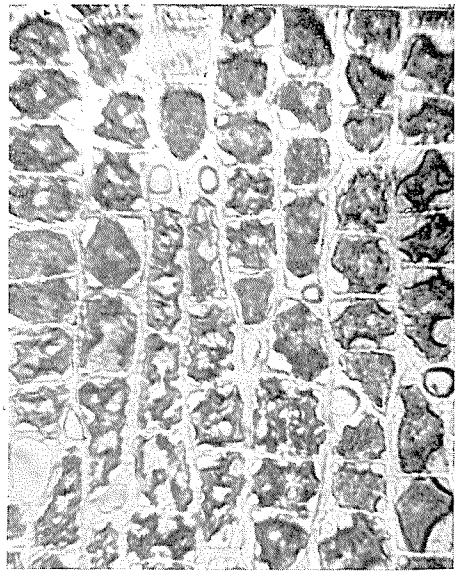


写真 2. 0℃より −60℃までの冷却途度約 1℃/分で −94℃まで冷却し，−94℃に 1 時間 30 分おいてから取出して，室温で融解し皮層柔細胞を 2 Mol. 平衡塩溶液で原形質分離させたもの。
材料： ク　ワ（タキノカワ）　400×

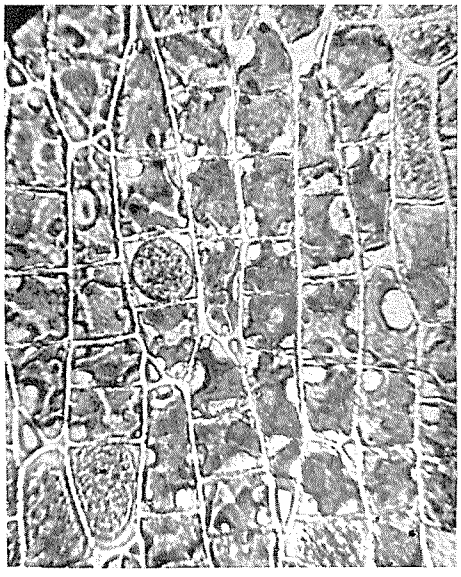


写真 3. 皮層組織の縦断切片を 5℃から液体 N_2 中に急激に入れて 10 分後取出して 30℃の水にて急にあたためた後，2 Mol. 平衡塩溶液で原形質分離させたもの。
材料： ク　ワ（タキノカワ）　400×

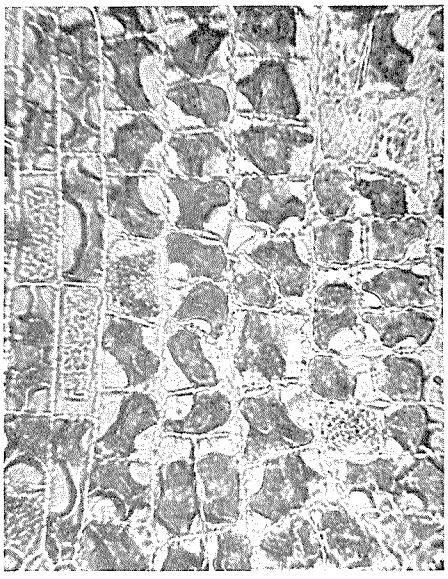


写真 4. 同 60 分間入れたもの。
400×

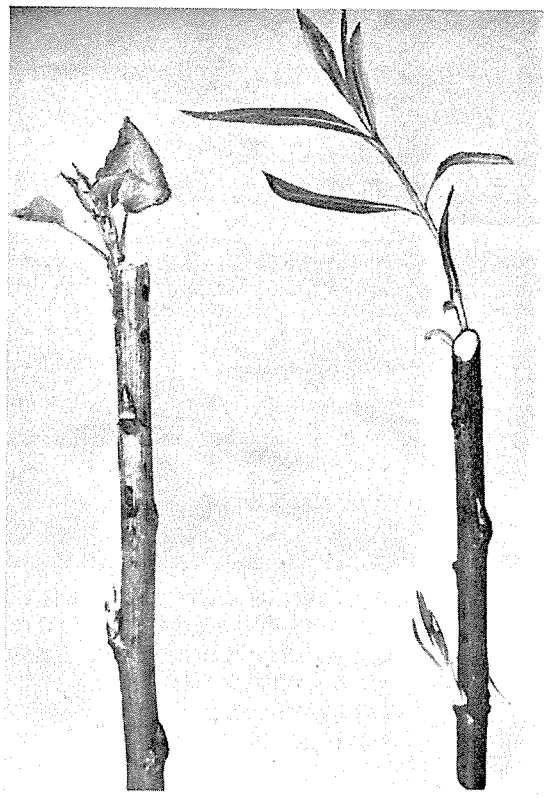


写真 5. (左)

−30℃で16時間凍結後，液体 N_2 中に20日間入れておいてから取出して温室で20日間水挿後の状態。

右： イヌコウリヤナギ

左： ポ プ ラ

両者共髄囲辺部，髄が多少害されているほかは正常である。

(原寸大)

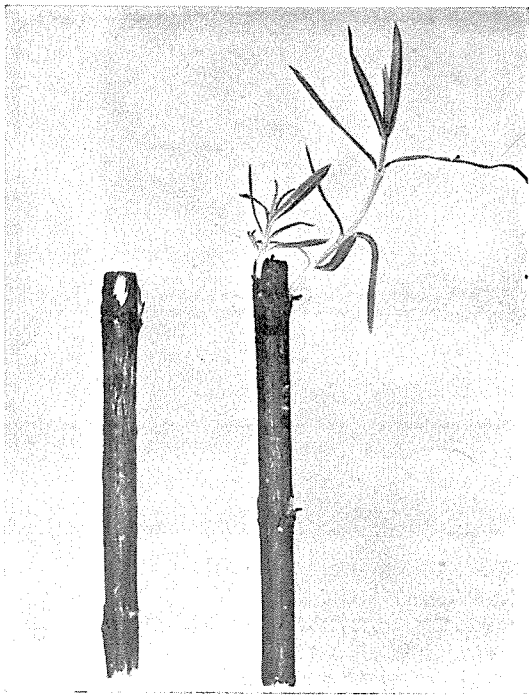


写真 6. (左)

0℃より −94℃まで冷却した場合の結果を示す。

右側: ビニール布に包んで冷却した場合 (冷却速度小)。

左側: ビニール布に包まない裸のままで冷却の場合。

冷却速度は0℃より −60℃まで約1℃/分。 (原寸大)