



Title	生物の凍結過程の分析 IX. : 植物の耐凍性と凍結曲線の型
Author(s)	青木, 廉; AOKI, Kiyoshi; 朝比奈, 英三 他
Citation	低温科学, 10, 69-79
Issue Date	1953-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17544
Type	departmental bulletin paper
File Information	10_p69-79.pdf



生物の凍結過程の分析 IX.

植物の耐凍性と凍結曲線の型*

青木 廉 朝比奈英三 照本 勳

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和27年9月受理)

I

植物からきりとつた組織小片の凍結曲線に氷點が二重になつて現われる場合、一過性の第1氷點は組織小片の破壊されている表層部の凍結に由来するものであり、持続性の第2氷點は小片内部の正常細胞群の凍結の現われである¹⁾。したがつて表層部の凍結に引續いて内部正常部に氷が生ずるか否か、いかえると正常部での氷の生成速度によつて氷點の分離の程度が決まることになる。ところが氷の生成速度は等しい冷却条件下では細胞の凍結様式に左右されるもので、いつばんに細胞外凍結はわりあい高い温度で始まり氷の生成速度が遅いのに対し、細胞内凍結は細胞外凍結に比べて低い温度になつてから、すなわち過冷却の程度がすすんでから起るものであつて、氷の生成速度は速い。それであるから組織が細胞外凍結を主とするばあいには氷點の分離は不明瞭となり、これに比べて細胞内凍結が主となつているときには明瞭になるはずである。

いつばんに耐凍性の植物では unhardy の時期には細胞内凍結を起しやすいものであるが、寒さにさらされ、しだいに hardy な状態になるにつれて細胞外凍結をするようになり、細胞内部は凍りにくくなる²⁾。このように hardy になつているかないかで凍結の様式はまったく變つてくる。この變化は當然凍結曲線の型の上にも現われてくるはずであり、まえに述べた考え方からみれば、unhardy のものでは氷點の分離はかなり明瞭であるが、hardy になるにつれて不明瞭になることが豫想される。この豫想すなわち上に述べた考え方の正非を確かめるために、耐凍性の比較的強いアカビートを材料として實驗を行つたのである。

II

材料にはアカビートの葉柄及び根を用いた。アカビートは11月10日まで鉢植として同場においたもので、一部の株を約0°Cに、また一部の株を約+25°Cの恒温箱にそれぞれ1週間及

* 北海道大学低温科学研究所淡漬 第161號。
この研究の費用の一部は文部省助成補助金によるものである。

び2週間放置して、いわゆる hardening 及び dehardening 処理を行つた。これらの処理をした材の葉柄下部の柔組織及び根の髓部の柔組織から切りとられた直径5 mm、長さ15 mmの圓柱狀組織片について凍結曲線をとつた。根のばあいはこの小圓柱の一端を薄い切片(0.5 mm)とし、葉柄では圓柱をとつたその葉柄から軸方向にやはり薄い切片(0.5 mm)をきりとつて顕微鏡下の凍結過程の觀察に用いた。使用した個体数は各處理とも3株ずつである。11月になれば札幌附近ではかなり氣温も低下しているので實驗に用いたアカビートはある程度すでに hardy な状態になつていたものである。

まず低温及び高温處理の前後における細胞の形態的變化を述べておこう。

a. 葉柄下部の柔細胞：處理前の柔細胞は直径150 μ 、長さ150~450 μ 位の圓筒狀で、細胞液はあざやかな紅色を呈している。また明瞭な大きな仁を有する核(直径約30 μ に達するものもある)の周囲には貯藏物質の黄色の顆粒(径5 μ 内外)が集まつていて、また明瞭な多數の kinoplasmic strands も認められる。原形質分離の限界濃度は蔗糖の0.7~0.8 M 程度であつた。

細胞のこのような状態は高温での dehardening によつて明瞭な變化を受け、恰度初秋まだ氣候が暖い時季の圃場にあるアカビートでみられる状態に甚だ近よつてくる。即ち前に述べた構造は次第に不明瞭となり2週間高温にさらされたものでは黄色の顆粒はほとんど消失し、核の輪廓は明瞭となつて kinoplasmic strands もほとんど認められなくなつてしまう(圖版第1圖A)。原形質分離の限界濃度もこれらの變化に伴つて0.4~0.5 M に低下してくる。

一方低温で2週間 hardening 處理されたものでは處理前とほとんど變らず、顆粒及び kinoplasmic strands がさらに明瞭になつた程度で(圖版第1圖B)、原形質分離の限界濃度も0.9~1.0 M と僅かに高くなつたに過ぎない。このことからアカビートは圃場ですでにかなりの程度に自然に hardening を受けていたことは明かである。

b. 根の髓部の柔細胞：處理前のものでは150×120 μ 位の大きさの不規則な立方形をした細胞で核は小さく、細胞液は濃紅色である。核の周邊に顆粒はみられず kinoplasmic strands も認められない。この構造は dehardening 及び hardening によつてほとんど影響を受けないとみえていずれの場合にも處理前後においてはつきりした差は認められなかつた。

以上述べたように hardening を受けたものと dehardening を受けたものとは、細胞内の構造に葉柄では著しい變化が起るけれど、根においてはほとんど變化が認められない。

III

耐寒性の状態にあるときと、ないときで細胞の凍結様式がどのように變化しているかをまず調べた。厚さ0.5 mmの切片を流動パラフィンの懸滴に封じこみ4°C/分(0°Cにおける速度)の速度で冷し、-4°C* になつたとき植氷して過冷却を破り凍結を開始させ、細胞の凍結過程を觀察した。** 多くの場合6分間凍結を続け(そのときの温度は-6°C内外になる)、その後温度

* 切片の一端に熱電對を接觸させて測つた温度。

** 方法の悉しいことは朝比奈の論文参照⁴⁾。

を上げて2分間位で融解を終る。融かした後の細胞の生死の判定は、細胞の構造の變化からも判るが、さらに蔗糖液で* 原形質分離及び復歸の有無で確かめた。

a. hardening された細胞の凍結過程. 葉柄でも根でも6分間の凍結**の間ではほとんど細胞外凍結を起こすだけである。初め細胞膜の外側に生じた氷は細胞内部より水を奪つて氷自身はしだいに發達し大きくなる(圖版第2圖)。その結果細胞はしだいに收縮し扁平になる。ある温度において外面における氷晶の發達が停止した後はたとえ細胞内部に植氷しても細胞内部は凍り始めない。このほか表皮細胞によくみられることであるが、細胞膜の内側、すなわち細胞膜と原形質膜との間に氷が生じ、氷による原形質分離がおこることがある。これらの凍つた細胞は融解されると、凍結中細胞外に奪われた水を再び吸収して元にかえる。1週間 hardening されたものでは融解後60~80%の細胞は生きのこつていたし、2週間 hardening されたものではほとんどすべての細胞が生きていた。

b. dehardening された細胞の凍結過程.

葉柄の柔細胞: 細胞内凍結が非常に起りやすくなつてゐる。このばあいの細胞内凍結は非フラッシュ型⁵⁾で、細胞内の一隅に生じた小さな氷は細い指狀となつて成長し間もなく細胞全体を埋めてしまう。この實驗の冷却條件の下では1箇の細胞が凍結してしまうのに1~2秒位かかる。ある細胞が凍結してから隣の細胞が凍るまでには數秒の間隔をおくのがふつうである。細胞内に生じた氷晶はたがいに融合し合つて大きな塊となる結果、濃縮された細胞液や凝固した細胞質は脈狀または液胞狀の小塊となつて氷の間にはさまれる(圖版第3圖)。このように細胞内凍結を起こした細胞が融解されると液胞の紅色は失われ細胞質は凝固した塊となつて細胞は完全に死んでしまつてゐる。1週間 dehardening を受けた葉柄の柔細胞では3分間の凍結後(最終温度 -5°C)とかすと大部分のものは死んでゐた。2週間のものにおいては1週間のばあいよりもつと高い温度で凍り始め、すなわち凍りやすく、5分間の凍結後融解すると生き残つてゐる細胞は10%以下にすぎなかつた。

根の柔細胞: やはり細胞内凍結の起りやすいことは葉柄の柔細胞と同様であるが、葉柄に比べると多少起りにくいように思われる。5分間の凍結後の生存細胞は1週間處理のもので50%以下、2週間のばあいは10~30%となつていて葉柄のものよりは多い。

以上の結果からみて hardening 處理を受けた状態すなわち耐凍性になつてゐるばあいと、dehardening を受けた状態すなわち耐凍性がなくなつてゐるばあいとは同一種類の植物の細胞でありながらその凍結様式は全く異なつてゐることは明かである。耐凍性の失われているときには細胞内部が凍りやすいが、耐凍性の状態では細胞外凍結を起こし、細胞は氷に接しながら脱水されるだけで細胞内部に氷は侵入しない。つまり細胞内部は凍りにくくなつてゐる。

耐凍性になると何故細胞内が凍りにくくなるのであろうか?。耐凍性になつてゐる状態では

* harby の細胞に対しては1.5 M の濃度、dehardening されている細胞については1 M の濃度を用いた。

** 最終温度は -6°C 。

細胞液の氷點が下つていることはいろいろの植物についてすでに知られている。アカビートもこの例にもれず、その値は第1表に示してあるとおり、hardening 處理されたものでは低くなつ

第 1 表

部 分	處 理	搾 汁 の 氷 點	原形質分離の限界濃度 (蔗糖)
葉 柄	hardening 14 日	-1.40°C	0.9~1.0 M
	dehardening 8 日	-0.72°C	0.4~0.5 M
根	hardening 14 日	-1.43°C	—
	dehardening 3 日	-1.36°C	—

ている。このように耐凍性になつている細胞に細胞外凍結が起こり、脱水されると細胞内の滲透濃度はますます高くなり、その結果氷點がさらに下つてくるので細胞内部は凍りにくくなるということは一應考えられる。しかしこのように單に氷點の関係だけでは説明できないばあいがたくさんある。アカビートの根の柔細胞は dehardening 處理を受けても hardening 處理されても、その搾汁の氷點はほとんど等しいにもかかわらず、dehardening のものは明かに細胞内が凍りやすい。Scarth 及び協力者^{7,8)}たちの一連の研究によつて植物が耐凍性を得るにつれ細胞原形質の性質にはいろいろの點で變化が起こることが明かになつた。なかでも水に對する透過性の増大を特に重視している。たしかに細胞の表層部を水がよく通れば細胞内からの水の供給は容易になり、それだけ細胞外の氷の成長は容易に行われることになる。しかしこの場合いつも細胞内の温度の低下に、脱水による細胞液の氷點の低下が遅れずについていく場合は問題はないが、必ずしもいつもそううまくいくとは限らない。事實細胞外凍結がおこつてから間もなく細胞内部に植氷してやれば、必ず細胞内凍結がみられる。そうなると水の透過性の増大以外に細胞の表層部に氷の侵入を防ぐ機構が存在していると考えざるを得ない。何となれば細胞内部は過冷却状態になつていて、その外面に氷が接着しているのであるから氷による植氷の可能性は十分あるからである。

もし細胞表層部にこの性質がなければ上の例で細胞の表面に氷が生ずるとすぐに過冷却されている細胞内部は凍り始めるであろう。細胞表層部のこの性質は耐凍性ということにとつて非常に重要なことである。表層部の氷の侵入を防ぐ機構は不明であるが、原形質膜、あるいは表層部の状態によつて決まるものであろう。これは残された大きな問題である。

耐凍性の大きな細胞は細胞外凍結をしただけでは一般に死なないといつても、そこにも自ずと限度のあることはいうまでもない。^{*} 凍結時間の長短及び凍結の程度によつて細胞の生死は

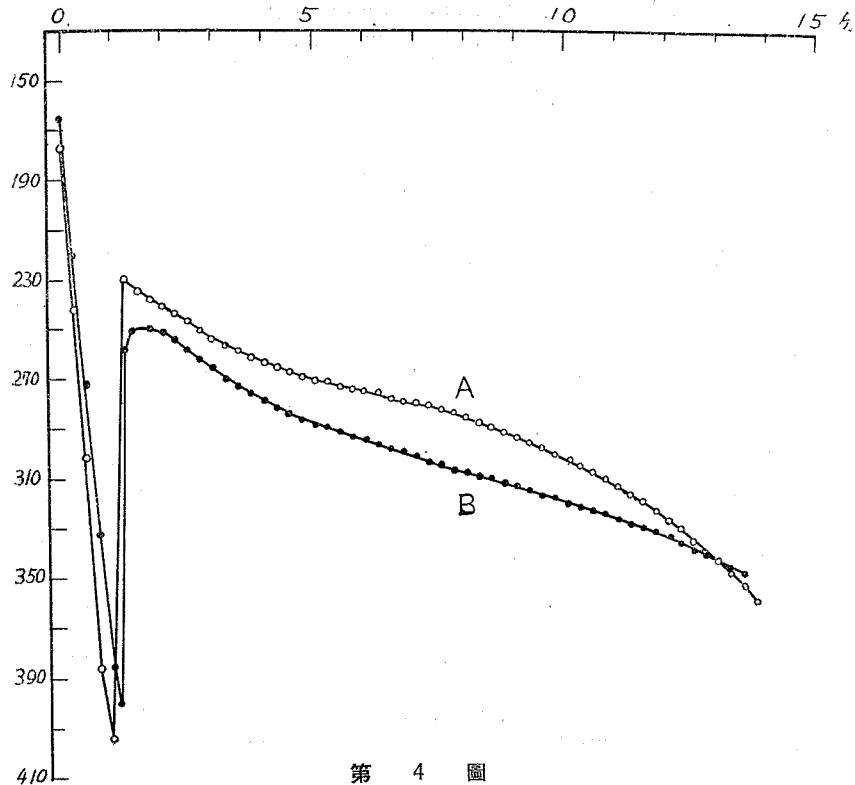
* たとえばアカビートの harden された葉柄は -10°C で少くとも 1 日の凍結に耐える。

著しく左右される。この現象は一面脱水の程度及び脱水の持続時間に關連する問題である。

IV

前節で述べたように hardy な状態と unhardy な状態とでは細胞の凍結様式は全く異なつて
 いるので、當然その差は凍結曲線の上にも現われてくるはずである。凍結過程をしらべた同一
 個体から切りとつた直徑 5 mm、長さ 15 mm の圓柱狀の組織小片の中心部に熱電對 (0.2mm の
 銅—コンスタンタン線) を挿し保護管に入れ食鹽—氷の寒劑 (-10°C) で冷し溫度變化を 15 秒
 おきに讀みとつた* 冷却速度は 0°C において約 4.5°C/分で、切片の凍結過程を觀察した場合
 とだいたい等しい。同一個体から 4, 5 箇の小片をとつて實驗した。

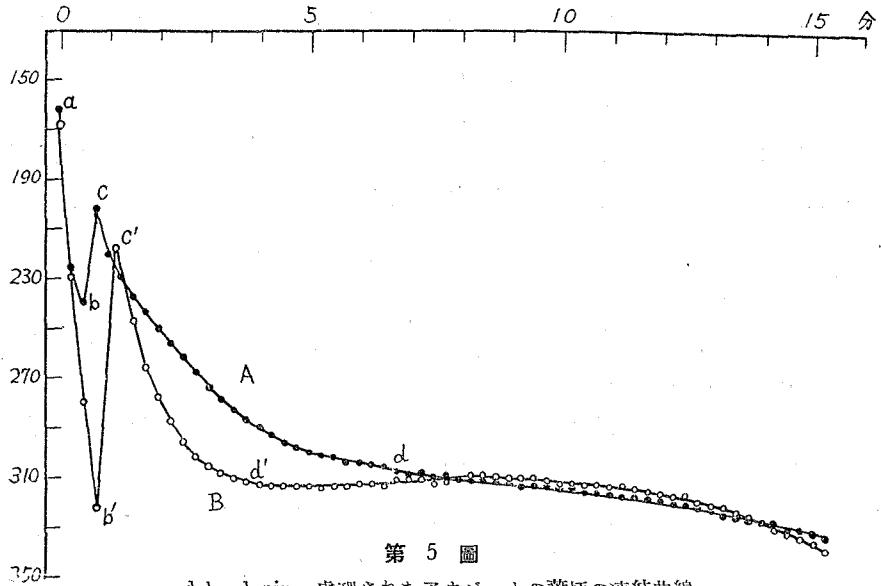
2 週間 hardening 處理されたものの葉柄の凍結曲線は第 4 圖のとおり第 1 氷點以後の溫度の
 下り方には著しい遅速は認められないので第 2 氷點ははつきり區別できない程度である。これ
 に反して dehardening 處理されたものでは (第 5 圖) 1 週間のものでも第 1 氷點が現われた後 4 分



第 4 圖
 2 週間 hardening 處理されたアカビートの凍結曲線
 A … 葉柄; B … 根

縦軸 … 檢流計の讀み (150 が 0°C にあたり、數が大きくなる程溫度は低くなる); 横軸 … 時間

* 方法は青木¹⁾の論文參照

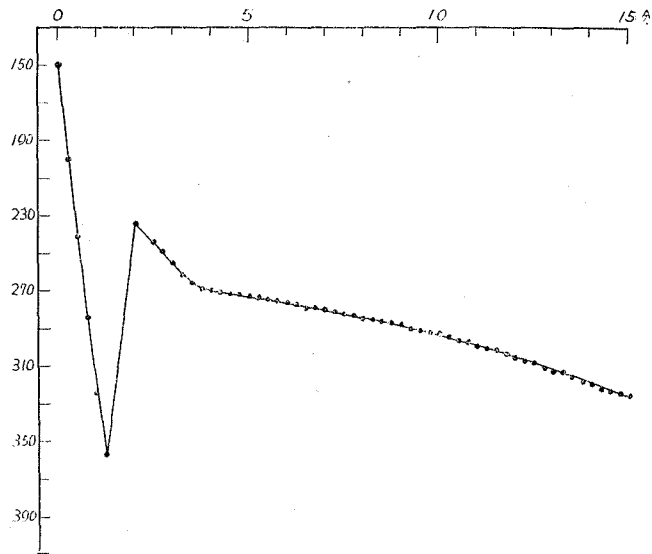


第 5 圖

dehardening 處理されたアカビートの葉柄の凍結曲線

A…1週間處理；B…2週間處理

縦軸…檢流計の讀み (150 が 0°C)；横軸…時間



第 6 圖

2週間 dehardening 處理されたアカビートの根の凍結曲線

縦軸…檢流計の讀み (150 が 0°C)；横軸…時間

間位は温度の下り方は急になつて、その後は緩やかにだいたい等速に下つていく。2週間處理されたばあいにはこの温度の下り方はより急激で、2分間位で温度の降下はほとんど停止し、その後8分間位はその温度を保ちつづける。個体によつては温度の降下が停止した後、わずかではあるが温度はかえつて上昇する結果、この部分の曲線が凸型を呈するばあいもある。いす

れにせよ第2氷點部は明瞭に現われている。このように葉柄の組織においては hardening 及び dehardening 処理によつて凍結曲線ははつきりと變つてくるので、曲線の型の上からだけでも氷の生成のし方が各々異なつてゐることは容易にわかる。

根の組織でも2週間 hardening 処理のものでは葉柄のばあいとほとんど變りない(第4圖)。dehardening 処理されたものでは氷點の分離はやや認められるようになるが、葉柄のばあい程著しくはなく、かつ1週間処理と2週間処理との間にそう甚だしい差は現われてこない(第6圖)。

V

第III節に述べたように耐凍性になつてゐるかないかによつて細胞の凍り方ははつきりと違つてくる。耐凍性の状態では細胞内部は凍りにくく、ほとんど細胞外凍結のみをするのに反して、耐凍性のないときには細胞外凍結が起こつてもその程度はわずかですぐに細胞内部が凍つてしまう。いいかえると耐凍性の状態では細胞外凍結が起り、耐凍性を失つてゐる状態では細胞内凍結が起るといつてよい。この二つの細胞の凍結過程による氷の生成を今まで得られてゐる知識から考えてみよう。

細胞外凍結： いつばんに冷されていく場合無傷の組織の内部で最初に氷の生ずるのは細胞間隙に面した細胞膜表面である。このときの温度はかなり高く表層部の凍結に引きつづいて起こると思われる。この場合細胞内部から水の補給が十分であれば表面の氷はどんどん發達して典型的の細胞外凍結となるわけであるが、水が細胞内部より奪われるためには細胞内の滲透力に打勝つ力を必要とし、また細胞表層部及び細胞膜を通過するのにも抵抗を受けることになる。したがつて細胞外凍結のばあい氷の成長速度にはかなりの制限があるわけで、等しい温度のときに等しい量の氷が生ずるのに細胞内部が凍るばあいに比べると時間がかかる。つまり細胞外凍結のばあいの氷生成速度は細胞内凍結の場合より小さいことになる。

細胞内凍結： 細胞膜外表面に氷が生じて細胞内よりの水の補給がひじょうに少ないか、またはほとんどない場合には細胞外表面の氷は發達せず、したがつて潛熱も遊離されないで細胞内部の温度は下り、ますます過冷却されていく。過冷却がある程度まですすむと細胞の内部が凍りはじめる。このばあいは凍るために水の移動ということがないだけ細胞外凍結に比べて氷の生成は容易であり、したがつて速度も大きいことになる。

以上のことから考えると主として細胞外凍結をする細胞からできている組織小片では、表層部の凍結に引續いて内部正常部に遅くはあるが連続的に氷が生じ、それだけ潛熱が遊離される。すなわち凍結が表層部から連続的に進行するので氷點の分離は起こりにくい。他方細胞内凍結を主として起こす組織小片では氷の生成に差が生じてくる。急速な表層部の凍結が一通り終つた後、内部正常部の細胞の過冷却部がある程度になるまで氷の生成はほとんど中止されるか、または非常に少ない。その結果第1氷點が現われた後は一時温度の下り方は急になる。そ

してある點まで過冷却がすすむと細胞内凍結が連続的に起こり始めるために温度の下り方は急に緩やかになる。温度の下り方の變化は凍結細胞の頻度によつて決まるもので、この頻度が十分に高く、遊離潜熱と外圍に奪われる熱量とが均合うときには温度降下は止まる、つまりその間だけ曲線上には水平部として現われることになる。また頻度が十分高くないときには頻度に應じて緩やかな傾斜となる。いずれにせよ氷點の分離はかなり明瞭であると考えられる。

アカビートの柔細胞はこの實驗條件の下では耐凍性の強くなつているときは細胞外凍結を、耐凍性を失つている状態では細胞内凍結を起こす。したがつて上に述べた考え方からみると當然前者の凍結曲線では氷點の分離は不明瞭で第2氷點部は認められなくなるはずであり、後者のばあいには第2氷點部はかなりはつきりと區別できるはずである。實際アカビートの耐凍性になつているものと耐凍性を失われたものについて得られた凍結曲線の型はこの豫想を裏書きしている。

アカビートでは直接寒氣にさらされる葉柄の方が地下にあつて寒さの變動を直接受けない根よりも、耐凍性の有無によつて凍結様式に著しい差異を示している。これと平行してこの關係は凍結曲線の上にもはつきり現われ、葉柄における方が凍結曲線の型の變化は甚だしく、特に第1氷點が現われた以後の温度の下り方の差が著しい。1週間 dehardening 處理されたものの方が温度は緩やかに下つている(第5圖 c-d)。この場合は全細胞にわたつて dehardening が充分行われていない、いかえるとなお耐凍性が残つていて、表層部の凍結に引續いて細胞外凍結をする細胞がいくらかあるため、わずかつつではあるが連続的に氷が生成されていると考えれば一應の説明はつく。事實凍結過程の觀察で凍結後も生き残つている細胞のあることが確認されている。ところが2週間處理されたものでは第1氷點以後の温度の下り方はさらに急で c'-d' 間は冷却部 a-b' 間(第5圖)とほとんど平行になつている。この温度の下り方が a-b' 間と平行になつているということはその間氷が生成されていないことを示すに他ならない。この事實は次のように考えられる。細胞の大部分は耐凍性を失つているため細胞外凍結を起こすものはほとんどない。細胞内凍結が起こるにはある程度まで過冷却されることが必要であり、そのため第1氷點が現われた後温度が必要程度まで下る間は凍結は起こらない。つまりこの間氷の生成は中斷されているために、氷の生成の全くない冷却部(a-b)と同様に温度が降下するのである。

以上の解釋から少なくとも同じ種類の植物の同じ種類の組織について凍結曲線を比較すればその型から耐凍性の程度はだいたい判定できることになる。第1氷點以後の温度の下り方、すなわち氷點の分離が不明瞭なほど耐凍性になつているといえよう。死組織の凍結曲線では氷點は一つしかなく、若いシロウリ、キウリ³⁾ではほとんど同じような曲線を示して型の上だけでは區別をつけることが困難なばあいもあるが、氷點の高さ及び温度の下り方から區別は十分可能である。

島山⁶⁾はカンショを材料とした實驗から第1、第2氷點を次のように解釋している。氷點の

分離つまり氷點が二重になつて現われるのは細胞外凍結と細胞内凍結の不連続現象である。このうち細胞外凍結が第1氷點として現われるのであつて、氷點が二重になつて現われるのには細胞の水に対する透過性が比較的大で細胞間隙その他細胞外に適量の液のあること及び原形質膜が細胞内凍結をいくぶんさまたげておくことが必要條件であるという。

アカビートの實驗結果では細胞外凍結のみが起こるばあいには氷點の分離はほとんどみられず、細胞外凍結がほとんど起こらないときには氷點ははつきりと二重になつて現われている。すなわち畠山の考え方から豫想されることと逆になつている。しかし畠山の論文では細胞外凍結の概念がはつきりしていないのでこれ以上論ずることはできないが、私たちのいう細胞外凍結とは違つたものをさしているように思われる。

摘 要

細胞の凍結過程すなわち氷の生成過程からみて、細胞外凍結を主とする組織の凍結曲線では第1、第2氷點の分離は不明瞭であり、細胞内凍結が主となつているものでは二つの氷點ははつきり區別されると豫想される。この豫想の正非をアカビートを人工的に耐凍性にした場合と耐凍性を失わしめた場合とについて調べてみた。結果は豫想通り耐凍性の強い状態では細胞外凍結が主となり、この場合は凍結曲線上では第1、第2氷點の區別はつけ難いが、耐凍性の弱いときには細胞内凍結が主となつていて、凍結曲線上の二つの氷點は明瞭に分離する。

したがつて同じ種類の植物の同じ種類の組織について hardening 及び dehardening 処理をした後、凍結曲線をとれば、その兩者の型の差から耐凍性の程度をだいたい判定することができる。

文 献

- 1) 青木 藤 1948 生物の凍結過程の分析. III. 植物組織の凍結曲線上の二つの氷點. 低温科學, 4, 65.
- 2) ———— 1950 馬鈴薯塊莖の再凍結曲線の型について. 同誌, 3, 207.
- 3) ———— 1950 生物の凍結過程の分析. I. 植物組織の凍結曲線の型と凍結様式との關係. 同誌, 3, 219.
- 4) 朝比奈英三 1950 生物の凍結過程の分析. II. 植物組織の凍結過程の顯微鏡的觀察. 同誌, 3, 229.
- 5) ———— 1950 植物細胞の凍結過程と凍結した細胞の型. 科學, 20, 321.
- 6) 畠山伊佐男 1951 植物生組織の2段凍結. I. 科學, 21, 95.
- 7) Scarth, G. W. & J. Levitt 1937 The frost hardening mechanism of plant cells. *Plant. Physiol.*, 12, 51.
- 8) ————, ———— & D. Siminovitch 1940 Plasma membrane structure in the light of frost-hardening changes. *Symp. Quant. Biol.*, 8, 102.

Résumé

Whether the freezing point of a piece of plant tissue appear in doublet (the first and the second freezing points) on the freezing curve or not mainly depends upon the mode of freezing of the living cells in the inner, uninjured part of the piece in which the cells in the surface layer have been almost all damaged by cutting out. Taking into consideration what is now known about the freezing of cells one may arrive at the following inference. When the freezing of living cells is of the extra cellular type, it would propagate continuously from the surface layer into the inner undamaged part, resulting in the disappearance or in the obscurity of the second freezing point. On the contrary, when the interior of the living cells easily freezes, freezing would be interrupted for a short time after the completion of the freezing of the surface layer, and consequently two freezing points would be apparently distinguished.

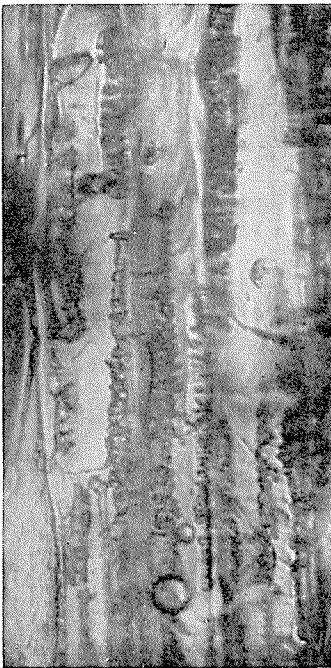
To make sure of this expectation, the authors performed experiments on the tissue piece of petiole and root of red beet which had been previously hardened or dehardened. The experimental results fulfilled the above mentioned expectation. In hardened state the living cells show complete extra cellular freezing and the two freezing points are not clearly distinguishable on the freezing curve. On the other hand, in the living cells of the dehardened materials the cell interior freezes suddenly after the supercooling. On the freezing curve obtained from the dehardened specimen, the first freezing point presents a sharp pike and the second a plateau, two freezing points being distinctly recognized.

Thus one may infer within certain limits the grade of frost resistance from the difference between the shapes of the freezing curves obtained from tissue pieces of plants in hardened and dehardened states.



第 1 圖

アカビートの葉柄の柔細胞×350
A. 2週間 de'arden B. 2週間 harden



第 2 圖

1 週間 harden した葉柄の柔細胞
細胞外凍結をおこしたもの。凍り
始めてから19分後、 -5.4°C . 150×



第 3 圖

1 週間 de'arden した葉柄の柔細胞
 -6°C で細胞内凍結をおこしたもの。
10 分後、 -6.6°C . 350×