HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	生物の凍結過程の分析　ＸＩ．：植物組織の第一氷點の意義について
Author(s)	照本, 勳
Citation	低温科學, 10, 93-102
Issue Date	1953-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17546
Type	departmental bulletin paper
File Information	10_p93-102.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Isao TERUMOTO 1953 Analysis of the Freezing Process of Living Organisms. XI. On the Significance of the First Freezing Point of Potato Tuber. *Low Temperature Science*, ***10***. (With English résumé p. 102)

生物の凍結過程の分析 XI.

植物組織の第一氷點の意義について*

照本勳
(低溫科學研究所 生物學部門)

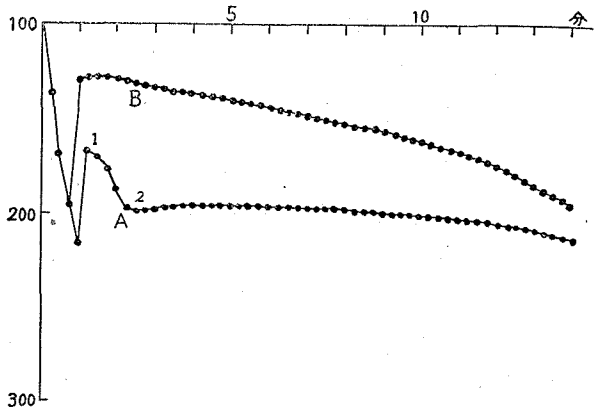
(昭和27年9月受理)

I. 緒言

植物組織が氷點下の溫度にさらされた場合に凍害凍死の現象をおこすことは周知の事實であり，このことについては現在まで多くの研究がなされてきた。凍害凍死の原因について一番大きな問題となることは組織中に氷が出來るということである。

それならば一体如何なる過程，様式をとつて凍結が起り死にいたるのであろうか。一見簡單なように見えるこの現象には，案外複雜な多くの問題が含まれているものであり，又植物生理學上にも非常に興味ある課題と思われる。

組織の凍結過程ならびに凍結様式を知る一つの方法として凍結曲線の分析がある。外國ではMaximow,[11] Zacharowa[15] など日本では青木[1-6] 畠山[7-8] 久米[9] の諸氏によつて測定され分析されてきた。



第 1 圖

A: 初凍結曲線 B: 再凍結曲線 1: 第一氷點
2: 第二氷點 縦軸…檢流計の讀み 横軸…時間

第1圖は馬鈴薯塊莖組織小片の凍結曲線であるが，生組織では曲線Aのごとく過冷却が破れたのち急激にある點まで溫度は上昇した後直ちに降下してある溫度になつてしばらく止まるか，又は溫度の下り方が急にかんまんになる。この最初の溫度の上昇點を第一氷點といい，あとの溫度の大体一定になつたところを第二氷點とよんでいる。このように植物組織が二重の氷點をもつことは色々の植物で

* 北海道大學低溫科學研究所業績 第166號. 日本植物學會札幌支部第4回講演大會(1951)に發表.

例えば Tussilago の葉柄 (Maximow, 1914), ライムギの幼根 (Zacharowa, 1926), 馬鈴薯塊莖 (Walter & Weismann 1935, Luyet & Gehenio 1937, 青木 1946—1950, 照本 1951) で見られている。また曲線 B は一度完全に凍結した組織をとかし，再び凍らせたばあいの凍結曲線で再凍結曲線と呼ぶ。一般に死んだ組織の凍結曲線として理解されるもので，生組織のような氷點の二重性は完全に失われてしまい，丁度稀薄溶液の凍結曲線ににた型を示す。

生組織の第二氷點の意義については，今までの研究者によつて大体同じ解釋がなされて，細胞自身の氷點であると考えられてきている。然し第一氷點については色々な解釋が下され，Maximow,[11] Zacharowa,[15] Walter & Weismann[14] は熱電對で溫度を測定する際に，組織にさされた熱電對によつて周圍の細胞が破壞され，その際流出した細胞液の凍結が第一氷點となつて現われるものであるという。

また Luyet & Gehenio[10] は第一氷點は組織の細胞間隙中の水の凍結であり，青木[1] は組織を試料として切りとる際にこわされた組織小片表層部の凍結の現われであるとした。最近畠山[7] は第一氷點を細胞外凍結の現われであると發表している。しかしいまだ殘されている問題は多い。また一方凍結曲線は組織の凍結にともなう溫度變化の綜合的な現われの一つであるので，凍結曲線全体の意義を知るうえに第一氷點の本態を明らかにする必要がある。

私[12] は前に過冷却度の多少によつて第一氷點の出現の程度が非常に左右されることを報告したが，ひきつづき過冷却溫度を考慮に入れながら，組織片の表層部處理實驗をおこない，第一氷點の現われうる過冷却度の限界とその氷點の高さとの關係を明らかにすることが出來たので報告する。

II. 實驗材料と方法

材料には本研究所實驗畑で收穫した馬鈴薯(品種名，男爵)の塊莖をもちい，實驗は 10 月から 11月にわたつておこなつた。この時期の塊莖の含水量は平均 85.0%である。

實驗の方法は大体青木[5] の方法と同じで溫度變化は熱電對をもちいて測定した。熱電對は銅とコンスタンタン線の各 0.2 mm 徑のもので，試料 (長さ 15 mm，徑 5 mm) の丁度中心部に先端がくるようにするため先端部 7.5 mm をのこし，他は徑 5 mm の硝子管の中に蜜蠟で封じこみ，先端部には絶緣ラックを塗つて絶緣した。熱電位差は理研製ダルソンバール型檢流計 (感度 10×10^{-10} アンペア) で測定し，15 秒おきにその變化を讀みとつた。熱電對の感度は 46 目盛が 1°C である。

冷却は食鹽水と氷の寒劑でおこなつた。保護管 (徑 1.8 cm，長さ 17.5 cm) を Dewar 瓶中の −10°C の寒劑に入れ，さらにこの Dewar 瓶をそれより數度低い寒劑中につけ，斷熱には特に注意して實驗中攪拌を充分にした。

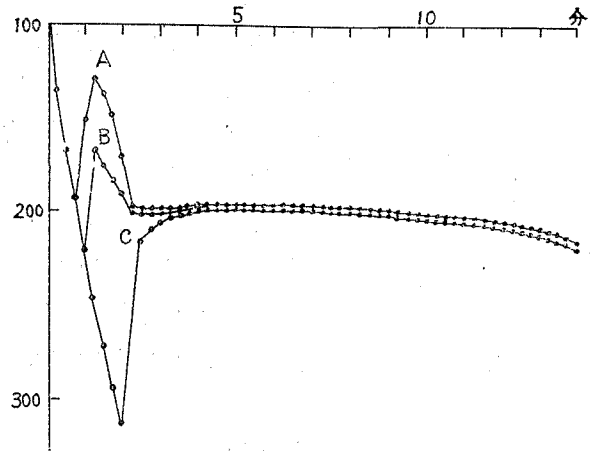
試料は空氣層をはさんで冷却されるわけで，冷却速度は 0°C を中心にして約 2.8°C/分，この値は實驗中一定であつた。

過冷却の最も早く破れる點を測定する場合には，私が前にもちいた方法[13]で最初から組織小片の下端に氷針を接したままで冷却してゆき，過冷却が破れると同時に氷針を組織小片からすみやかに離すようにした。また實驗の目的によつては適當な過冷却溫度になつた時に，保護管中に入れてある氷針を接觸させて過冷却を破るようにした。

實驗に使用した組織小片は直徑5mm，長さ15mmの圓柱狀で，キルク抜きを應用して考案した器械で切り抜いた。試料をとつた場所は主として髓部のところである。

III. 結果と考察

おなじ種類の生組織小片の凍結曲線において第1圖に示したように氷點が二重に出る場合と氷點が一つの單一な曲線をとる場合とがあるが，青木はその原因として組織小片の表層部破壞部の狀態によつて左右されるものである事を報告した。その結果第一氷點は組織小片の過冷却の程度によつて著しく左右されるものであることが明らかになつた。[2] したがつて青木の實驗のばあい[1,2]蒸溜水，蔗糖液で組織小片表層部を處理するという事が，たんに過冷却の破れる溫度を高く或は低くするだけのものか，またはほかに第一氷點の高さにも影響を及ぼすものであるかが問題となる。



第 2 圖

組織小片表層部處理の凍結曲線に及ぼす影響

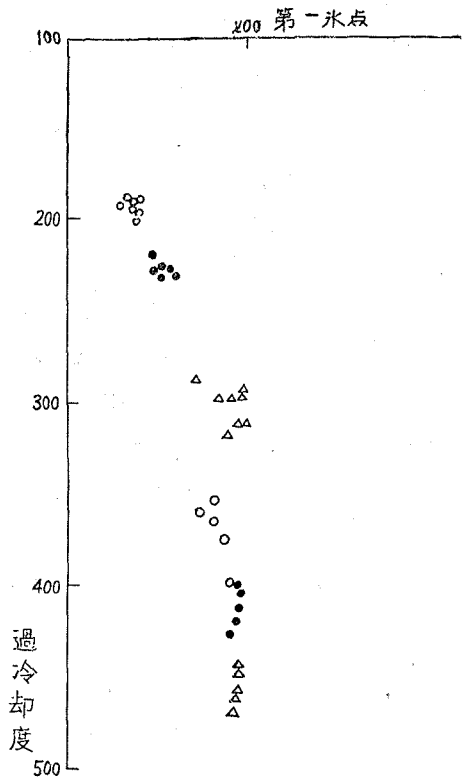
A：蒸溜水處理　B：對　照　C：1M蔗糖液處理

縱軸…檢流計の讀み　橫軸…時間

第2圖は，豫め蒸溜水で20秒間，1M蔗糖液で5秒間表層部を處理し周圍についた液を輕くぬぐつてから凍結させ，その凍結曲線を示したものである。

氷を最初から組織小片に接觸させておいたので過冷却が最も早く，すなわち最も高い溫度で破れた場合のものである。これで判るように蒸溜水處理が最も早く破れ，次いで對照（無處理），蔗糖液處理のものは最も低い溫度になつてから凍つている。過冷却の破れる溫度に平行して，第一氷點の高さも變り蔗糖液處理では完全に消失している。然し第二氷點には處理の影響は見られなかつた。

次に過冷却が最も早く破れる點と，そのばあいの第一氷點の高さ，ならびに植氷 (inoculate) せずに過冷却が自然に破れる點と，その時の氷點（實際には第二氷點となる）とを前の實驗と同じように處理したもので測定して，その過冷却の溫度と第一氷點との關係をプロットしてみたのが第3圖である。これで判るように豫め蒸溜水で表層部を處理することによつて過冷却溫度



第 3 圖

表層部處理による過冷却の破れる點と第一氷點との關係

○：蒸溜水處理　●：對照　△：1 M 蔗糖液處理

上部は最も高い溫度で過冷却が破れた場合で，下部は自然に破れた場合。　縱軸，橫軸…共に檢流計の讀み

と第一氷點の値は明らかに變化をうけている。

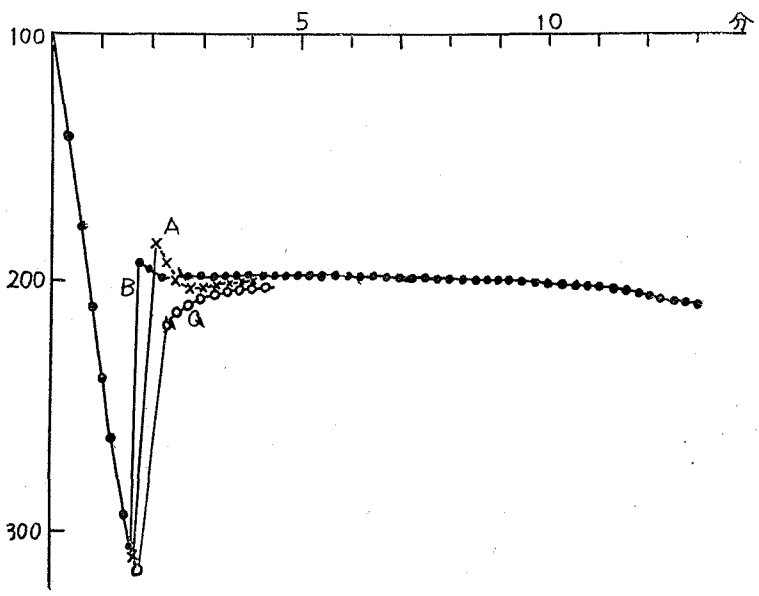
すなわち表層部を蒸溜水で處理したものでは最も早く過冷却が破れて溫度の上昇した點(第一氷點)も高く，對照としての無處理のものがそれにつぎ，蔗糖液で處理すると最も過冷却してから破れるが，溫度の上昇した點は目盛で大体 200 附近にくる（この目盛 200 附近は氷點が二重に現われるばあいの第二氷點のところである)。このばあいには過冷却が破れてから溫度が上昇しても蒸溜水處理，無處理のものと違つて，その上昇點はピークとなつて現われないために第一氷點は存在しなくなる。

このことは，前に私が報告した[12]過冷却の破れる點と第一氷點の高さとの關係に殆んど一致している。表層部處理ということが過冷却の破れる溫度をある程度支配するものでそれによつて第一氷點も變化してくることがわかる。高稠な蔗糖液處理のばあいでは過冷却の破れる溫度は低く，inoculate しつつ冷却しても第一氷點は全く現われてこない。また生組織をすりつぶしその搾汁で表層部を洗つたものでは，對照の凍結曲線と變るところはなかつた。

凍結曲線の型は組織内に氷が出來る際に放出される潛熱量と冷却によつて外圍に奪われる熱量との關係によつてきまるものであるから，表層部を處理することは單に過冷却の破れる溫度を支配するばかりでなく，當然第一氷點の高さにも影響するものである。第 4 圖は前と同じく處理したものと無處理のものを，ほぼ同じ過冷却度で破つた時の凍結曲線である。第 5 圖は數個の組織小片について得られた過冷却の破れる溫度を異にしたばあいの凍結曲線を書き込んだものであるが，これからも明らかなように第二氷點の高さには全く影響がなく，第一氷點の高さだけが色々と變化している。

次ぎに第一氷點が熱電對の周圍にたまつた細胞液の影響であるか[11,14,15]どうかを確めた實驗の結果を第 6 圖に示した。表層部を蒸溜水で處理した組織小片に細い穴をあけ，その中に豫め

1M蔗糖液を注入しておいて，そこに熱電對を挿入した。この場合熱電對をさしこむ際に溢れ出る液は注意し，すみやかに濾紙でふきとつた。結果は過冷却度及び第一氷點の高さには蒸溜水處理の影響がはつきりと出ているのに反し中心部に注入された蔗糖液の影響は殆んど現われていない。反對に表層部を蔗糖液で，熱電對の周圍を蒸溜水で處理したものでも，結果は同様に蔗糖液で處理された表層部の狀態に支配されている。



第 4 圖

過冷却度のほぼ同じ場合の凍結曲線

A： 蒸溜水處理　B： 對照　C： 1M 蔗糖液處理

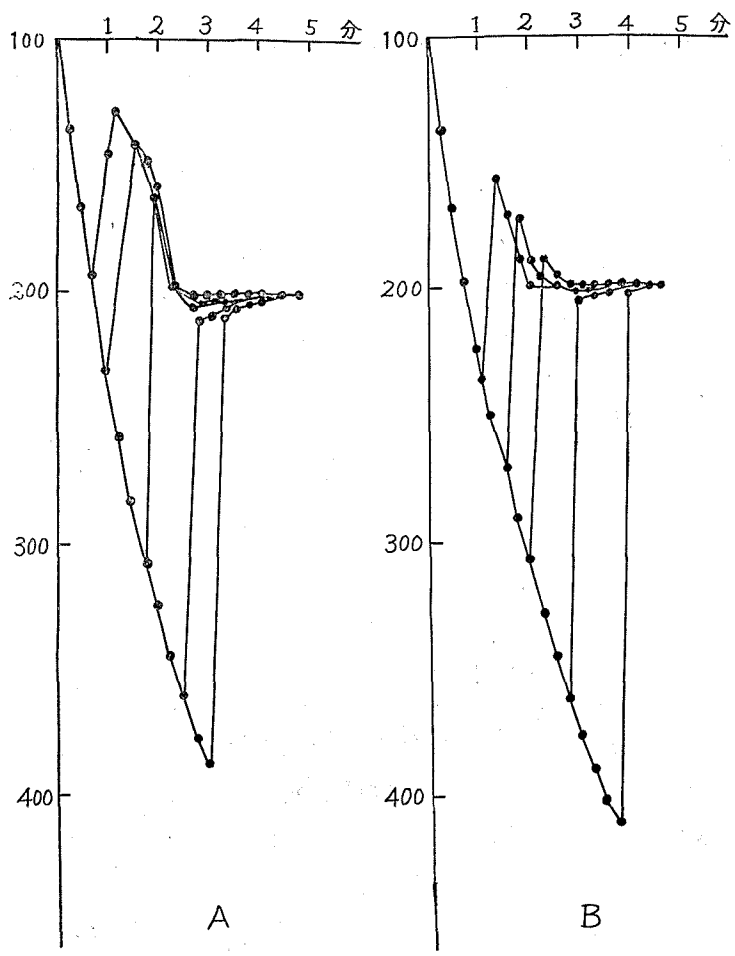
縱軸…檢流計の讀み　橫軸…時間

青木[1] の結果では蔗糖液注入の場合に第一氷點がやや低く出るのは過冷却度が大きかつたことから理解される。この實驗により第一氷點は，過冷却度を支配する表層部の凍結と密接に關係しているものであつて，熱電對に接する部分の凍結とは直接的には無關係と考えられる。

完全に凍結して融かされ再び凍結する場合に得られる凍結曲線（第1圖B）は，初凍結曲線のように二重の氷點はなくなり單一な曲線をとるようになる。再凍結曲線の氷點は初凍結曲線にくらべて速かに高い氷點をとる。

第7圖は初凍結で過冷却度を異にした場合の第一氷點を結んだ線と再凍結曲線を延長した線とは大体冷却曲線上の一點（第7圖A）で交わることをしめしたものである。もしかりに生組織小片が過冷却という現象をおこさずに凍結が始まり，それが一様に進行するものとするならば，冷却曲線よりただちに第二氷點の平行部があらわれると考えられる。然し實際には小片をきりとる際切斷され，また破壞された細胞より流出した細胞液及び表層部の破壞細胞が生組織の周りにあつて，凍結にさいしては二段的な凍り方をすると考えられる。

第8圖は今までのことを理解しやすくするために，過冷却の破れる溫度と氷點との關係を定性的に圖示したもので，前にのべたように組織小片の內側に生組織，外側に破壞された死組織層がとりまいているということを假定としたものである。この圖から判ることは組織の搾汁の氷點（Beckmann 溫度計から得られる値）と，組織自身の氷點（凍結曲線から得られるもので，



第 5 圖

過冷却程度による第一氷點の高さ

A：蒸溜水處理　　B：對照

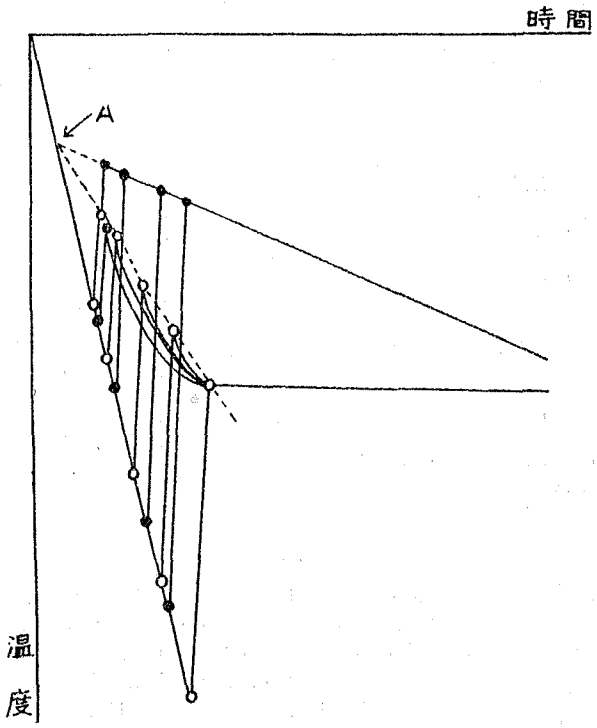
縱軸…檢流計の讀み　　橫軸…時間

平行部となる第二氷點部を延長して，冷却曲線と交わつた點の溫度を組織の氷點と假定する）とを知れば，過冷却の破れる溫度から第一氷點の値を知ることが出來る。生きている組織の周圍を死んでいる組織が一樣にとりかこんでいるような場合に，かりに凍結されずに冷却だけされる時にはACという冷却線上にのつて冷却される。いま生組織より氷點の高い周圍の死組織が一たび凍結される場合には，周圍の組織は凍結しながらも中心部の組織はなお過冷却狀態を保つて（G–D 間）いるのでBD線上をとおつて生組織自身の氷點D（檢流計の讀みで大体200）になつて，始めて中心部の生組織は凍る。第一氷點がBD線にあるということは過冷却の破れる溫度を異にしたばあいの第一氷點を分布させるとBD線上にくるとゆう意味である。このことから，かりに生組織自身の氷點（檢流計の讀みで200）で凍結がはじまつても，それより氷點の高い死組織に支配されて第一氷點（G）が一度あらわれて第二氷點（D）に凍結が進行する。また檢流計の讀みで310以上まで過冷却されてから凍結がはじまるばあいには，氷點がBD線上にくることなく，直ちにCD延長部上の氷點をとることとなる。

なお再凍結曲線が冷却曲線と交わる點（第7圖A）の溫度と，Beckmann 溫度計で測定した搾汁の氷點降下度とは，馬鈴薯塊莖を使用した本實驗の條件下ではほぼ一致することを確めた。氷點降下度は−0.64°C，檢流計の讀みからの溫度は−0.63°Cである。

現在まで同じ材料を用いて第一氷點の消失する原因については，色々と解釋されている。久米[9]は凍結函に裝置する時に組織小片の表面をぬぐうことと，冷却される間函内の乾燥した空氣にさらされる結果，表面が乾燥することに原因があるという。このことは第一氷點の現われる過冷却の限界よりも低い溫度まで過冷却が進行したためと理解できる。

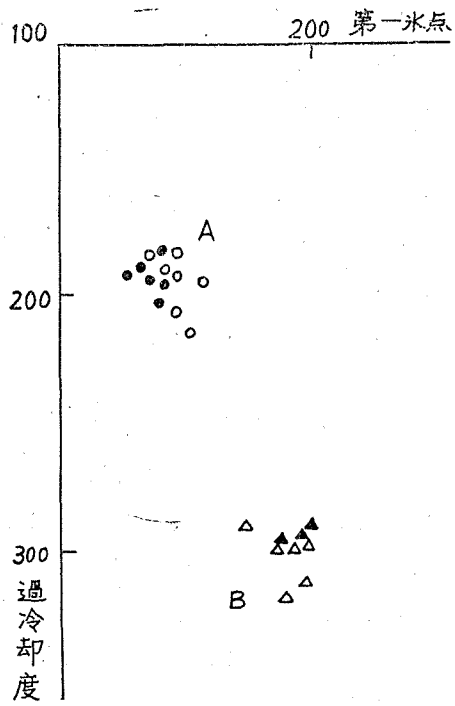
また畠山[7]は甘藷(護國)で第一，第二氷點を論じている。その方法は眞空ポンプを用いて組織小片の細胞間隙に水を注入してやると，二氷點を示さないものが第一，第二氷點を現わしてくること



第 7 圖

第一氷點と再凍結曲線との關係圖

A： 初凍結曲線上の第一氷點を結んだ線と再凍結曲線の延長部との交點 (照本, 1951[12])



第 6 圖

組織小片表層部ならびに中心部を豫め處理した場合の第一氷點の分布

A：表層部蒸溜水處理
●：中心部無處理 ○：中心部 1 M 蔗糖液處理
B：表層部 1 M 蔗糖液處理
△：中心部無處理 ▲：中心部蒸溜水處理
縦軸…過冷却度 横軸…第一氷點の溫度

を報告している。この場合にも細胞間隙中に水が注入されたためよりも組織小片表層部が水によりぬらされ，對照よりも過冷却の破れる溫度が小なることから第一氷點，第二氷點が分離して現われたものと思われる。

第 9 圖は甘藷(品種名，農林一號)の凍結曲線を馬鈴薯のばあいと同じ實驗條件でえたものである。私の使用したこの種類においては馬鈴薯の時と同じく，ある過冷却度においては，明瞭に氷點が二重に現われている。このことからも凍結曲線の測定に際して過冷却度は大きな重要性を有するといえる。

いままで凍結曲線の第一氷點は一般に不安定なものと考えられ，同一種類の植物の同じ種類の組織であつても，現われる場合もあり，現われぬ場合もあるといわれてきたが，きりとられた組織小片，つまり表層部の細胞が切斷破壞によつて死んでいる場合には，ある過冷却度内で凍結がはじまるときには必ず第一氷點は現われるものということが出來る。

IV. 摘　　要

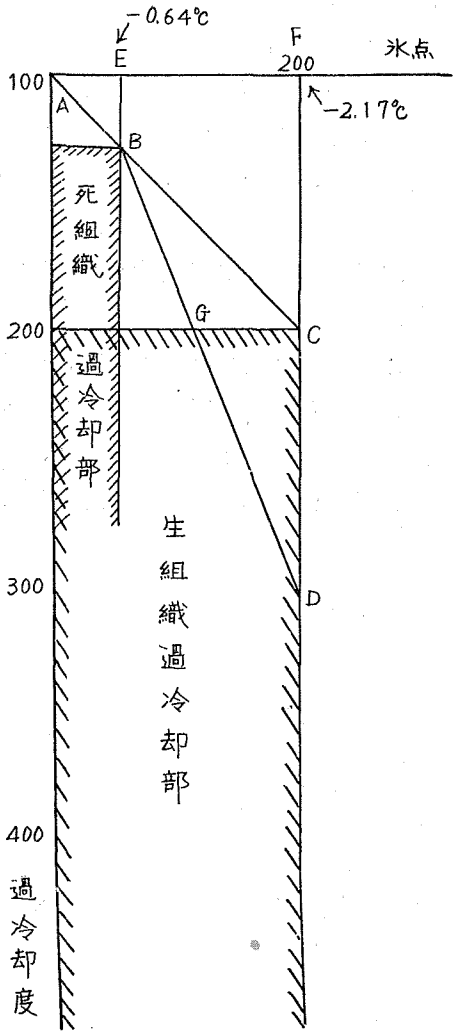
(1) 馬鈴薯塊莖の組織小片を凍結させ，その溫度變化を熱電對を使用して測定した。組織小片は5×15 mm 圓柱狀のもので冷却溫度は −10 °C，冷却速度は 2.8°C/分である。過冷却を破るには始めから，または隨時氷針をもつて植氷してやつた。

(2) 組織小片表層部を豫め蒸溜水，1 M 蔗糖液で洗い，最も早く過冷却が破れる溫度と，最も低い溫度で過冷却が破れる溫度を測定し，對照と比較して，それぞれの過冷却度と第一氷點の高さとの關係を考察した。

(3) 蒸溜水處理では過冷却度は最も小さく，第一氷點は最も高い。對照はこれに次ぎ，蔗糖液處理では過冷却度は最も大きく，第一氷點は消失する。

(4) 熱電對の周圍の細胞液は第一氷點には直接的に無關係である。

(5) 植物生組織小片の凍結曲線上の第一氷點は，過冷却の破れる溫度と第一氷點の高さとの關係から，組織小片の表層部の凍結の現われであると結論される。



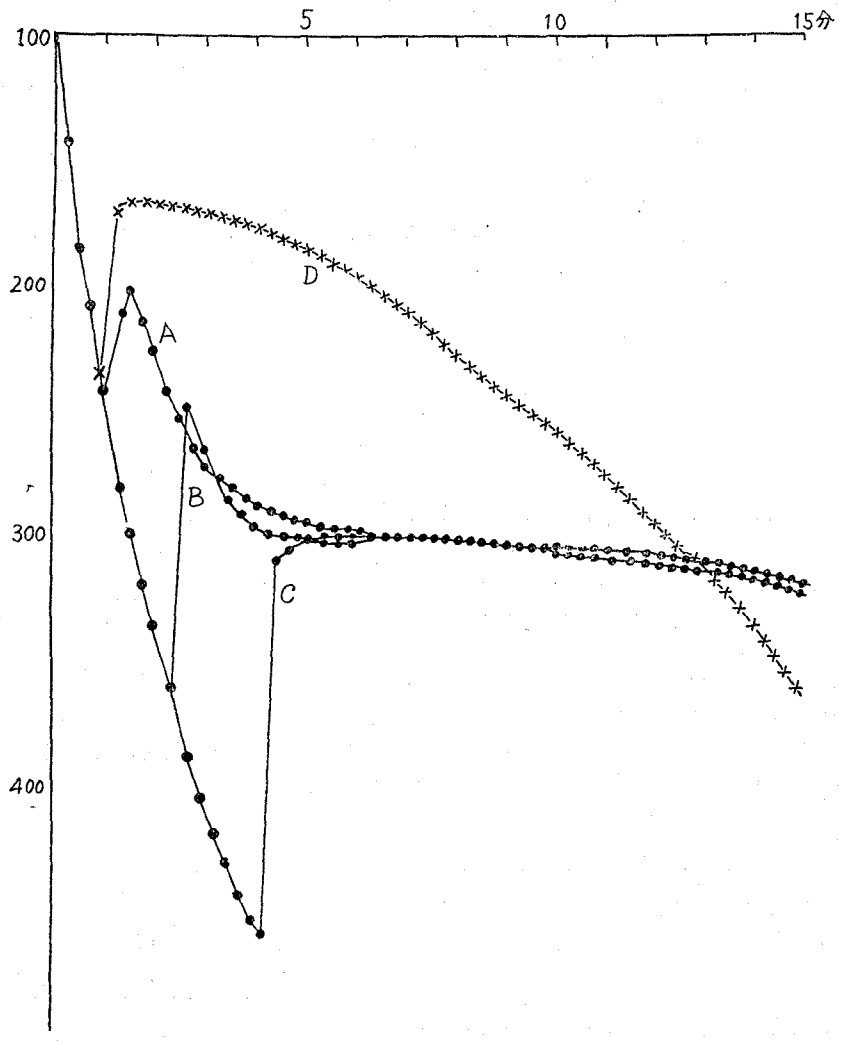
第 8 圖

第一氷點分布圖

縱軸は馬鈴薯組織小片を凍結する場合の過冷却溫度をあらわし，橫軸はその場合の氷點をあらわし，目盛 100 は檢流計の讀みで 0°C である。目盛の增大は溫度の低下をあらわす。

AB：死組織冷却線　AC：生組織冷却線
BD：第一氷點分布線　E：組織の搾汁氷點，死組織氷點(第 7 圖A點)　F：生組織氷點(凍結曲線の第二氷點)

(6) 組織の搾汁の氷點，死組織小片の氷點，生組織小片の第一氷點，ならびに第二氷點との關係を論じた。



第 9 圖 甘藷*(農林一號)の凍結曲線
A, B, C: 初凍結曲線 D: 再凍結曲線
縦軸…檢流計の讀み 横軸…時間
* 含水量 (57.0%), 組織搾汁氷點 (−1.42°C)

終りに臨み，終始懇篤なる御指導と御教示を賜わりし青木康先生に深厚なる感謝を捧げる。

文 献

1) 青木 薩 1946 植物組織の第一氷點. 科學, **16**, 24.
2) ———— 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. 低溫科學, **4**, 65.
3) ———— 1949 馬鈴薯塊莖の凍結曲線. 低溫科學, **2**, 185.
4) ———— 1949 植物組織の凍結曲線. 生物學の進歩. **4**, 145.
5) ———— 1950 馬鈴薯塊莖の再凍結曲線の型について. 低溫科學, **3**, 207.
6) ———— 1951 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樣式との關係. 低溫科學 **3**, 219.

7) 畠山伊佐男 1951 植物生組織の2段凍結 I. 科學, **21**, 95.
8) ———— 1951 植物生死組織の凍結の差異 II. 科學, **21**, 138.
9) 久米直之 1948 馬鈴薯の凍結について. 生態學研究, **11**, 129.
10) Luyet, B. J. and P. M. Gehenio 1937 The double freezing point of living tissues. Biodynamica, No. **30**, 1.
11) Maximow, N. A. 1914 Experimentalle und kritische Untersuchungen über das Gefrieren und Erfrieren der Pflanzen. Jahrb. f. wiss. Bot, **53**, 327.
12) 照本 勳 1951 植物生組織の第一氷點と過冷却. 科學, **21**, 596.
13) ———— 1951 貯藏馬鈴薯塊莖の過冷却について. 低溫科學, 8, 177.
14) Walter, H & O. Weismann 1935 Ueber die Gefrierpunkt und osmotischen Werte lebender und toten pflanzlischer Gewebe. Jahrb. f. wiss. Bot, **82**, 273.
15) Zacharowa, T. M. 1926 Ueber den Einfluss niedriger Temperaturen auf die Pflanzen. Jahrb. f. wiss. Bot, **65**, 61.

Résumé

It is the object of this study to learn whether there is any envident relation between the grade of supercooling and the height of the first freezing point on the freezing curve of a tissue piece of potato tuber. The tip of the thermojunction (copper-constantan, 0.2 mm in diameter) was inserted in the center of a small cylindrical tissue piece (5 mm in diameter, 15 mm in length) and the temperature change was taken every 15 seconds under the cooling rate of 2.8°C per minute at 0°C. The degree of supercooling was controlled to cause freezing at desired temperature, by touching the surface of the piece with an ice needle.

The height of the first freezing point is remarkably influenced by the grade of supercooling, that is, the temperature of the first freezing point becomes higher with decreasing grade of supercooling, and when the supercooling grade is made large enough, the first freezing point completely disappears.

Further, the first freezing point depends upon the freezing condition of the surface layer of the tissue piece. The piece previously washed with distilled water for 30 seconds shows a high first freezing point; on the contrary, in the one treated with 1 mol solution of sucrose the first freezing point does not appear. The condition of the part surrounding the junction inserted into the piece does not exert any influence on the first freezing point. The height of the second freezing point remains constant independently of the condition of the surface layer.

From the above facts it can be concluded that the first freezing point of the tissue piece is the indication of the freezing of the damaged surface layer of the piece.

Relations among the freezing temperature of the squeezed cell sap, that of the dead tissue, the height of the first freezing point, and the grade of the supercooling of the tissue piece were discussed.