



Title	クワの耐凍性及び皮層柔細胞の生理的状态の季節的变化
Author(s)	酒井, 昭; SAKAI, Akira
Citation	低温科学. 生物篇, 13, 33-41
Issue Date	1955-12-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17576
Type	departmental bulletin paper
File Information	13_p33-41.pdf



桑の耐凍性及び皮層柔細胞の生理的 状態の季節的變化***

酒 井 昭

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和30年9月受理)

I.

札幌附近では冬期間ポプラ、ヤナギ、は -40°C の温度で最少とも1日間凍結してもその後発芽するし、また発根もする。当し9月や5月中旬頃には精々 -5°C で短時間凍つた丈でも死んでしまう。木の種類によつて耐凍性の大きさは色々異つてゐるが、いづれも秋から冬にかけて気温が低くなるにつれて、耐凍性を増大する。耐凍性の増大につれて枝条内にどのような変化が起るのであろうか。或は枝条内にどのような変化が起きて耐凍性が増大するのであろうか。従来この問題を研究する場合、季節的に皮層柔細胞が生理的、生化学的にどのような変化をするかを調べるだけで、枝条自身の耐凍性や、皮層柔細胞の耐凍性の変化を併せ調べる事が少かつた。冬期間、韌皮部は材部より耐凍性が大きい。枝条が凍結して死ぬ場合、髓冠部、髓線の細胞が死んで browning するが、韌皮部は正常に近く、最少とも皮層柔細胞は正常に原形質分離する。従つて皮層柔細胞の生理生化学的变化から直に枝条全体の耐凍性を論ずる事は厳密な意味では正しくないが、現在のところ、枝条内にどのような変化が起きているかを調べる場合、皮層柔細胞以外の組織は技術的に調べる事が困難である。従つて本実験では枝条の耐凍性と共に皮層柔細胞の耐凍性の変化を調べて、これと皮層柔細胞の生理的变化との関係を調べる事にした。

夏から秋にかけて澱粉の蓄積が増大し晩秋から冬にかけて、澱粉から糖類への変化がおこるので、糖類は著しく増大する。又植物の耐凍性も、秋から冬にかけて増大するので、長い間糖類の含有量が大きい事が耐凍性の要因として考えられていた。

Ivanov¹⁾(1939)は色々なミカン類を人工的に hardening してから、耐凍性の変化と糖類、還元グルタチオンの変化を調べたが、耐凍性の増大と還元グルタチオンの減少との間に、密接な関係があるが耐凍性と糖類の含有量との間には関係がない事を認めた。又 Siminovitsh and

* 北海道大学低温科学研究所業績 第301号

** 農林省、農業、蚕糸業、林業及び水産業に関する科学研究助成金による。

Briggs⁹⁾ (1949) は糖類は、耐凍性の増大するのと大凡並行的に、秋から冬に増大するが、厳寒期から春にかけてまだ耐凍性の大きい時に、著しい減少を示すので両者の間に、密接な関係は認められないと述べている。

Scarth and Levitt⁹⁾ (1936, 1937) は耐凍性と結合水、滲透圧の季節的变化を調べている。草本類でも木本類でも hardening の利くものでは、程度の差こそあれ実験的にも、自然状態に於ても、耐凍性の変化に並行して滲透圧の変化が起る。又実験した9種の植物中、耐凍性の最高のもが滲透圧に於ても、他の種類にかけはなれて高い値を示した。反対に hardening のきかない植物では、+5°C の状態に於ても、全然滲透圧をまさない。斯様に滲透圧の耐凍性に於て果す役割も逸する事が出来ないと述べている。

又植物細胞の水及び有機溶質に対する透過性は、その植物を hardening すると著しく上昇し、この両者は季節的経過に於ても並行して起る。リンゴの10品種に就て調べてみた所、透過性と耐凍性の高低は完全に一致しているのに対して、滲透圧と耐凍性の関係は両者程厳密には並行していなかつた。そして両者の相関関係が今迄多くの研究者達によつて見出されて来た他の種々なる因子に勝つて最も密接であり、水その他の物質、特に KNO_3 に対する透過性を測る事によつて、耐凍性を知る事も可能である。又透過性の変化が植物の耐凍性を高める役割は細胞内凍結を防ぐ点にあると述べている。

Siminovitch and Briggs⁹⁾ (1953) は木本類では自然状態で細胞内凍結を起す事はまれであるから、細胞内凍結を防ぐ要因よりも、細胞外凍結に対する抵抗性の方が木の全体の耐凍性に於て大きい役割を果しているので、この細胞外凍結に対する抵抗性、即ち脱水による細胞の傷害に対する抵抗性を調べた結果、原形質分離、乾燥による脱水の過程と、細胞外凍結による脱水の過程との間に本質的な差がない事を明にした。耐凍性が大きくなると共に、脱水に対する抵抗性も大きくなり、耐凍性の植物は又乾燥にも強く、原形質分離、乾燥による脱水抵抗性を測る事によつて、耐凍性の大きさを測る事も出来ると述べている。又耐凍性の変化と、水に可溶性の蛋白の量の変化との間に、関係がある事を述べている。以上の様に、木本類で多くの人によつて耐凍性の要因として、色々の生理的变化が調べられて来たが、現在の所精確なデータを集める段階と思われる。殊に桑については全く調べられていないので、耐凍性の変化について、細胞の生理的状态、即ち含水量、滲透圧、透過性、脱水抵抗がどの様に変るかを調べた結果を予報として報告する。

御指導を賜つた青木教授、朝比奈助教授に感謝する。

II.

材料は桑 (*Morus bombycis* Koidz.) の滝川 (品種名) を用いた。耐凍性の変化は1954年9月末から、1955年5月中旬迄の間に測定した。測定方法は枝条の中部を約20cmの長さに切つて、両端を濡れた脱脂綿で包み、ヴィニール布に包んで、色々の温度の恒温箱の中で凍結さ

せた。1日間凍結させた後、枝条の各側面の皮層柔細胞の縦断切片数個を切取つて、中性赤で染めてから、平衡塩溶液で全細胞が正常に原形質分離する最低温度を求めて、皮層柔細胞の凍結に耐えうる最低温度とした。−40°C以上の低温度は調べられなかつた。又凍結融解後1カ月間水挿してから、各組織の切片をとつて枝条の生死を調べた。細胞の滲透圧をきめるためにNaClとCaCl₂の等張溶液をそれぞれ9:1の溶積割合に含む平衡塩溶液を用いた。0.05 M濃度差を持つ各濃度系列の塩溶液の中に、一層の縦断切片を入れて、丁度原形質分離しない濃度を限界濃度とし、その時のモル濃度で相対的に滲透圧を現わした。

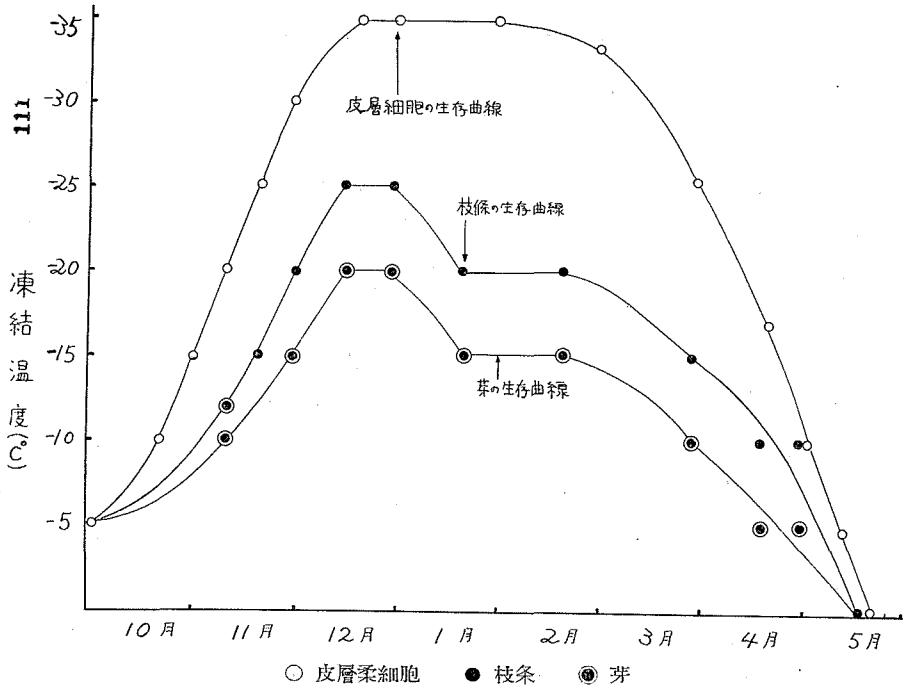
透過性はScarth²⁾(1934)の方法に従つて、皮層柔細胞の一層の縦断切片を、等張溶液の2倍の高張溶液中で原形質分離させてから、等張溶液の1/2の低張溶液中で原形質復帰をさせて回復に要する時間を測定した。平衡塩溶液はCa⁺⁺を含んでいるので、溶質が細胞内に滲透する事は防がれる。実験には死細胞を殆んど含んでいない、正常に原形質分離する一層の切片のみ用いた。冬期間は切片が正常である限り、切片内の全ての細胞は殆んど同時に復帰する。秋は復帰時間にかなりむらがあるので、切片内の細胞のだいたい70%が復帰する時間を復帰時間とみなした。顕微鏡は400×の倍率で測定を行つた。余りむらの多い切片は測定から除外した。長く高張溶液につけておいてから復帰させる場合は、透過性が可成り低下するので、切片は等張溶液に入れておいて、復帰させる前に高張溶液に入れる様にした。透過性は温度によつて異なるので、15°~17°Cの温度で測定した。透過性は復帰に要した時間の逆数で相対的にあらわした。

脱水抵抗はSiminovitch and Briggs⁶⁾(1953)が用いた原形質分離法で行つた。皮層柔細胞の切片を平衡塩溶液の1, 2, 3, 4, 5 Mの各濃度に、10分間入れてから、水道水に入れ、1 M平衡塩溶液で原形質分離させて、各切片の全細胞の中で生きている細胞の数の%を求めた。各切片は高張溶液に入れる前に、生体染色をしてみ、殆んど死細胞を含んでいない切片のみを用いた。又切片は皆一層の薄い切片を用いた。細胞層が2~3層ある切片を用いると、切片の中で生きている細胞の割合を調べる場合誤差が多くなるからである。脱水抵抗の差を更に明にするために、又高張溶液で10分間脱水してから、原形質分離させて切片の中の生きている細胞の割合を調べてから、更に各高張溶液に1分間入れてから、水道水にかえし、1 M溶液で再度原形質分離させ、切片の中で生き残つている細胞の数を調べた。1系列の実験には約20個の切片を調べその平均値を%であらわした。

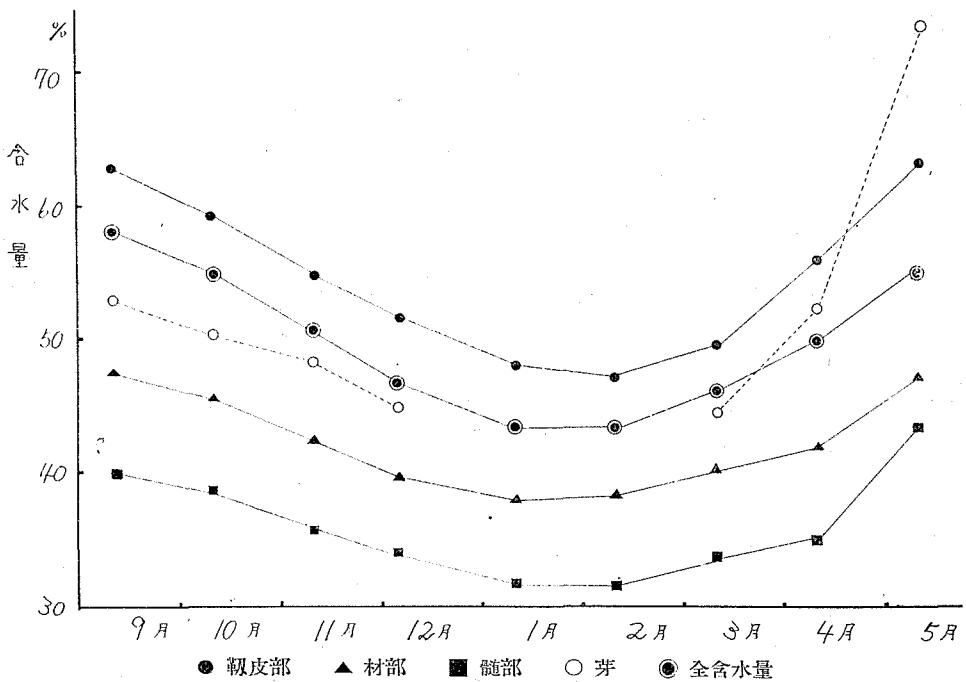
III.

耐凍性の季節的変化を第1図に示す。9月末頃は−5°Cで1日間の凍結に耐えうるに過ぎないが、10月下旬頃より氷点下の気温が続くにつれて、耐凍性*は急激に増大し、12月には皮層細胞は、−35°Cの凍結にも耐えうる様になる。枝条の耐え得る最低温度は冬期に於て皮層

* 以後枝条を24時間凍結した場合耐えうる最低温度を耐凍性と呼ぶ。



第1圖 皮層細胞, 枝条, 芽の耐凍性の季節的変化

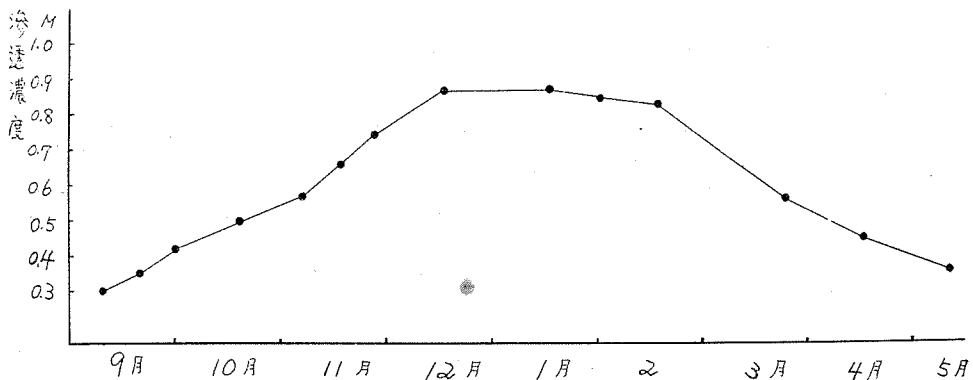


第2圖 枝条中部に於ける各組織の含水量の季節的変化

細胞より 10°C 以上小さく、12月でも -25°C に耐えうるに過ぎない。12月末より枝条は殆んど雪に埋もれてしまう。雪に埋もれてしまうと、耐凍性は 5°C 位低下する。雪に埋もれてしまうと、何故耐凍性が低下するか現在の所判らない。3月始めより耐凍性は低下し始め、雪が溶けさる3月末より急に低下し、発芽前の5月中旬になると -5°C で短時間の凍結にも枝条は死んでしまう。芽の耐凍性は枝条よりさらに 5°C 位低い。

枝条の中部について韌皮部、材部、髓部についてそれぞれ含水量の季節的変化を調べた結果を第2図に示す。滝川は早く発育が終了するので、9月22日には平均含水量は55%以下になつている。発育のおそい品種では、例えば清十郎では、この頃まだ80%位の含水量がある。滝川は8月中旬頃まだ発育中の時は、80%以上の含水量があるが、9月中旬発育が終つてくると共に、かなり急に減少し、以後1月頃まで漸次減少して、1~2月頃平均含水量は45%位、韌皮部では55%、材部では40%、髓部では35%位になる。従つて伸長期の含水量の半分近い値に減少する事になる。3月上旬頃より含水量は増加し始め、発芽前の5月末には平均含水量は60%位になつている。9月中旬平均気温が 20°C 以上あるのに、滝川の含水量は55%位に低下している。 $20^{\circ}\sim 30^{\circ}\text{C}$ の温室に栽培しておいても、発育が終れば含水量は55%位になる。かように含水量は発育の過程における枝条内の代謝的变化に強く支配されているもので、受動的に気温、地温のみによつて左右されるのではない。

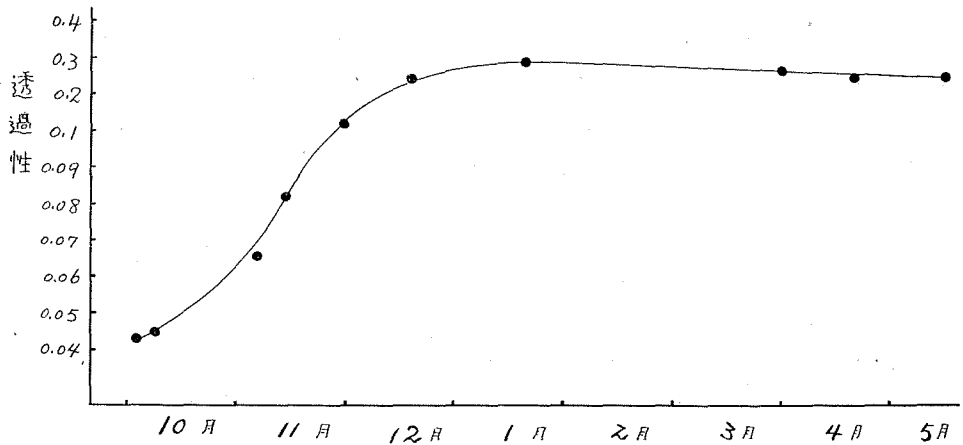
滲透濃度の季節的変化を第3図に示す。9月末 0.3 M に過ぎなかつたが、漸次濃度が高まつて12月には 0.9 M に高まり、冬期間その値を維持する。3月頃より濃度は低下し始め発芽頃には 0.35 M 位に低下する。冬期間桑の場合は品種間に滲透濃度の差はみられないで、最高の値に達するのに時間的な差があるだけである。皮層柔細胞の耐凍性もおよそ同傾向にある。両者が季節的に並行的に変化するとしても、現在のところ、滲透濃度の大きい事と、耐凍性の大きい事との間には、直接的関係が見出されていない。ポプラ、ヤナギは冬期枝条が -40°C で凍結後なお生存しているので、その皮層柔細胞は非常に低温度にも耐えうると思われるが、その滲透濃度は冬期に於て $0.6\sim 0.7\text{ M}$ に過ぎない。



第3圖 滲透濃度の季節的変化

昨年9月26日の颱風のために、桑の葉は著しい塩害を受けたので、それ以後落葉期まで同化作用は低下したと思われる。昨年度同じ材料で、冬期間1.0~1.1Mの滲透濃度を示していたが、今年は0.9Mであつた。滲透濃度に貯藏物質の量が関係すると思われるが、貯藏物質の量は枝条の皮層柔細胞丈でなく、髓周辺組織、髓線にも貯えられ、更に根、古茎にも貯えられる。更にこの貯藏物質は一定の場所に固定していないで、絶えず移動しているので、木全体に貯えられている同化物の量の中で枝条の皮層柔細胞の部分にどの割合で貯えられているかを知る事は困難である。現在のところ滲透濃度を左右している要因及び滲透濃度が耐凍性に於て果している役割は判つていない。

原形質復帰に要する時間の逆数で、相対的に透過性の値を示した結果を第4図に示す。10月始め頃は透過性は非常に小さいが、次第に増大して12月には、10月始めの6倍以上に増大する。然し発芽直前になつて、 -5°C での短時間の凍結にすら耐えられない程度に耐凍性が低

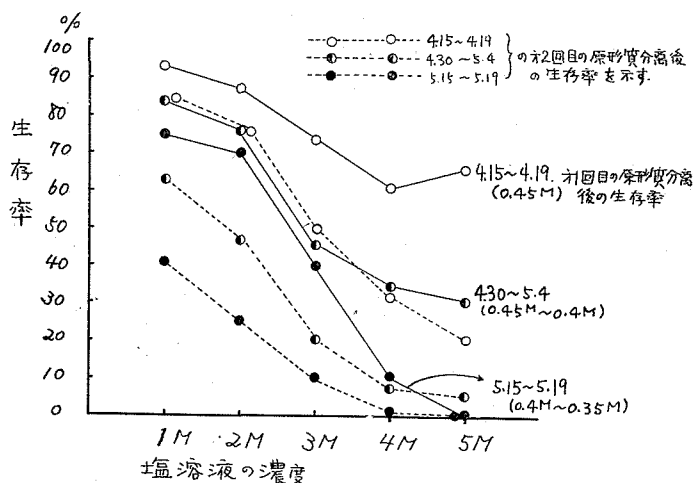


第4圖 透過性の季節的变化

下しても、透過性は依然として冬の値を維持している。昨年も1~5月末迄測定したが、結果は全く同じであつた。5月末に僅かに透過性が増加して測定値の変異が多くなつた程度である。然も5月末でも同一切片について連続5回分離と復帰を繰返しても、透過性の値は殆んど変わらない。従つて秋期は耐凍性の増大と、透過性の増大とが並行関係にあるが、冬から春の間は全く独立的な変化を示す。Scarth and Levitt²⁾(1936)は3月中旬から5月中旬に到る2カ月間に、原形質分離の復帰時間が2~3倍多くかかる様になり、冬から春にかけて、透過性が低下し出すと原形質の硬化が起きて原形質復帰の際に、屢々原形質の破裂が起る事を報告しているが、桑の場合にはかような破裂は全くみられない。桑は原形質復帰時間は秋では20~30秒、冬では3秒位で他の木本類と比較して透過性が著しく大きい。

5月15日皮層柔細胞の切片を顕微鏡の下で -7°C まで過冷却させてから植氷してどの程度細胞内凍結が起こるかどうかを三つの切片で調べてみたが、最初の切片では約10%の細胞

だけが細胞内凍結を起し、残りの細胞は細胞外凍結を起した。第2番目の切片では5% 丈、第3番目の切片では全く細胞内凍結を起さないで全部細胞外凍結を起した。かように発芽前のように耐凍性が小さい時でも、皮層細胞が細胞内凍結を起して死ぬ機会は少い。又茎は両端を濡れた脱脂綿で包んで冷やすので、低温度まで過冷却がすすんでから急激に凍結が起る事はないので、過冷却後の凍結に際して細胞内凍結を起す機会も少いと思われる。細胞内凍結を起さないためには、細胞の透過性と共に、原形質膜の氷の侵入を阻止する要因⁷⁾も重要な役割を演じている。皮層細胞の耐凍性を考える場合、細胞内凍結を防ぐ要因の外に、細胞外凍結即ち細胞からの水の脱水による2次的影響の害も考えなければならない。従つて透過性も細胞内凍結を防ぐ一つの要因ではあるが、透過性の値のみで、耐凍性全般を論ずる事は出来ない。



第5圖 各時期に於ける塩溶液の各濃度に於ける脱水抵抗性の変化

以上のように3月頃より耐凍性が著しく低下するのは、細胞外凍結に対する抵抗性が低下するためと思われるので、脱水に対する抵抗性を調べてみた。前に述べた様に、各高張溶液にて10分間形質分離させてから、その生存率を調べた結果を第5図に示す。操作や測定に非常に時間がかかるので、各濃度について20個の切片を同じ日に測定出来ないで、同一材料を使う事が出来なかつた。従つて同一時期でも材料によつて、滲透濃度が多少異つていた。又時期によつて漸次濃度が低下して行くので、同一の濃度の溶液で脱水しても、各時期によつて脱水の割合は等しくない。然し濃度の低下は、4月中旬と5月中旬の間に0.1~0.05 M位であつて濃度の減少に対する補正を考えても、4月中旬より4月下旬、5月中旬と脱水に対する抵抗性は少なくなつていく。第2回目の脱水は高張溶液に1分間入れておいたに過ぎないが、第1回目の時よりも生存率は著しく低下する。殊に液が濃くなる程その傾向は著しい。第2回目の場合は1分間入れておいただけであるから、細胞が脱水されて濃縮されたために、原形質が傷害を受けるというよりは、著しい濃度差で分離と復歸を繰返したことによる傷害と思われる。脱

水にたいする抵抗性と耐凍性とは共に減少して行くから、両者の間には何等かの関係があると思われる。高張溶液による脱水は急激であり、高濃度の塩類溶液を用いるために、塩類の害作用もあるし、又塩類が細胞表面に特に作用する傾向もあるが、脱水による細胞の濃縮という点に於ては、細胞外凍結による脱水作用と類似しているため、耐凍性の低下は細胞外凍結による脱水の抵抗性の低下と考えてもよい。然し実際細胞外凍結に対する抵抗性が低下しているかどうか、もつと精密な多くのデータを集めてみなければ判らない。

摘 要

桑を用いて耐凍性の季節的变化と、枝条各部の含水量、皮層細胞の滲透圧、透過性、及び脱水抵抗の変化を測定した。

10月終り頃より耐凍性は著しく増大し、12月から2月までの間、皮層細胞は少くとも -35°C の凍結に1日間耐え得るが3月頃より耐凍性は低下し、5月末の発芽頃には耐凍性は殆んどなくなる。

含水量は発育の過程に支配され、発育が終りに近づくにつれて著しく低下し、平均含水量は55%以下になる。更に発育終了頃より1~2月にかけて漸次減少し、3月頃より又増加し始める。

枝条の耐凍性と皮層細胞の滲透圧は9月末(0.3 M)より増加して12月に最高(0.9 M)に達するが、3月より減少し始め、発芽前には0.35 M位に低下する。耐凍性と滲透圧の間には、並行的関係がみられるが、現在の所両者の間に直接的関係があるかどうか判らない。

皮層細胞の透過性は、9月末頃より12月頃迄漸次増加して、その値は9月の約6倍に達するが、その後発芽時期になつても全く低下しない。従つてこの時期には耐凍性の低下に対して、透過性は第一義的の意義をもたない。

4月中旬から5月中旬にかけて、原形質分離の方法で細胞の脱水抵抗を測つたが、脱水抵抗は耐凍性の低下につれて低下するので両者の間に何等かの関係があるものと思われる。

文 献

- 1) Scarth, G. W. 1934 Estimation of protoplasmic permeability from plasmolytic tests. *Plant Physiol.*, **14**, 129.
- 2) Levitt, J. and G. W. Scarth 1936
 1. Osmotic and the seasonal cycle. *Canad. J. Res., C.*, **14**, 286.
 2. Permeability in relation to frost resistance and the seasonal cycle. *Canad. J. Res. C.*, **14**, 267.
- 3) Scarth, G. W. and J. Levitt 1937 The frost-hardening mechanism of plant cells. *Plant Physiol.*, **12**, 50.
- 4) Ivanov, S. M. 1939 Activity of growth processes — principal factor in frost resistance of citrus plant. *C. R. Acad. Sci. URSS.*, **22**, 277.
- 5) Siminovitch, D. and D. R. Briggs 1949 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust in relation to its frost hardiness. I. Seasonal variations in protein content. *Archiv. Biochem.*, **23**, 8.

- 6) Siminovitch, D. and D. R. Briggs 1953 III. The validity of plasmolysis and desiccation tests for determining the frost hardiness of bark tissue. *Plant Physiol.*, **28**, 15.
- 7) Chambers, R. and H. P. Hale 1932 The formation of ice in protoplasm. *Proc. Roy. Soc. London, B.* **110**, 336.
- 8) 朝比奈英三 1953 生物の凍結過程の分析 X. 卵細胞 (ウニ) の凍結過程. *低温科学*, **10**, 81.

Résumé

Seasonal changes in the frost-hardiness of twig, bud and cortical parenchym cells of mulberry tree were studied.

The frost-hardiness of these parts begins to increase from September when the weather becomes colder and attains to the highest value in December; that hardiness is retained till the end of the following February and begins to decrease in the beginning of March. The cortical parenchym cells are the hardiest among the tissue cells in twig; they can withstand freezing at -40°C for 24 hours at least in winter.

The seasonal change of water content of cortex, xylem and pith of twig is closely related to the growth stage of the twig, and that of the osmotic concentration of the parenchym cells also has an intimate correlation with their frost-hardiness.

The permeability to water of the parenchym cells sharply increases from September and reaches its maximum in December. Though the frost-hardiness very markedly decreases in May, the water permeability still retains its maximum value. Therefore, in spring, the permeability of the parenchym cells to water can not be used as indicating the degree of frost-hardiness. In spring, there is a clearly parallel correlation, in the cortical parenchym cells, between the dehydration resistance and the frost-hardiness.