



Title	木本類の枝条の生死の判定
Author(s)	酒井, 昭; SAKAI, Akira
Citation	低温科学. 生物篇, 13, 43-50
Issue Date	1955-12-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17577
Type	departmental bulletin paper
File Information	13_p43-50.pdf



木本類の枝條の生死の判定法* **

酒 井 昭

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和30年9月 受理)

I

木本類の耐凍性について、色々の研究をする場合、枝條がどの程度の耐凍性を有しているかを知る事が何より必要である。

又枝條を適当な条件で凍結させてから、枝條の生死を判定する事が出来るならば、直接的に品種間の耐凍性を測る事が出来る。従来は温室で又は野外で越冬後、発芽するのをまつて枝條の生死を判定するか、又は枝條を一定期間水挿して、液の溷濁度、枝の browning の現象によつて、或いは皮層柔細胞の生体染色、原形質分離の方法で皮層柔細胞の生死をきめて、間接的に枝條の生死を判定していた。発芽によつて生死を判定する場合、木の種類によつては、芽が死んでいて発芽しなくても、枝條が生きている事もあるし、逆にある程度正常に発芽伸長してから、枝條が損傷を受けているために、伸長した芽も途中で枯れてくる事もある。又休眠中の場合はたとえ高温状態においても、発芽しないから、長期冷蔵して、休眠を破らなければならぬ。木の種類によつては browning しにくいものもある。

初秋における様に他の組織よりも皮層柔細胞の耐凍性が弱い場合は、皮層柔細胞の生死から枝條の生死を判定する事が出来るが、冬期には皮層柔細胞は他の組織よりも耐凍性が大きいので、皮層柔細胞の生死からのみで枝條の生死を判定する事は危険である。春、初秋の耐凍性の小さい場合には、水挿しても短期間に生死の判定が出来るが、冬期の耐凍性の大きい場合は1カ月近く水挿しておいても、仲々判定しにくい場合もある。

Dexter¹⁾ (1932), Ivanov²⁾ (1931) は小麦の品種間の耐凍性を判定するのに、一定温度で凍結させて、根冠部、葉の一部をとつて、再蒸溜水中で exosmosis させて、その電気伝導度を測つた。そして傷害の大きさと電気伝導度の間に比例関係のある事を見出した。然し両者の間に比例関係があるとしても、それ丈では、生死の判定は出来ない。少しの材料で、短期間に結果が判る枝條の生死の判定法を見出す目的で主として凍結後、組織からの浸出液の電気抵抗の値と枝條の生死との関係を確める実験を行つた。又組織培養による判定もこれと平行して試みた。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1300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。

II

実験材料としてはクワ (*Morus bombycis* Koidz.) を主として用いた。ポプラ (*Populus Sieboldi* Mig.) コリヤナギ (*Salix koriyanagi* Kimura) バラ (*R. multi flora* Thunb.) を参考材料に使った。枝条の 0.6 cm の太さの部分に 1.5 cm の長さに切つて、5 cc の再蒸溜水を入れた 4 分試験管の中に入れて、ゴム栓をほどこしてから、汚染を防ぐために 0°C の冷蔵庫の中に入れて浸出させ、48 時間後液を取り出して、25°C の恒温槽で、浸出液の電気抵抗を測つた。極板 (1 cm²) には白金黒をほどこした白金板を用い、極板の距離は 0.5 cm に保ち、Kohlrusch bridge 法で測定した。他の条件が同じである時、枝より浸出する量は枝条の直径によつて異なるから、実験に於ては約 0.6 cm の太さの茎の部分を選んで用いた。組織培養の方法は予め昇汞アルコールにて茎の表面を消毒して、滅菌蒸溜水にてよく洗つてから表皮を取去つて滅菌箱の中にて茎を 0.5 cm 位の長さに切つて培養基に植付けた。消毒液は時として昇汞アルコールの外に、アンチホルミン (NaClO) 及びサラシコを用いた。20°C の恒温箱に入れて培養すると、茎の切口或いは皮をはいだ所に、写真第 1, 2, 3 図に示す様なカルス状の細胞の増殖がみられる。培養後 3 週間後にカルスの形成状態を調べた。培養基の構成物質中無機塩は knop の培養基を少しく改変して用いた。補助塩は Berthelot⁽¹⁾ (1934) の処方を用いた。有機物質としてチアミン 1 mg/l, インドール醋酸 10⁻⁷ g/l, 塩酸システイン 10 mg/l, 蔗糖 30 g/l を含み、pH を 6.0 に調製した寒天培養基を用いた。

III.

11 月から 5 月中旬にかけて、約 20 回実験したがその中の 1 月 27 日の五郎治早生の結果についてのべる。過冷却が早く破れる様に切りとつた約 20 cm の枝の両端に濡れた脱脂綿をつけたままヴィニール布で枝を包み -10°, -15°, -20°, -25°, -40°C の恒温箱の中で 1 日間凍結させた。凍結融解後、枝の生死を判定する為に室温においた対照と共に茎の 0.6 cm の太さの部位について前記の方法で浸出液を作つて、その電気抵抗を測つた。融解後茎の一部をとつて組織培養し、又各組織について原形質分離の有無を調べた。残る枝は 50 cc コルベンに 20 cc の再蒸溜水を入れて、2 週間水挿した後水挿液の溷濁度、電気抵抗を測つた。なお枝の発芽状態、各組織の browning の度合、及び各組織の生死を検鏡するために、凍結後 1 カ月間水挿の状態に保つた。

写真第 4 図に示す様に -40°C で凍結した後でも皮層柔細胞は完全に原形質分離をする。節部の細胞も形成層の細胞も殆んど正常であるが、枝条は -40°C での凍結に耐え得ない。従つて皮層柔細胞の原形質分離の方法だけでは枝条の生死の判定は出来ない。又凍結後 1 週間位の間では browning の現象は明らかでない。殊にクワはポプラ、ヤナギ、バラ科のものと異なつて browning しにくいので、browning による判定は困難である。

浸出液の電気抵抗の測定結果を第1表に示す。凍結温度が低くなるにつれて、電気抵抗の値は減少する。即ち傷害が多くなるほど、組織よりの電解質性の浸出物の量が多くなる。凍結融解後の原形質分離を調べた場合と異なつて、凍結温度の低くなるにつれて電気抵抗が著しく減少しているが、これからだけでは枝条の生死は判定出来ない。この方法で茎の生死が判定出来るためには、電気抵抗がどの値の時、又どの範囲にある時、茎が生きているかについて、の、電気抵抗の値に対する具体的裏付が必要である。

組織培養の結果、形成されたカルスの量を(卍), (卅),

(+), (一)の4つの等級に分類した。写真第5図に示す様に対照(卍), -15°C (卍), -20°C (卍)の間には差がみられない。 -25°C (卅 \sim +)は対照と比べて、カルスの形成は少ない。 -40°C (一)はカルスの形成はみられない。1カ月間の水挿の結果、 -20°C 以上で凍結しても枝条は生きているが、 -20°C 以下の場合には死んでしまう。なお写真第6図は5月3日に滝川で行つた結果で -5°C (卍), -10°C (卍)の間には殆んど差がない。 -15°C (卅)は対照より少なく、 -20°C (一)はカルスの形成がない。写真第6図の場合に於ける他のデータは第1図に示してあるが、 -10°C 以上は枝条が生存しているが -15°C 以下は死んでいる。かようにカルスの形成量は凍結温度によつて異なつている。カルスの形成は勿論形成層細胞の分裂増殖によつて形成されるから、その形成量が多いのは、形成層の生理的状態が正常である事を示している。然し形成層の切片のみを培養しているのではないから、形成層のカルス形成は、形成層の生理的状態に主として左右されるのであるが、二次的に他の組織部位の損傷の影響も受けて、いろいろ変つてくるものと思われる。

形成層が活動状態にある時は、材の表面で形成層が韌皮部と共に剥皮出来るから、剥皮した韌皮部だけを培養すれば形成層は、材部の影響を受けない事になるが、冬期は剥皮が出来ない。形成層が他の組織と比べて一番弱い組織であるならば、この培養法は枝条の生死の判定にきわめて有効である。Potter⁹⁾(1938)は冬期間に於ては、形成層は他の組織より弱くないと報告しているが、これについては今後いろいろの方法で調べてみる必要がある。然し冬期間形成層が他の組織部位より弱くないとしても、この方法で培養した場合には、他のより弱い組織部位の影響が形成層の分裂増殖に影響を及ぼすと思われるから、この培養方法でもある程度枝条の生死を判定出来る。

約 10°C の室温で2週間水挿しをしてから、その液の濁度及び電気抵抗の値を測つた結果を第2表に示した。凍結によつて損傷した枝よりの浸出物が多いので、早く汚染して濁ってくる。 -25°C では僅かに濁り -40°C では著しく濁る。又電気抵抗は -25°C 以下では急に減少する。なお水挿液のpHをガラスpHメーターで測つたが、電気抵抗の様な急激な変化はみら

第1表 凍結温度による浸出液の電気抵抗の比較

凍結温度 ($^{\circ}\text{C}$)	浸出液の電気抵抗 (Ω)
対 照	8400
-10°	7200
-15°	6200
-20°	3400
-25°	2550
-30°	1640
-40°	1160

第2表 各温度にて凍結した枝条の
水挿液の状態

凍結温度	水挿液の 白濁度	水挿液の 電気抵抗 (Ω)	水挿液の (pH)
対 照	—	14000	6.91
-10°	—	13500	6.81
-15°	—	13000	6.65
-20°	—	10500	6.49
-25°	+	5300	6.33
-40°	++	3250	6.58

20°C より高い温度で凍結させた枝条は生きていますと考えられる。-25°C の場合は芽は死んでいるが、枝条の生死は未だ判定出来ない。

水挿しておいてから1カ月後、枝条の各部分の変色度合を調べ、又生体染色、原形質分離の方法で各組織の生死を調べてみた。-10°C, -15°C, -20°C, で凍結した枝では髓冠部、材部、韌皮部には変化はなく、皮層柔細胞も正常に原形質分離した。従つて之等はいずれも生存している。-25°C の温度で凍結した枝は切断してみると、髓は白色であるが髓冠部の緑色部は変色して黄褐色のリングをなしている。材部も又黄褐色を呈していた。材の周辺部、即ち形成層との境界部は濃い褐色のリングをなしていた。然し韌皮部は外観異常が認められなかつた。室温に1カ月水挿にしておいたため、韌皮部は材の周辺部から簡単に剥皮出来る。皮をむいた場合、形成層は剥皮された韌皮部の裏面にあるが、変色していないで白色であつたし、原形質分離を調べてみたが少なくとも半数は分離する。皮層柔細胞は皆正常に原形質分離する。木質部の表面はうすい黄褐色を呈しているが、材の表面より少し内部の方が、より濃い褐色を呈していた。又材部の傷害がより少ない場合には、剥皮すると材の表面も白色であるが、材の内部が黄褐色を呈している場合がある。材部及び髓冠部の横断切片と縦断切片を調べてみたところ、髓周辺組織と髓線の細胞は皆死んで黒変していた。写真第7図は正常な髓冠部及び材部を示した。写真の第8図は-25°C に凍結後1カ月水挿した後の横断面で髓冠部、髓線の browning を示している。写真第9図及び第10図は同じ材料の材部の縦断切片で髓線の黒変を示している。材部の中で黒変しているのは髓線のみで、一見材が変色してみえるのは髓線が黒変しているためである。-40°C に凍結した枝条は髓も、材も様に黄褐色を呈し、材部の表面に濃い褐色のリングがみられる。剥皮した場合、材の表面も既に褐色を呈し、著しい臭気がある。

髓に発育が終つた枝では、髓の中に生きた細胞は存在しない。そしてその髓の比重は0.1位で、内容物を含んでいない細胞膜が存在するだけである。従つて髓部の変色は髓周辺組織の browning によつて生じた色素が髓に移動したために変色したものであろう。韌皮部もかなり変色している。皮層細胞は殆んど原形質分離をしない。分離するものでも皆異常な分離形を示

れなかつた。

水挿して枝条の発芽状況を調べたが、-20°C 以上の温度で凍結した枝は、すべて発芽したが、-25°C 以下で凍結した場合は発芽しなかつた。又芽を縦断して調べたが、変色して死んでいた。

著者⁹⁾(1955) はクワについて枝の耐凍性と芽の耐凍性の季節的变化を調べたが、枝条の方が芽よりも5°C位*耐凍性が大きい。従つて-

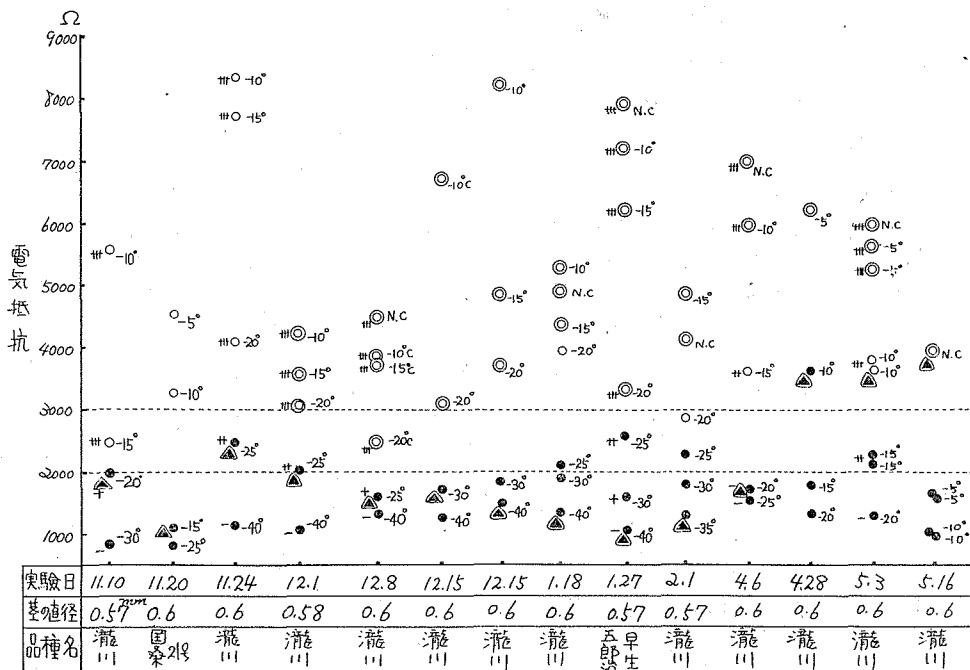
* 以後耐凍性とは、24時間凍結後枝条の生存している最低温度を意味する。

第3表 各温度にて凍結した枝条の調査結果の一覧表

凍結温度 (°C)	浸出液の電気抵抗 (Ω)	カルスの形成量	水挿液の電気抵抗 (Ω)	発芽	材部の変色	皮層細胞の原形質分離 (凍結1ヶ月後に於ける)
対照	8400	+++	14000	+	-	+
-10°	7200	+++	13500	+	-	+
-15°	6200	+++	13000	+	-	+
-20°	3400	+++	10500	+	-	+
-25°	2550	++	5300	-	+	+
-30°	1640	+	-	-	+	-
-40°	1160	+	3250	-	++	-

している。-25°Cに凍結した枝条でもより長く水挿しておく、漸次韌皮部も死んでいく。従つて-25°C, -40°Cに凍結した枝条は死んでいるとみなされる。以上の結果を第3表に整理して示した。

以上の様に髓周辺組織、髓線の細胞の方が形成層や韌皮部の細胞よりも耐凍性が少ない。そして凍死した髓周辺組織、髓線はbrowningして材は黄褐色に変色して行く。この材部の変化が形成層、韌皮部に二次的に悪い影響を及ぼす結果、韌皮部も漸次死んで行くものと思われる。11月10日より5月6日迄の間に同様の方法で20回測定した。図に記載する関係上、主なもの12例を一覧出来るように第1図に示した。生死の判定は上記の様に1カ月間水挿してか



第1図 浸出液の電気抵抗の値と枝条の生死の関係

○枝条の生 ●枝条の死 ⊙発芽 ▲皮層細胞の100%生存 ++ +-はカルスの形成量を示す

ら判定した。図中の●の記号は枝条の死を、○は生を、◎は発芽を、△は皮層柔細胞が100%原形質分離する最低温度を示している。枝条はいずれも約0.6 cmの太さの部位を用いた。又カールの形成量も等級にて示した。図から明らかな様に、用いた条件では電気抵抗が2000 Ω以下の場合には例外なく死んでいる。3000 Ω以上の場合は殆んど生存している。4月28日の実験例で-10°Cに凍結した枝条が3500 Ωの値を示しているが、後に死んだ。4月下旬になると、木は活動を始め組織の条件も急に変り、耐凍性も弱まってくるので、4月下旬以降は抵抗が3000 Ωを越しても、例外がでる様になるのかもしれない。然し抵抗が2000 Ω以下の場合には発芽前でも例外なく皆死んでいる。従つてクワでは0.6 cm位の太さの枝条で抵抗が2000 Ω以下の場合には例外なく死んでいるとみなす事が出来る。抵抗が2000~3000 Ωの間にある時は、限界範囲であるから電気抵抗の方法だけでは生死が判定出来ない。第1図から明らかな様に電気抵抗が2000 Ω以下で枝条はやがて死ぬ場合でも、融解後の皮層柔細胞は正常に原形質分離する場合が多い。したがつて初秋、春の様に耐凍性の小さい時には、融解後の皮層柔細胞の原形質分離の方法でも、かなりの程度に枝条の生死を判定できるが、耐凍性の大きい時には、融解後、又は1ヵ月後に於ても、皮層柔細胞の原形質分離の方法だけで枝条の生死を判定する事は危険である。

電気抵抗が2000 Ω以下の場合には、培養した場合のカールの形成も(++)以下である。3000 Ω以上の場合にはカールの形成量も殆んど(+++)で、多くの場合発芽している。

2週間水挿した液の電気抵抗の値は、ある凍結温度以下では、多くの場合に急に小さくなる傾向がみられる。これも判定の一つの指標にはなるが、室温に長く放置しておくので、汚染のため不確実で、判定の基準にはなりがたい。濁濁度についても同様である。

発芽による枝条の生死の判定について述べる。ヤナギ、ポプラ、ノバラは芽の方が枝条よりも耐凍性が大きいので、材部、髓部がbrowningしていても、かなり発芽伸長してから、新梢がかれてくる場合が多い。ヤナギ、ポプラ、殊にヤナギは水挿しておく時殆んど発根する。枝条が完全に生きている場合は皆発根するので、発根が枝条の生死の一番良い指標になる。発芽しても発根しない場合は、髓冠部、髓線がやられている場合が多い。発根する際の根のアンラーゲは髓線と形成層との交叉部に出来る事から考えても之は当然である。

凍結後茎を蒸留水で浸出する場合、浸出は茎の切断面より行われる。表面は厚いコルク層におおわれているので、茎の表面よりの浸出は考えられない。限界温度で凍結させた場合、韌皮部は損傷を受ける事が少ないが、材部は著しい損傷を受けるので、この材部の損傷が茎の浸出量に大きな関係をもつものと思われる。どこから、何が浸出するかは現在の所判らない。然しながら、これらの事実によつて、ある程度浸出液の電気抵抗の値に対する裏付けが出来た。従つて凍結後の茎の浸出液の電気抵抗をはかる方法は、少しの材料で、然も短期間に枝条の生死を推定出来る利点がある。

クワの材料について御便宜をいただいた北大農学部養蚕教室越山、玉沢氏及び農林省蚕糸

試験場浜田桑樹部長, 相田技官, 同福島支場長杉山氏に感謝する。

摘 要

冬期間耐凍性の大きい枝条が, 凍結によつて枯れる場合, 髓冠部と材の周辺部近くに褐色のリングが現われ, 材部も漸次黄褐色に変化して行く。之は髓冠部及び髓線の細胞が死んで, browning したため起るのである。そしてこの材部の傷害の影響が二次的に韌皮部に波及して韌皮部の細胞もやがて死んで了う。又凍結融解後莖を組織培養した所, 枝条が正常である限り凍結しても形成層のカルス形成量は変わらないが, 枝が傷害を受けていると, カルスの増殖量は低下する。枝条を各温度で凍結後 1.5 cm に切つて再蒸溜水にて 0°C にて 2 日間浸出してから, 浸出液の電気抵抗を測定した。浸出液の電気抵抗が 2000 Ω 以下の場合, 枝条は例外なく死んでいるが, 3000 Ω 以上の場合には生存しているとみなされる。2000~3000 Ω の範囲は限界温度でこの方法のみでは枝条の生死は決定出来ない。太ささえ同一であれば, 品種が異なつてもこの方法は使用出来るし, 少しの材料で短期間に枝条の生死が推定出来るから便利である。

文 献

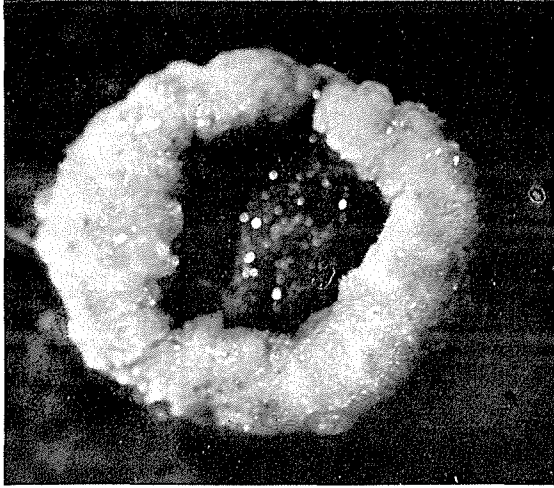
- 1) Dexter, S. T., W. E. Tottingham, and L. F. Graber 1932 Investigations of the hardiness of Plants by measurement of electrical conductivity. *Plant Physiol.*, **7**, 63.
- 2) Ivanov, S. M. 1931 Opređenje morozoustoitivosti rastenii po izmeneniiu erektroprovodnosti if soka pri povregdenii morozom. *Bul. Appl. Bot. Genet. and Plant Breed.*, **27**, 283.
- 3) Berthelot, M. A. 1934 Nouvelles remarques d'ordre chimique sur le choix des milieux du culture naturels et sur la manière de formuler les milieux synthétiques. *Sciété de Chimie Biologique*, **16**, 1553.
- 4) Potter, G. F. 1938 Low temperature effects on woody plants. *Amer. Soc. Hortic. Sci.*, **36**, 185.
- 5) 酒井昭 1955 桑の耐凍性及び皮層細胞の生理的状態の季節的变化. *低温科学, 生物篇*, **13**.

Résumé

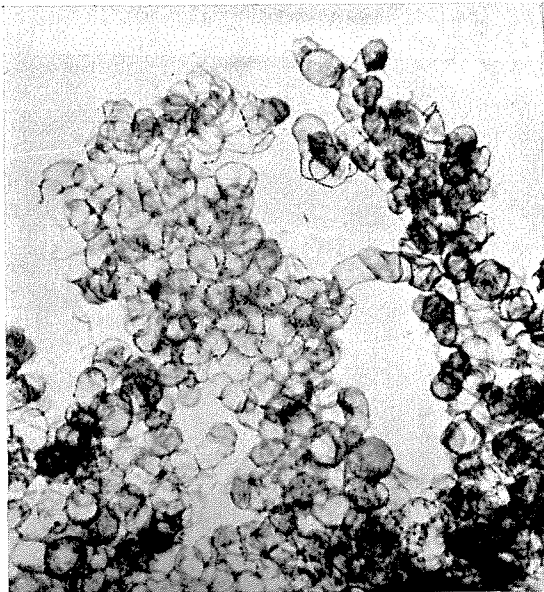
In the case of freezing injury to tree twigs in winter, browning which is a sign of the frost injury, first appears as a brown ring at the peripheral layer of the xylem and at the pith peripheral tissue on the cross section of the twig; then browning gradually extends to the whole extent of the xylem and pith parts. Though the cortical tissue is more resistant than xylem tissue, the former is influenced by the injury of the latter suffered from previous freezing, and becomes gradually damaged. Consequently, that the freezing injury of the twig is judged only by the survival of the cortical tissue cells just after thawing may lead to an error of judgement.

In the culture of a twig piece which has been previously frozen, the amount of callus tissue regenerating at a cut end decreases with increase in the degree of the frost injury.

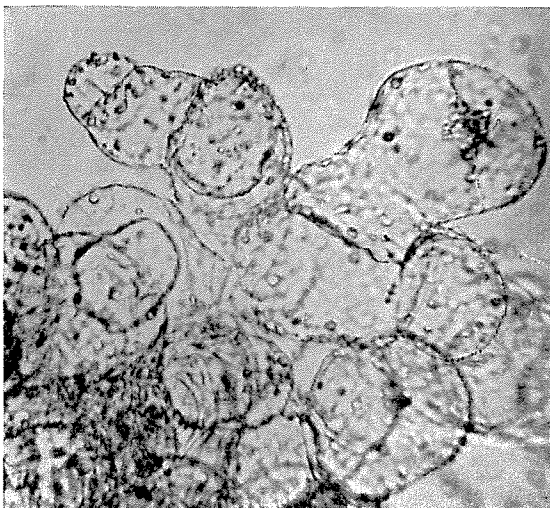
When the electrical resistance of the water extract from a twig piece of a definite size, previously frozen, gives values more than 3000 Ω under the experimental conditions, the twig piece is alive, and when the values are less than 2000 Ω , without exceptions it is injured. As long as twigs with an equal diameter are used, the electrical resistance method is useful in testing the survival of twig in a short time and moreover, with small samples.



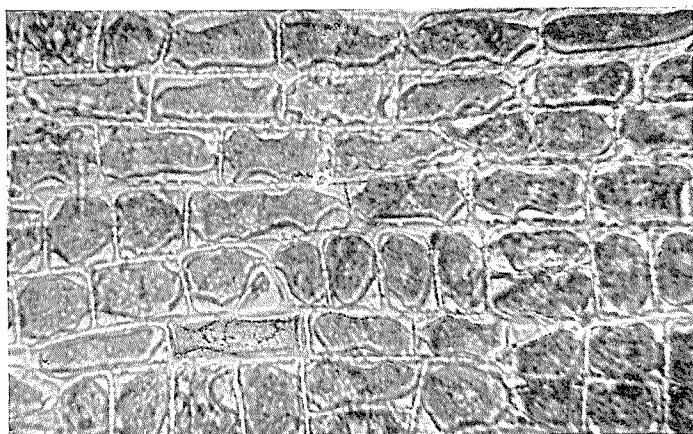
第 1 圖 桑の形成層の培養 (1ヶ月後)
乳頭状のカルスの形成がみられる。
× 6.5



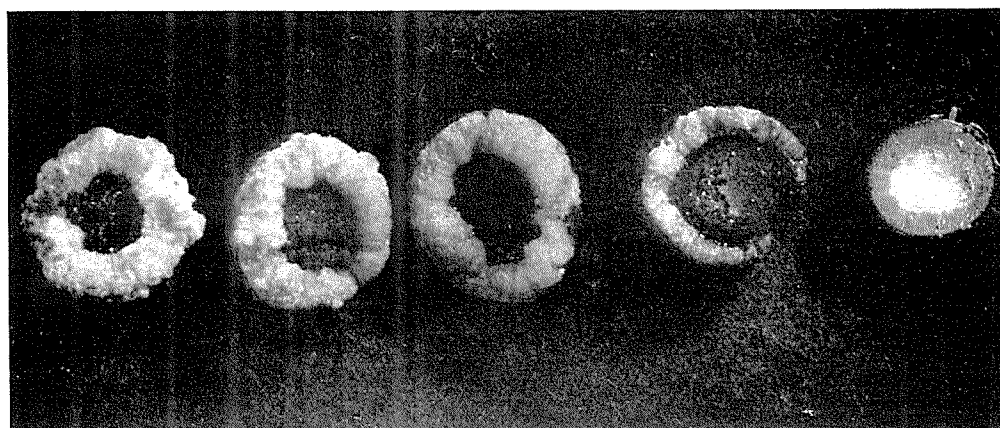
第 2 圖 同上のカルスの一部の拡大図
糸状体の構造がみられる。
× 100



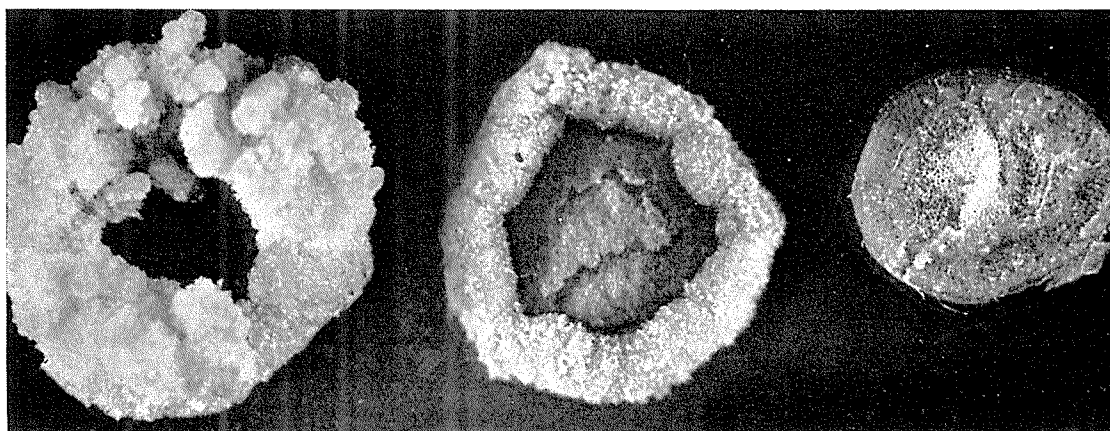
第 3 圖 同上拡大図
× 350



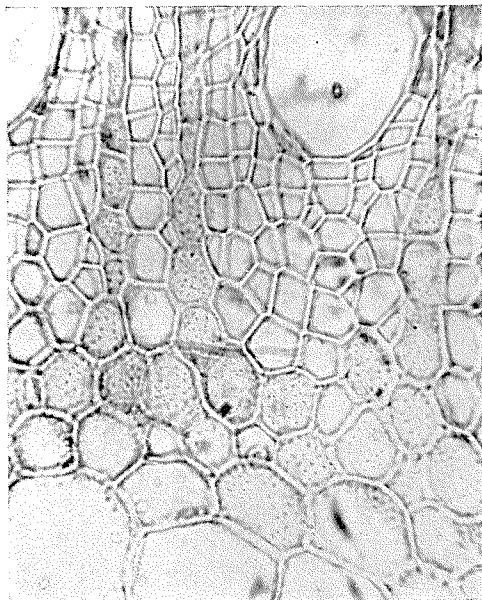
第4圖 -40°Cにて24時間凍結後の皮層細胞の1.5M平衡塩溶液による原形質分離 ×350



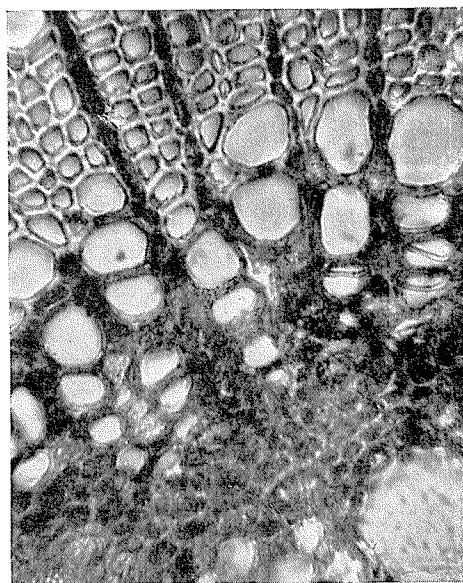
第5圖 各温度にて凍結後のカルスの形成の比較 (20日間培養)
左から対照 -15°C, -20°C, -25°C, -40°C. ×3 (1月27日)



第6圖 各温度にて凍結後のカルスの比較
左から -10°C, -15°C, -20°C. ×6.5 (5月3日)



第 7 圖 クワの材部及び髓周辺組織に於ける茎の横断面 × 350



第 8 圖 -25°C にて凍結 1 ヶ月後の材部及び髓周辺組織に於ける茎の横断面。第 7 図と比較して髓周辺組織及び髓線の browning が明らかである。× 350



第 9 圖 同材部の縦断面。髓線の browning が明らかである。× 100



第 10 圖 同拡大。髓線のみが変色している。× 350