



Title	植物における耐凍性増大と外圍温度
Author(s)	酒井, 昭; SAKAI, Akira
Citation	低温科學. 生物篇, 14, 7-15
Issue Date	1956-11-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17581
Type	departmental bulletin paper
File Information	14_p7-15.pdf



植物における耐凍性増大と外圍温度*

酒 井 昭

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和31年7月受理)

I.

植物は秋から冬にかけて著しく耐凍性を増大する。又耐凍性の植物は人工的に低温処理すると、その耐凍性を増大する。然し少なくとも、落葉木本類では、成長がとまつて成熟の状態に入らないとたとえ低温処理をしても耐凍性はまさない¹⁾。現在の所、耐凍性が増大するのに必要な内的条件は判っていないが、とにかく内的条件の備わっている枝に対して、どのような外圍温度が作用したら、効果的に耐凍性をます事が出来るであろうか。人工的 hardening の方法を用いて、木本類に対する外圍の温度の究明を試みた論文は極めて少ない。

Harvey²⁾ (1930) はエルムの実生を用いて実験した。その結果は 20°, 10°, 0°C の各温度に 5 日間さらしてから、-5°C で 1 日間凍らせて hardening の効果を比較すると、20°C では hardening 効果がなく、10°C では効果が不十分で、5°C と 0°C では確かに効果がある。又 1 日のうちで、12, 8, 4, 2 時間毎に温度を 0°C と 20°C と交代させて 5 日間温度処理すると、0°C に連続 5 日間おくよりも若干効果的である。然し 0°C と 20°C の間を 1 時間、或はそれ以内の時間で交代させた場合は、0°C と 20°C との平均の温度、即ち 10°C に連続的にさらした効果に等しくなつて hardening 効果はかえつて減少するという。又 Ivanov³⁾ (1938) はミカン類の人工的 hardening の研究で、hardening 処理は第一段階では 0°~2°C で行い、第二段階として 0°C ~ -2°C で処理すると効果が大きいことを報告している。之等の報告や他のいろいろな人工的 hardening の研究はいずれも鉢植で行われている。

Pisek⁴⁾ (1951) はいろいろの常緑樹の枝を用いて、水挿で人工的 hardening を行つているが、これは鉢植に較るべしと便利であるが、水挿では短い枝についても、また氷点下の hardening も行う事が出来ない。また水挿にすると枝条が吸水するので枝条の条件が変るおそれがある。

自然条件では、木本類が耐凍性を著しくますますようになるのは、気温が氷点下になるようになってからであるが、従来人工的 hardening の温度は 0°~5°C であり、loanov を除いては氷点下の温度での hardening 処理は殆んど行われていない。この点を確めるために零度以下の

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 348 号

低温処理でクワの耐凍性がどの程度人工的に増強されるものであるか、さらに人工的に耐凍性が強められたばあい皮層柔細胞にどのような生理的変化が起るかという問題をとり上げて実験を行った。

II.

材料は桑 (*Morus Bombycis* Koidz.) のタキノカワとケンモチの両品種を用いた。実験期間は9月中旬以降である。その時期にはまだ桑は葉がついているので、葉をとりさつて実験を行った。落葉は10月下旬であった。同一実験には出来るだけ同一枝条を用い、直径約0.6 cmの太さの部分を用いた。その部分を長さ1.5 cmに切つて、両端にワセリンをつけ、その小片をヴィニール布につつんで、所定温度の恒温箱に入れ低温処理を行った。したがつて低温処理はすべて暗黒中で行われたことになる。低温処理後、一定の低温度で1日間凍結させてから、皮層組織から少なくとも15個のうすい縦断切片を切り取り、中性赤で染めた後、高張平衡塩溶液中で原形質分離させて、生存している細胞の割合を調べた。本実験では皮層柔細胞を対象としていて枝条全体の耐凍性の増大は特殊の場合を除いては調べていない。然し皮層柔細胞は他の組織の細胞よりも敏感に外圍温度に反応して耐凍性の大きさを変化させるから、hardeningの効果を知るには、皮層柔細胞の変化を調べるだけでもよい。枝条をヴィニール布で包んだ場合と、水挿にしてhardeningした場合と、どちらの方がhardening効果が大きいかを予備的に調べた。実験を行った10月初旬の枝条では両者の間に差がみられなかつた。hardeningの変化に伴う皮層柔細胞の生理的変化はここでは滲透圧と脱水抵抗の変化のみにとどめた。脱水抵抗の測定方法⁵⁾は皮層柔細胞の切片を高調液に10分間入れてから、水道水に入れ更に高調液に入れ、再び水道水にかえして、等調の2倍の高調液で原形質分離をさせる。それから細胞の生存率を調べて脱水抵抗の強さをきめた。又ヨード、ヨードカリ溶液で皮層組織の澱粉量の変化もしらべた。

III.

9月18日にタキノカワを用いて12日間hardeningを行つて、耐凍性がどのようにますかを調べた。第1表に示すように、対照と較べて著しく耐凍性を増している。即ち対照は -10°C で6時間の凍結後、20%位の細胞が生きているにすぎないが、hardeningした方は

第1表 0°C で12日間hardeningした場合の耐凍性の増大

実験の時期：9月18日～9月30日 品 種：タキノカワ

表中の数字は皮層柔細胞の生存率を示す

	凍 結 条 件			滲透濃度
	-10°C (6時間)	-10°C (24時間)	-20°C (6時間)	
対 照 (%)	20	0	0	0.4 Mol.
低温処理 (%)	100	100	50	0.6 Mol.

−20°Cで6時間の凍結後でも約半数の細胞が生きている。なおその場合、無処理の細胞の滲透濃度は0.4 M、低温処理した方は0.6 Mと0.2 M増加していた。

実験1. 枝条をヴィニール布に包んで、15°, 10°, 5°, 0°Cの各温度でそれぞれ5日間、10日間、20日間処理を行つてから耐凍性の変化を調べた。即ち各温度処理を行つた枝条から、1.5 cmの長さの小片を3つ作つて、それらを−10°, −15°, −20°Cの各温度で1日間凍結させてから、原形質分離法によつて皮層柔細胞の生存率を調べて、耐凍性の増大の度を求めた。実験は10月6日タキノカワで行つた。結果は第2表に示してある。

第2表 耐凍性増大に及ぼす hardening 温度の影響

hardening の期間：10月6日～10月26日 品 種：タキノカワ
表中の数字は各温度で、5, 10, 20日間 hardening 後耐凍性の変化を調べるためにそれぞれ−10°, −15°, −20°Cの温度で1日間凍結した場合の皮層柔細胞の生存率(%)を示す。本実験に於いては15°Cを対照としている。

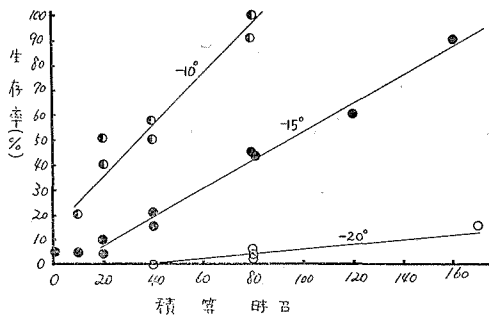
品 種	タ キ ノ カ ワ												ケンモチ	
hardening の 温 度 (°C)	15			10			5			0			0	
凍 結 温 度 (°C)	hardening の 期 間 (日)													
	5	10	20	5	10	20	5	10	20	5	10	20	10	20
− 10	5	10	15	10	15	40	30	50	90	100	100	100	20	20
− 15	0	0	5	0	5	10	5	10	35	65	100	100	0	0
− 20	0	0	0	0	0	0	0	0	10	15	25	70	0	0

15°Cで5日間、20日間処理しても、耐凍性は変わらず、10°Cで5日間及び10日間処理しても耐凍性は殆んど変わらないが、10°Cで20日間温度処理すると約40%の細胞が−10°Cでの1日間の凍結に耐えられるようになる。然し10°Cで20日間温度処理しても−15°Cでの1日間の凍結には殆んど耐えられない。従つて10°Cでの hardening 効果は20日間後においてわずかにあらわれる程度である。5°Cで10日間処理をした場合は−10°Cでの凍結に約半数の細胞が生存しているため、ある程度効果があらわれている。20日間処理のものでは殆んど全細胞が生存している。然し−15°Cでの凍結では5日間、10日間おいても変化がみられないが、20日間処理した場合には、ある程度効果があらわれている。従つて5°Cでの温度処理では、20日間処理しても、−15°Cでの凍結に対して、ある程度耐えられるようになるにすぎない。0°Cで温度処理した場合は5日間の短期間でも−10°Cには勿論−15°Cでの凍結にも可成り耐えられるようになる。10日間処理すると−15°Cでの凍結には完全に耐えられるようになる。−20°Cでの凍結に対しては20日間処理して初めて効果があらわれる。従つて0°Cで hardening した場合は5°Cの場合に較べて短期間で著しい効果があらわれる。なお参考のためにケンモチを0°Cで同一条件で10日間、20日間温度処理をしたが、タキノカワと違つて20日間後でさえも、−10°Cでの凍結に殆んど耐えられない。ケンモチはタキノカワと違つて、耐凍性を増しうる内的条件がまだ出来ていないと思われる。上記の実験において、各温度で10日間

処理を行つてから、皮層柔細胞の滲透濃度を調べたが、15°、10°C 処理のものでは対照と同様に 0.45 M であつたが、5°C では 0.5 M、0°C 処理のばあいは 0.6 M となり、明らかに滲透濃度は増加していた。なおケンモチの対照は 0.35 M である。

実験 2. 0°C で著しく耐凍性をますことが判つたので、0°C で hardening した場合、0°C の温度にさらされる時間がどのような影響を及ぼすかを調べてみた。実験は 10 月 8 日、タキノカワを用いて行つた。1 日の中それぞれ 2, 4, 8, 16, 24 時間 0°C にさらし、残りの時間即ち 22, 20, 16, 8 時間を 15°C の温度にさらした。かような処理を 5 日及び 10 日間行つてから前と同様の方法で耐凍性をしらべた(第 1 図)。毎日、2~4 時間 0°C にさらした場合は 15°C においた対照と較べて、耐凍性の差はあまりみられないが、毎日 8 時間 0°C にさらした場合は明かに効果があらわれている。さらす時間が 16 時間になると 8 時間の場合よりもその効果は著しい。16 時間と 24 時間の間には、はつきりした差はみられない。0°C に連続的にさらしておいた場合より、0°C に 8 時間或は 16 時間さらしてから、1 日の残り

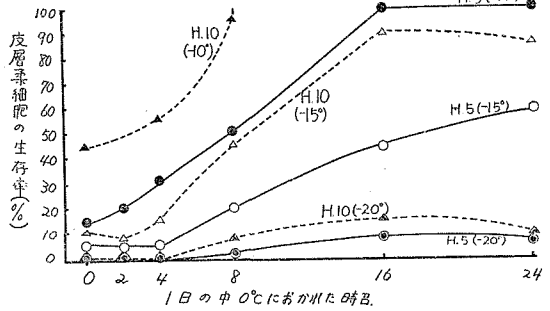
の時間を、15°C にさらした場合の方が hardening 効果が大きいという結果はえられなかつた。生存率を 0°C にさらされた積算時間に対しプロットしたのが第 2 図である。各温度とも、大体直線になつているので、ある時間の範囲内では 0°C にさらされる時間の長さに比例して耐凍性を



第 2 図 耐凍性増大に及ぼす 0°C にさらした積算時間の影響

実験条件は第 1 図と同じ。

図中の -10°, -15°, -20° は耐凍性判定のため 1 日間凍結させた温度を示す。



第 1 図 耐凍性増大に及ぼす 0°C での処理時間の影響
低温処理の条件: 1 日の中 2, 4, 8, 16, 24 時間 0°C にさらし、残りの時間 15°C におくことを 5 日間繰返す。

低温処理の時期: 10 月 8 日~10 月 18 日。

品 種: タキノカワ

図中の H.5, H.10 は 5 日, 10 日間 0°C で処理したことを示す。

(-10°), (-15°), (-20°) は耐凍性の判定のために 1 日間凍結した温度を示す。

をますと考えられる。この関係については実験が少ないので、今後詳細に調べる予定である。上の実験で 1 日の中、0°C に 2, 4, 8, 24 時間さらして、10 日間 hardening を行つた場合、皮層柔細胞の滲透濃度の変化をみると、1 日の中 2, 4 時間 0°C にさらした場合は対照と同様で 0.45 M であつたが、8 時間 0°C にさらした場合は 0.52 M、24 時間 0°C にさらした場合は 0.6 M となつている。

実験 3. 0°C 以上の温度だけでなく、0°C 以下の温度でも hardening 効果があるか

どうか調べてみた。この実験は10月30日タキノカワで行つた。まだ枝条の耐凍性が小さいので、連続的に -5°C の温度で凍結状態におくと、害を生ずるので、1日の中4時間、8時間のみ低温処理して1日の残りの時間は 15°C の温度にさらした。かような処理を5日間行つてから、耐凍性の変化をしらべた。枝条の直径が約0.6 cmの太さの部位について、1.5 cmの長さの小片5つを切り取つて、ヴィニール布に包んで 5° 、 2.5° 、 0° 、 -2.5° 、 -5°C の5種類の温度で処理した。 -2.5 と -5°C の場合には、過冷却を早くやぶるために、はじめ切端を少し湿らせておき、それぞれ -2.5° 、 -5°C において凍結がおきてから、ヴィニール布に包んで -2.5°C と -5°C の恒温箱に入れた。1日の中4時間及び8時間各温度にさらし、残りの時間は 15°C におき、毎日その処理をくりかえした。低温処理後、 -20°C で1日間凍結させて耐凍性の大きさを調べたが、第3表から明かなように処理温度の低下するにつれて、hardening効果は著しくなる。1日4時間低温処理するよりも、8時間処理した方がその効果は著しく大きい。 -2.5°C と -5°C の場合には細胞外凍結の状態にあるが、 0°C と較べて耐凍性の増加が更に著しい。

第3表 耐凍性増大に及ぼす hardening 温度の影響

hardening の条件：1日のうち4、8時間のみ各温度にさらし、残りの時間 15°C にさらすことを5日間繰返す。

実験 期 日：10月30日～11月4日

品 種：タキノカワ

hardening の温度	5°C		2.5°C		0°C		-2.5°C		-5°C	
	hardening の 時 間									
凍 結 温 度 ($^{\circ}\text{C}$)	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8
-15° *	10	30	20	45	30	60	40	70	60	85
-20° *	0	10	0	20	10	50	20	70	55	80

* 耐凍性判定の凍結条件は -15° 、 -20°C で1日間凍結させた。

実験4. 更に氷点下での hardening 効果をたしかめるために、 -3° 、 -5° 、 -10°C の各温度に8時間おいてから、残りの16時間を 0°C におく処理を行つてみた。かような処理を6日間行つてから、耐凍性の大きさを調べてみた。第4表に示すように、氷点下でも温度が低くなるにつれて hardening 効果はますます事が明かである。以上の結果より、皮層柔細胞が低温処理によつて、耐凍性を増大するには、少なくとも -10°C 以上の温度範囲では、組織が害されない限り温度が低い程効果的であると言えることができる。自然条件において、秋から冬にかけて皮層柔細胞が耐凍性を増大することは良く知られているので、外気の変

第4表 耐凍性増大に及ぼす hardening 温度の影響

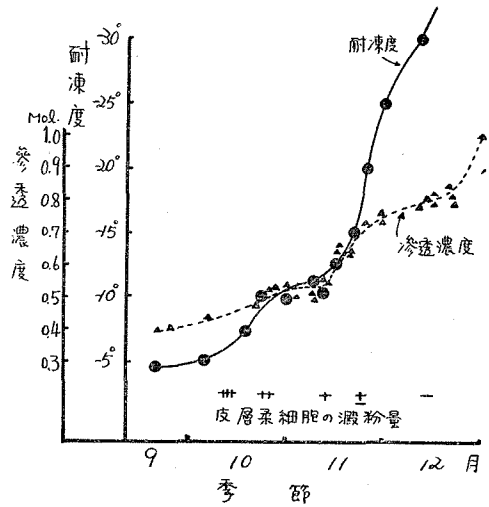
hardening の条件：1日の中8時間のみ各温度にさらし；残りの16時間 0°C におくことを5日間繰返した。(11月14日～11月19日)

品 種：タキノカワ

表中の数字は耐凍性判定のために -25° 、 -30°C で1日間凍結させた後における皮層柔細胞の生存率(%)を示す。

凍結温度 ($^{\circ}\text{C}$)	hardening の 温 度			
	0°C	-3°C	-5°C	-10°C
-25	20	70	90	90
-30	10	40	50	60

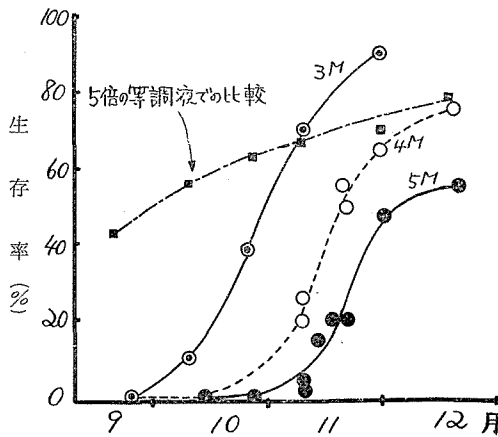
化と耐凍性の増加との関係を調べてみた。9月から12月までの3箇月間、1箇月に3~5回桑園よりタキノカワの枝条を採集して、枝条の上部から約1/3の部位を10cmの長さに切り取って、いろいろの温度で1日間凍結させて、皮層柔細胞が全部生きている最低温度をもつて、耐凍性の大きさをあらわしてみた(第3図)。9月より11月初旬まで、耐凍性は漸進的にましているが、11月中旬より急激に増加している。11月初旬には精々 -10°C にしか耐えられなかつたのが、1箇月後の12月初旬には少なくとも -30°C の凍結に耐え得るようになる。12月中旬に行つた実験では、 -94°C (0°C より -60°C までの冷却速度が



第3図 皮層柔細胞の耐凍度、浸透濃度、澱粉量の季節的变化

材料：クワ(タキノカワ)

$1^{\circ}\text{C}/1$ 分)まで冷却したが、皮層柔細胞は全部生存していた。浸透濃度の季節的变化は第4図に示してあるとおり、9月より11月初旬まではゆつくりと増加しているが、11月中旬よりその増加の割合は著しくなつてい



第4図 脱水抵抗の季節的变化

- 3 Mol. 平衡塩液での脱水による皮層柔細胞の生存率の季節的变化
- 4 Mol. 同 上
- 5 Mol. 同 上
- 各季節に於ける皮層柔細胞の細胞の5倍の高強平衡塩溶液での脱水による生存率の季節的变化

品 種：タキノカワ

たが、10月下旬にはやや減少し、11月中旬には著しく減少して、12月以降皮層組織には澱粉は殆んどみられない。10月初旬から中旬までの間は最低気温は 5°C ~ 10°C の間が多かつたが、10月下旬から最低気温は 5°C 以下で 0°C 近くの日が多い。11月10日頃より最低気温は殆んど 0°C 或は氷点下になり、最高気温も 10°C 以下であつた。又1日のうちで 0°C 以下の温度にさらされる時間も長くなつてくる。第4図には9月~12月の間における脱水抵抗の値を示してある。寒くなるにつれて脱水抵抗は明かに増大している。しかし細胞内の浸透濃度の増大につれて細胞内と脱水液(平衡塩液)との濃度差は季節によつて異なつてくるので、一定の濃度差の場合における値の方がより正確に脱水抵抗の大きさを示すことができると考えて季節毎に各細胞液の5倍

の高調液中での脱水抵抗の値も同時に測つてみた。その結果、季節と共に漸次増加しているがその増加の割合は前者に較べて緩かになつている。

IV.

従来 hardening は 0°C 以上の温度で行われ、Ivanov (1931)²⁾ がミカン類を -2°C で hardening した以外は氷点下の温度では行われていない。氷点下では、凍結が起るので、hardening が起らないだろうと考えられていた。連続的に 0°C で温度処理した方がいいのか、1日に1回 0°C と $15^{\circ}\sim 20^{\circ}\text{C}$ と温度を変化させた方がいいのか、従来定説がなかつた。之の問題は使用する実験材料にも、又植物の条件によつても異なるであろう。特に草本類、常緑樹の場合では、一定時間照明しないとクロロシスを起すおそれもある。クワでは、 0°C で連続的に長時間処理した方が、温度変化をあたえるよりも効果が大きい結果がえられた。氷点下で連続的に -5° 、 -10°C に長く凍結状態におくと、実験を行つた時期では、処理中に凍害が起るので、氷点下の低い温度で凍結状態のまま連続的に処理することは出来なかつた。本実験の結果から一定時間の hardening 処理については、温度が低いほど、殊に 0°C 及び 0°C 以下の温度の方がその効果が大きい。然したとえ 10° 、 5°C の温度でも、処理時間を長くすると、ある程度耐凍性を増してくる。然し処理時間を長くしても、耐凍性を増す度合には、限度があつて、たとえば 10°C で処理されたものは -10°C での凍結にある程度耐えられるようになるにすぎない。 5°C では処理時間の長くなるにつれて、 -15°C にある程度耐えうるようになるが、 -20°C には全く耐えない。 -20°C 以下の低温度にある程度耐えうるようになるには、 0°C 或はそれ以下の低温に一定期間さらされる事が必要である。9月~12月の間の最低気温の推移と自然条件における耐凍性の増大との関係も、上の実験結果からよく説明される。自然条件に於いても、11月中旬頃より氷点下の気温の到来と共に、木本類の耐凍性は著しく増大する。そして hardening は 0°C 附近の温度のみでなく、氷点下の温度でも、効果があると思われる。

本実験は、皮層柔細胞のみを対象としているが、皮層柔細胞は茎の中で最も耐凍性が大きく、又低温処理によつて耐凍性を速に増大する。他の組織は皮層組織よりも耐凍性が小さく又耐凍性の増大の速度もおそい。芽をふくめた枝条全体の耐凍性は皮層柔細胞の耐凍性増大の曲線と多少ずれている。然し枝条全体として耐凍性の最も大きい時期は今迄調べた木本類では12月下旬~2月中旬の間で、之は気温の最低の時期に一致している。

最近 Tumarokh⁶⁾ (1955) はモスクワで各種木本類(モミ、マツ、シラカバ、リンゴ等)の耐凍性の季節的変化と気温の変化を詳細に調べて、耐凍性を著しく増大させる気温を求めた。彼の結果によると木本類に於いては、耐凍性の増大は 0°C より若干たかい温度に於いて始まり、より以上の増大は氷点下の温度に於いて起る。1日の平均気温が $-10^{\circ}\sim -15^{\circ}\text{C}$ 、1日の最低気温が $-13^{\circ}\sim -20^{\circ}\text{C}$ の日が10日以上つづいた時、木は最も著しく耐凍性を増した。また木の種類によつて、いろいろな温度に対する反応がことなつている。彼は植物が害されない限り、

低い温度にさらされた方が耐凍性を著しく増大すると結論している。耐凍性増大の問題を考える場合、たんに温度のみでなく、木の内的条件を考慮する必要がある。内的条件が備わっていないならば、たとえ適度な温度が作用しても、耐凍性は増加しないからである⁴⁾。又時期によつて、例えば10月と11月では同一の茎でも、内的条件が異なっている。然も内的条件は外的条件との相互反応によつてたえず変化している。

耐凍性が増大している場合には、必ず滲透濃度が増加している。hardening 処理をしても耐凍性が増さない場合は滲透濃度は変わらないが、増大してもその度合は非常に少ない。hardening 効果の著しい9、10月に、また春発芽前から開葉前にかけても、澱粉の蓄積が最大に達する。そして0°Cで10日間 hardening すると、いずれも滲透濃度は約0.2 M* 増加し、耐凍性も著しく増大する。開葉後次第に澱粉量が減少するにつれて、hardening 効果も著しく減少する。従つて滲透濃度の増大が hardening の過程において、大きい役割を演じている事は確である。

御指導を賜つた青木教授及び実験材料について種々御配慮をいただいた北大農学部滝沢助教授、同附属桑園の越山氏に深謝する。

摘 要

秋に桑の皮層組織について、耐凍性を増大させ得る温度範囲を検討した。15°C以上の温度では、hardening 効果はない。10°、5°Cでは処理時間が長くなれば、ある程度耐凍性は増大するが、処理温度によつて、それぞれ耐凍性を増し得る限度がある。0°C近く、殊に0°C以下の温度は hardening 効果が著しい。少なくとも、-10°C以上の温度では凍害を受けない限り、温度が低いほど hardening 効果は大きい。hardening する場合、高温と低温を交互に与えるよりも連続的に低温にさらしておいた方が hardening 効果が大きい。ある範囲内では耐凍性の増大は低温にさらされる積算時間に比例するようである。hardening 処理によつて耐凍性が増大する時には、必ず滲透濃度も増加し、それにつれて脱水抵抗も増大する。

文 献

- 1) Harvey, R. B. 1930 Length of exposure to low temperature as a factor in the hardening process in tree seedlings. *Journal of Forestry*, **28**, 51.
- 2) Ivanov, S. M. 1939 Importance of temperature conditions in the hardening of citrus plants. *C. R. Acad. Sci, U.R.S.S.*, **25**, 440.
- 3) Pisek, A. 1950 Frost härte und Zusammensetzung des Zellsaftes bei *Rhododendron ferriangineum*, *Pinus cembra* und *Picea excelsa*. *Protopasm*, **39**, 129.
- 4) 酒井 昭 1955 發育過程と耐凍性獲得の關係. *低温科学. 生物篇*, **13**, 21.
- 5) ——— 1955 桑の耐凍性及び皮層柔細胞の生理的狀態の季節的变化. *低温科学, 生物篇*, **13**, 33.
- 6) Tumarokh, I. I. and O. A. Krasavtsev 1955 Morozostoikost' drevesnykh rasteniy. *Fiziorogiya Rastenii*, **2**, 320.

* 低温処理する前の濃度は9、10月でも、春発芽前でも約0.4 Mであるから、その濃度の増加率(50%)は著しい。

Résumé

It was confirmed that in early autumn the cut off twig of mulberry tree can be artificially hardened under appropriate temperature conditions. The effective temperatures for the hardening are below 10°C, but effectiveness of the hardening increases with decreasing of temperature at which the treatment is made, when the length of the hardening period is kept fixed; in a definite temperature the hardening time is the determining factor, the longer time being more effective.

Under subzero temperatures, if the treatment period is sufficiently long, the extracellular freezing should occur in the cell and even in this frozen state the hardening process steadily proceeds. In natural condition, actually the frost hardiness increases, when the daily minimum temperature falls to subzero for a week.

The intermittent exposure to low temperature, that is, every day 16 hours at 0°C and 8 hours at 15°C for 20 days, showed no better effect in respect to gaining frost hardiness than the continuous exposure to 0°C.