



Title	木本類の耐凍性増大と糖類及び水溶性蛋白質との関係
Author(s)	酒井, 昭; SAKAI, Akira
Citation	低温科学. 生物篇, 15, 17-29
Issue Date	1957-11-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17594
Type	departmental bulletin paper
File Information	15_p17-29.pdf



木本類の耐凍性* 増大と糖類及び水溶性蛋白質との関係**

酒 井 昭

(低温科学研究所 生物部門)

(昭和 年 月受理)

I

秋に蓄積された澱粉が晩秋以降気温の低下^(1),23),27),28),29)につれて糖類に変ることはよく知られている。そしてかような糖類の増大が植物の耐凍性、越冬性^(10),11),12),14),29),30)に大きい役割を果していると考えられているが、一部の研究者^(14),24)は耐凍性増大に及ぼす糖類の効果を否定している。たとえば Siminovitch 等はニセアカシヤを用いて水溶性蛋白質、可溶性糖類と耐凍性の季節的変化を並行的にしらべたり、いろいろの時期に剥皮をほどこして葉と根との物質の移動をさえぎつておいて、剥皮しない正常の木の皮部と較べて、いろいろの物質が季節的にどのような変化をするかを調べた結果、水溶性蛋白質の増大が耐凍性増大の主因をなしている、可溶性糖類はそれに対してあまり大きい役割を果していないと結論している。

従来の実験では、ある物質が寒い季節に増加するとか、また耐凍性とそれに関係ある各種の要因が季節的にどのように変化するかを調べた結果から、その要因と耐凍性増大との間に平行関係があるか、ないかを論ずるに過ぎなかつた。しかしこの方法からだけでは、これらの平行関係がたんなる季節的随伴現象であるか、それとも耐凍性増大と密接に平行的に変化するものか判らない。この点を明確にするための一方法として人工的低温処理を行なつて、耐凍性が著しく増大する時に、各種の要因がそれに伴つて、どのように変化するかを調べればある程度それらの関係が判断出来る。

Siminovitch 等は高張溶液中^(24),25)での細胞の脱水抵抗をはかつて、それと耐凍性に関係ある各種の要因との関係を論じているが、耐凍性の小さい時には高張溶液中での脱水抵抗がそのまま耐凍性を示さない場合があるし、飽和度の関係から、6モル以上の高張液が用いられないので、耐凍性がある程度以上大きくなるとこの方法では耐凍性の大きさを測定出来なくなる。そのほかいろいろの問題があるので、脱水抵抗の値を直に耐凍性の尺度とすることは危険である。

木本類において季節的変化にともなつて変動することが知られている物質は還元糖^(14),17),

** 北海道大学低温科学研究所業績 第364号

* 耐凍性とは細胞、組織が凍結に耐える性質のことである。

蔗糖^{14),24),27),28),31)}, 麦芽糖¹¹⁾, ラフィノース^{9),18)}, スタキオース⁹⁾, 水溶性蛋白質^{20),26)}, グリコプロタイド⁸⁾, 脂肪^{6),13),14),29),30)} 等である。

今回は季節的及び人工的低温処理にともなう耐凍性の変化と、糖類(還元糖, 蔗糖, 澱粉)及び水溶性蛋白質の変動を調べ、またそれらの物質が耐凍性増大に果している役割について考察した結果を報告する。

御指導を賜った、青木教授及び実験材料について便宜を与えられた農学部養蚕教室の滝沢助教授に感謝の意を表します。

II

材料としては桑 (*Morus Bombycis* Koidz.) のタキノカワ(品種名)の1年生枝条の先端から5~20 cmの部位を用いた。

人工的低温処理にさいしては、1本の枝条から約3 cmの長さの6本の小片を作り、3本の小片を対照として直に測定に使用し、残りの3本の小片は乾燥を防ぐため両端ワセリンをつけて、ビニール布に包み、10日間0°Cの恒温箱中で低温処理してから各測定に用いた。

耐凍性の判定法は枝条の直径が約0.6~0.7 cmの部位から長さ約2 cmの小片を切取つて、その切端に少し濡れた脱脂綿をつけて直径3 cmの小シャーレにその小片を入れて、各温度の恒温箱中で冷却した。冷却30分後に殆んどの小片に凍結を始めていたが、その際に、未凍結の小片は植氷して過冷却を破つた。その後4時間凍結状態においてから取り出して、室温で融解後、10~20個の皮層柔細胞の縦断切片を取出して、それを中性赤溶液中で染めてから、高張平衡塩溶液中で原形質分離させた。その際、中性赤で染まり、しかも原質分離している細胞はその時において生存しているものとみなした。中性赤に染まつてはいるが、原形質分離しない細胞や、中性赤に染まらないが、原形質分離している細胞も存在していたが、これらの細胞は生存しているとみなさないことにした。融解後、中性赤で染まり、原形質分離している細胞がすべて正常であるとはかぎらない。異常な細胞でも融解直後は中性赤で染まり、原形質分離するが、1~2日後には原形質分離しなくなる細胞もある。かように死んではいないが害を受けている細胞は原形質分離型が異常の場合が多いので、ある程度までは分離型からその異常性を判断出来るが、今回の目的は耐凍性の相対値が判ればよいので、上に規定した状態にある細胞を総て生存しているとみなすことにした。耐凍性の大きさは4時間の凍結後に殆んど全ての皮層柔細胞が生きている最低温度で示した。

今迄の研究者は木本類の糖類及び水溶性蛋白質を測定する場合、乾燥材料を用いたが、本実験では平行的に行なつた酵素化学の実験上、また高温乾燥による資料の変化を防ぐために皮層部だけ取出して、石英砂を入れて乳鉢で充分に磨砕して作つたホモゲネートの遠心(3000回/分—5分間)上清を使用した。

還元糖は Hane's⁵⁾の方法で、非還元糖はホモゲネートに0.1% HCl(ホモゲネートの1/10容)加えて100°Cで30分間加水分解後の還元糖の量から加水分解前の還元糖量を差引いた値を

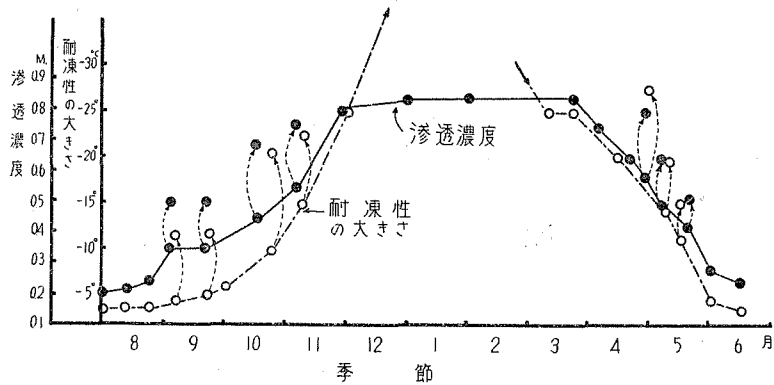
非還元糖量とした。澱粉はホモゲネートの遠心沈殿物を水でよく洗った後、25% HCl (沈澱浮游液の1/10容)を入れて2時間30分、100°Cで加水分解してから還元糖を測った。糖類はいずれも資料の乾物当りの葡萄糖のmg数であらわした。澱粉の測定には予め過塩素酸で澱粉を抽出しないで、沈澱物全体の還元糖量を測定したため、測定値は真の値よりも多目にあらわれているはずである。非還元糖が蔗糖であるかどうかはペーパークロマトグラフでたしかめた。n-ブタノール—醋酸—水を4:1:2の割合に混合した展開液を用い、アルドースに対する発色剤としてベンチジンの3塩素醋酸(TCA)溶液を、ケトースに対する発色剤としてレゾルシノール⁽¹⁴⁾のTCA溶液を用いた。資料をアルコールと共に石英砂を入れて磨碎して糖を抽出後、アルコールを減圧下で除いて糖溶液を濃縮した。展開後果糖、ブドウ糖の外に蔗糖のRFに相当する部位にベンチジンにも、レゾルシノールにも反応するがスポットの存在が認められた。蔗糖の部位の糖を水で抽出して稀塩酸で加水分解後、減圧濃縮して展開後、発色させた時にはブドウ糖と果糖のスポットのみで、蔗糖のRFに相当する部位には反応は認められなかった。したがって加水分解される非還元糖は蔗糖と判定される。

水溶性蛋白質は上記のホモゲネートの遠心上清に最終濃度が10%溶液になるようにTCA溶液を加えて沈澱した蛋白質を10%のTCAでよく洗ってから、その浮游液の一定容積を分解瓶にとつて硫酸と過酸化水素で分解後、Levy and Palmer⁽¹⁵⁾の方法でNを測り、資料の乾物当りのNのmg数であらわした。

枝の内部の活動状況を知るために分裂組織である形成層の状態を調べた。形成層の活動⁽²⁰⁾状態は形成層の細胞層の数及び細胞の厚さから判定した。浸透濃度は皮層柔細胞を用いて、平衡塩溶液で原形質分離法によつて測定した。脱水抵抗⁽²⁰⁾は高張平衡塩溶液中で10分間脱水してから原形質分離法でその生死を判定した。

III

実験1. 耐凍性と低温処理効果の季節的变化。第1図に耐凍性と浸透濃度の季節的变化及び低温処理によつて耐凍性や浸透濃度が季節的にどのように変るかを示した。縦軸は浸透濃度と耐凍性の大きさを表している。8月20日頃までは過冷却が破れてから-5°Cの温度に低下するまでに、細胞は死んでしまうので、短時間の細胞外凍結にも耐えられないし、容易に細胞内凍結をおこしやすい状態にある。低温処理をしても耐凍性は殆んど増さないし、浸透濃度も変わらない。9月上旬から中旬には-5°Cで短時間の凍結後も50%以上の細胞が生存しているが、4時間以上の凍結には耐えられないし、温度がより以上低下すると細胞は全部死んでしまう。耐凍性の大きさは気温が高い10月上旬までは著しい変化がない。しかし9月5日以降、低温処理すると-10°Cで4時間の凍結後でも全細胞が生きているようになる。10月中旬以降、最低気温が0°C又は0°C以下になるにおよんで耐凍性は著しく増大する。また低温処理効果も9月上旬一下旬と比較して著しく大きい。耐凍性は11月以降、氷点下の気温が続く頃から急激に増大し、12月上旬以降、最大に達し、急激に冷却しない限り-100°C⁽²¹⁾以下に冷却しても皮



第1図 耐凍性と低温処理効果の季節的变化及びそれに伴う浸透濃度の変化

矢印は低温処理前後における耐凍性の大きさと浸透濃度の値の増減の向きを示している。

対照と低温処理の実験には同一の枝の同じ部分を半分宛用いた。

層細胞は死なないし、長時間の連続凍結²¹⁾にも耐えられるようになる。3月中旬頃、1日の平均気温が 0°C 以下であるにもかかわらず、耐凍性は漸次低下し始めるが、その低下の度合は4月末まではゆるやかであるが、発芽の始まる5月10日以降はやや急激に低下して6月初旬の開葉後には、 -5°C の4時間の凍結でも死んでしまう。1日の最低気温は4月末まで 0°C 以下であった。4月末頃より5月10日頃までは、 0°C での低温処理効果が著しいが、その後低温処理効果は低下して、5月30日以降低温処理効果がない。

皮層柔細胞の浸透濃度も耐凍性の変化と平行的に移行するし、低温処理後、耐凍性が増大する時にはそれに平行して浸透濃度も増大した。春においても両者の平行的関係が認められる。5月中旬以降発芽ともなつて耐凍性の低下が著しくなるにおよんで、浸透濃度も著しく低下し、6月初旬には 0.20 M の最低値に達する。かように季節的变化においても、人工的低温処理においても、耐凍性の増大と浸透濃度の増大とは緊密に平行している。浸透濃度の変化に対して大きい役割を果しているものは、可溶性糖類、電解質、水の量及び水の状態であるが、電解質は季節的にあまり変化¹⁷⁾しないので、可溶性糖類と水とが問題となる。

実験2. 糖類の季節的变化。還元糖と蔗糖の量を季節的に、又各時期における低温処理効果と平行して変化するかどうかを調べてみた。第2図に還元糖^{*}、蔗糖、澱粉と浸透濃度の季節的变化及び低温処理効果に伴うそれらの糖の変動を示した。縦軸に浸透濃度をモル数で、糖類は資料の乾物当りの mg 数であらわした。

還元糖は季節的に殆んど変化がない。8月初旬頃と4月末以降僅かに増大するにもぎない。低温処理した場合にも第1表に示すように、秋も、春も低温処理にもなつて還元糖は増加し

* ペーパークロマトグラフで調べた結果、還元糖としてはブドウ糖と果糖がおもなものである。秋には麦芽糖¹⁸⁾も見出されている。

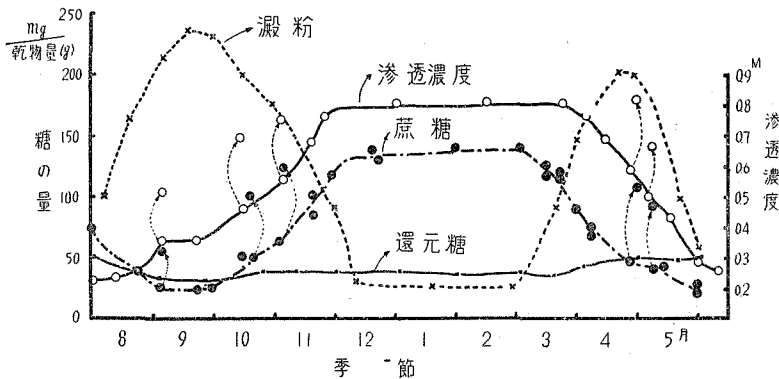
ない。蔗糖は9月に最低に達してから、漸次増加して12月初旬に最大値に達する。また3月下旬から減少し始めて発芽開始前には著しく減少している。第2図に示したように低温処理した場合におけるその増加量は低温処理の条件が同一であつても、時期によつて異なり、5月初めと10月には低温処理前の値の約2倍以上にも増加している。蔗糖と澱粉量の増減とは互に逆に経過する(第2図)。8月初旬には皮層柔細胞内の澱粉の存在は少ないので、細胞は透明で核がよくみとめられるが、8月下旬頃よりクロプラストと澱粉量が増大し、9月20日頃に澱粉量が最大値に達する。10月中旬以降、1日の最低気温が氷点近くに低下するにつれて、澱粉量の減少が増大する。11月末頃には細胞内には澱粉粒は殆んど認められなくなり、細胞は8月初旬のように透明で核がはつきりみとめられるようになる。3月下旬頃より澱粉は再び増加し始め、4月中旬頃細胞内は澱粉粒で充満し最大値に達する。5月10日以降発芽ともなつて急激に減少して、5月末の開葉頃には、また細胞内は透明となつて核がはつきりとみとめられるようになる。かように発芽後を除いては澱粉と蔗糖とは全く逆の増減をなしている。第1表に示したように低温処理した場合も、蔗糖の増加と逆に澱粉は減少している。なほ第2図の蔗糖の変化と滲透濃度の変化の曲線は9月以降平行的に変化しているし、低温処理した場合も、蔗糖の増大する場合には、それと平行的に滲透濃度も増大している。

第1表 低温処理前後における糖類の変化

低温処理の条件: 0°Cで10日間
材料: 桑(品種タキノカワ)の皮層部

期 日	10月20日		5月1日	
	対 照	低 温 処 理	対 照	低 温 処 理
還 元 糖	30*	33	40	40
蔗 糖	60	120	38	96
澱 粉	170	70	200	110

* 表中の数字は資料の乾燥重量 (g) 当りの mg 数である。
対照と低温処理の実験には同一の枝の同じ部分を半分宛用いた。



第2図 糖類と滲透濃度の季節的变化及び低温処理による変化
矢印は低温処理前後における変化を示す。
対照と低温処理の実験には同一の枝の同じ部分を半分宛用いた。

実験3. 枝の南側と北側における糖と耐凍性の大きさの比較。3月中旬頃は1日の平均気温が氷点下であり、夜間の最低気温が氷点下数度に低下するが、その頃は冬と比較して日長も

長くなり、日射も強くなっているので、枝条の南面は輻射でかなり温度が上昇していると考えられる。したがって枝条の南面と北面とで澱粉の含有量が異なるものと考えられるので、I-IK 溶

第2表 南面と北面における糖類と耐凍性の差

実験期日： 4月9日

材 料： 桑(品種タキノカワ)の皮層部

		南 面	北 面
I-IK 反 応*		III	+~++
澱 粉		180 mg**	100 mg
還 元 糖		46 "	43 "
蔗 糖		90 "	150 "
凍結後の 生存率	-30°Cで24時間	10***	80
	-20°Cで4時間	100	100

* 皮層柔細胞のI-IK反応による組織化学的検査

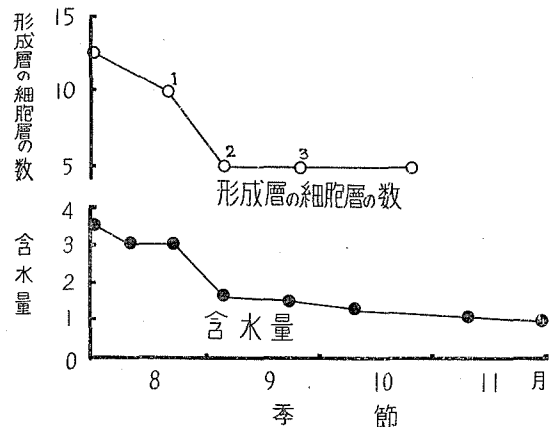
** 資料の乾燥重量(g)当り mg の数である。

*** -30°Cで24時間凍結後、融解させてから、原形質分離法で測った皮層柔細胞の生存率である。なお資料は同一の枝の同一部分の南面と北面からとつたものである。

実験4. 含水量の変化と形成層の活動状態。8月初旬は9月と比較して、第2図で示したように蔗糖の量が多いにもかかわらず、滲透濃度及び耐凍性が小さい。第3図に皮層部の含水量の季節的変化を資料の乾物当りの比較であらわした。8月20日から9月初旬にかけて皮層部含水量が3から1.5に著しく減少している。また春、発芽開始とともに水分は増加し、枝条の成長期には5~3.5まで上昇する。かように含水量の多い時には蔗糖が増大しても滲透濃度に及ぼす影響は少ない。前に述べたように8月初めの滲透濃度と蔗糖量との関係が9月以降と逆になつているのはこのためであろう。なおこの含水量の低下時に前に述べたように、澱粉が急激に増大しているため、細胞内には著しい変化が起きているものと考えられる。枝条の伸長は8月中旬~下旬頃停止し、頂芽は8月下旬には休眠期に入っている。第3図の縦軸には形成層の細胞層の数を示した。成長分裂中の形成層

液で澱粉の量を組織化学的にしらべた。それとともに澱粉、還元糖、蔗糖および耐凍性の大きさもしらべてみた(第2表)。枝条の南面では蔗糖の量が北面に比較して著しく少なく、澱粉が多い。耐凍性も-30°Cで24時間凍結した場合には、南面は北面に比較して耐凍性はるかに小さい。しかし南面でも、-20°Cで4時間の凍結には充分耐えられる程度の耐凍性をもっている。秋にも両面で耐凍性には著しい差があるが、含まれている物質の量がどのように異なっているかについては今後調べてみる予定である。

このように10月以降においては、蔗糖の量が滲透濃度、および耐凍性の増大に密接に関係していることが判る。

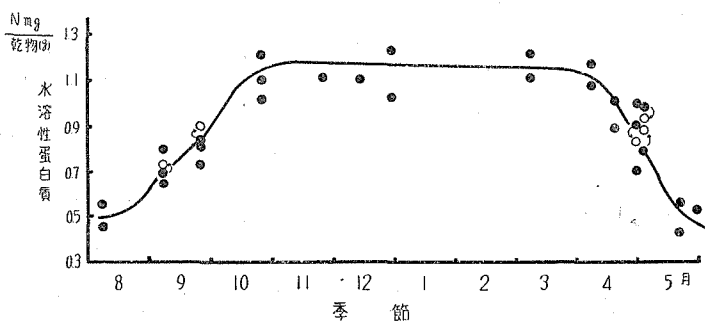


第3図 含水量の季節的変化と形成層の活動状態

含水量は皮層部の乾物量に対しあらわした。数字は形成層の状態と関連ある形態的变化を示す。1. 剥皮出来る(コルク化未完成), 2. 3割位の枝は剥皮しにくい(コルク化略完成), 3. 全く剥皮出来ない(コルク化先端まで完成)。

の数は10~15層で細胞の厚さもあついが、形成層の機能が低下するにつれて細胞の厚さがうすくなり、細胞層の数も減少してくる。含水量の減少する8月下旬頃から、急に細胞層の数は減少して、9月5日頃には細胞層は約5層になる。9月10日頃より皮層部は木部から容易に剥皮出来ないようになり、9月20日以降には全く剥皮出来ない。この頃には形成層の機能は停止したと考えてよい。また枝条表面のコルク層¹⁰⁾の形成は8月下旬頃より急に進み、9月5日頃にはコルク化は先端の2~3節を残し完了しているが、9月20日頃には先端まで完成される。形成されたコルク層の厚さは以後10月中旬頃まで漸次増加する。

実験5. 水溶性蛋白質の変化。水溶性蛋白質の変化を第4図に示してあるが、その縦軸は



第4図 水溶性蛋白質の季節的变化と低温処理による変化

○ 低温処理(0°Cで10日間)後の値。矢印は低温処理前後における値の増減の向きを示している。春の対照と低温処理の実験には同一の枝の同じ部分を半分宛用いた。

水溶性蛋白質の乾物当りのNのmg数をあらわす。これは9~10月に増大して、10月末頃には8月初めの成長期の約2倍量に達し、以後3月までその値を維持するが、4月漸次減少し始め、発芽ともなつて5月中旬頃から急激に減少する。水溶性蛋白質の季節的变化と耐凍性の変化(10月まで)は大體平行的に移行するが、耐凍性は10月下旬から11月下旬まで急激に増加するのに、水溶性蛋白質は11月には殆んど増加しない。第3表にしめすように0°Cで10日間低温処理した場合、耐凍性は著しく増大するのに、水溶性蛋白質の量は殆んど変化していない。この場合、まえにのべたように蔗糖の値は低温処理後、対照の約2倍に増加している。水溶性蛋白質は含水量の比較的少ない9月中旬~5月中旬までは冬の値の約2/3位の値を保持している。

第3表 水溶性蛋白質量の低温処理による変化

低温処理の条件: 0°Cで10日間

実験期日: 5月10日

材 料: 桑(品種タキノカワ)の皮層部

実験番号	水溶性蛋白質の量		凍結後の生存率	
	対 照	低 温 処 理	対 照	低 温 処 理
No. 1	0.076*	0.086	0**	100
No. 2	0.090	0.082	0	100
No. 3	0.093	0.089	0	70

* 表中の数字は資料の乾燥重量(g)当りのNのmg数である。

** -20°Cで24時間凍結後、融解させてから原形質分離法で調べた皮層柔細胞の生存率を示す。なほ対照と低温処理とは同一の枝の同じ部分を半分宛用いた。

実験6. 脱水抵抗の低温処理による変化
 滲透濃度が耐凍性に対して果している役割の一端を知るために、低温処理前後において脱水抵抗がどのように変わるかをしらべてみた。皮層細胞の切片を5M~1Mの高張塩溶液中に10分間処理後、その生存率をしらべてみると、低温処理した場合対照よりも著しく生存率が高まっている(第4表)。しかし低温処理後、滲透濃度が0.4Mから0.6Mに増大しているため、低温処理及び未処理のものを等しい高張溶液に入れた場合、細胞内外の間の濃度の比は等しくはない。つまり低温処理されないものは比較的高い高張液に、また低温処理を受けたものは比較的低い高張液に入れられることになる。この点を考慮に入れて、各々両者の等調の5倍と約8倍の高張溶液について脱水抵抗を比較してみると、両者の差は僅かになる。したがって低温処理後における、この方法で測つた脱水抵抗の著しい増大は、滲透濃度の増大に基づく部分がかかなり多いと考えられる。

第4表 低温処理前後における脱水抵抗の差

実験期日：9月25日

低温処理の条件：0°Cで10日間

材 料：桑(品種タキノカワ)の皮層部

		対 照	低 温 処 理
滲 透 濃 度		0.4 M	0.6 M
脱 水 抵 抗 を 測 定 す る 高 張 溶 液 の 濃 度	5 M	5*	20~30(8.2 i)
	4 M	5~10	60
	3 M	10(7.8 i)**	80~90(5 i)
	2 M	70~80(5 i)	100
	1 M	90~100	100

* 表中の数字は高張平衡塩溶液に10分間入れておいた後の皮層細胞の生存率を示す。

** i は細胞の滲透濃度を表わし、数字はその倍率を示す。例えば3M溶液では対照は等張液の約7.8倍に、低温処理のものでは5倍に当る。

IV

耐凍性の問題を論ずるには、耐凍性を正確な条件下ではかり、それと他の要因との関係を論ずることが必要である。耐凍性がある程度大きくなつた時には、脱水抵抗と耐凍性とはある程度平行的に変化するが、その脱水抵抗とある要因との間に平行関係があるからといつて、その要因をそのまま耐凍性の示標とすることは危険である。Siminovitch等はニセアカシアを用いて多年の間、耐凍性の問題を研究して多くの成果を挙げてきたが、実験の大部分は高張塩溶液中での脱水抵抗の大きさをもつて耐凍性の大きさの示標としている。初期の研究では実際凍結させて、耐凍性をはかっているが、その場合の測定には細胞内凍結を防ぐために、1°C/分の小さい冷却速度で冷却して、所定の温度に冷却後、温度を上昇させているので、耐凍性がある程度以上大きくなつた後は、耐凍性の比較が出来ない。高張液中での脱水抵抗の値で代示した耐凍性の大きさ*はニセアカシアでは、7月が最低値を示し、8月中旬から増大し始め、8月末から9月中旬に急激な増大を示し、10月には最高値に達している。しかしながら澱粉の蓄積が最大値に達するのは10月末とのべているので、澱粉が多量に分解するのは10月末から11月中であつて、その時に耐凍性が著しくますますであるので、脱水抵抗の値と実際の耐凍性の値とは時期的にかなりずれている。

* 実験地は Minnesota である。

成長の早く停止する木本類でも8, 9月は耐凍性の大きさは精々 $-5^{\circ}\sim-10^{\circ}\text{C}$ での短時間の凍結に耐えうる程度に過ぎない。春において脱水抵抗の値は3月以降, 漸次低下して, 5月下旬から6, 7月に急激に低下して7月に最低値に達する。しかし開葉し, 新梢が成長する6月初旬には, 耐凍性は殆んどなくなるので, それ以降, 脱水抵抗の大きさの上では差がみとめられても, 耐凍性の上からは意味がない。また高張塩溶液中で脱水抵抗を測定する限り飽和溶液(6 Mol)以上の高張液中では測定出来ないで, 耐凍性がある程度以上大きくなつたあとは(11月以降)より以上の差を求めることが出来ない。

まえに述べたように Siminovitch^{24), 25)}等は脱水抵抗の値を, 細胞外凍結による脱水に耐える程度をはかるために用いているが, その際滲透濃度も季節的に大きく変化している。滲透濃度が異なる2つの細胞の脱水抵抗を同一濃度の高張溶液中で比較する時, 滲透濃度が大きい細胞はそれの小さい細胞よりも脱水される水の量は少なく害も少ないはずである。季節的に滲透濃度が変化しているから, 高張溶液中での脱水抵抗の値は滲透濃度の増加による影響と, それ以外の要因による抵抗性の変化とを含んでいるはずである。細胞の滲透濃度増大の影響を除くためには, その時々々の細胞の滲透濃度に対し等しい割合の高張溶液で比較してみる必要がある。かような条件で比較すると低温処理前後の脱水抵抗の差も, 季節的变化²⁵⁾の差も少くなる。したがつて Siminovitch 等が耐凍性をよくあらわすものとして用いている脱水抵抗の値はかなり細胞の滲透濃度に支配される値である。したがつてこの方法での脱水抵抗の値の意義を知るためには, 同時に滲透濃度をはかる必要がある。

11月中旬以降, 滲透濃度が最大値近くなると, 滲透濃度の増加率よりも耐凍性の増加率の方が著しく大きく²⁵⁾なる。逆に春4~5月中旬頃には, 滲透濃度の低下する割合よりも, 耐凍性の低下する割合の方が大きい。12月初旬, 皮層細胞は -30°C で1日間の凍結状態には耐えられるが, 長期間の連続凍結には耐えられない。皮層細胞の連続的細胞外凍結状態に耐えられる時間²¹⁾は12月以降次第に長くなつてくる。その場合, 滲透濃度には変化がない。したがつて連続的細胞外凍結*に対する抵抗性の大小は滲透濃度の大きさのみからは推定出来ない。実際寒地における, いろいろな木本類の越冬性に対して, このような抵抗性が大きい役割を果していると考えられるが, かような抵抗性がどのような要因によつて支配されているかは現在の所未だ明らかにはされていない。

蔗糖の単位を乾物重量に対する値で表わした場合, その増加が滲透濃度や耐凍性に及ぼす影響を考えると, 細胞の含水量を無視することができない。Siminovitch²⁵⁾等は耐凍性がまだ小さい7~8月頃にすでに蔗糖は乾物当り, 1.0に近い値を示している事実を, 蔗糖と耐凍性との平行関係を否定する有力な証拠にしている。実際, 桑の場合にも, 蔗糖は8月初旬(多分7月下旬から)に乾物当り1.0に近い値を示している。夏に蔗糖のプールが行われるが, その場合には細胞は乾物当り3.5~4の大きい含水量を示している。この時の細胞の滲透濃度が0.2

* 連続的細胞外凍結に対する抵抗性の大きいポプラも抵抗性のより小さい桑も冬期における滲透濃度はいずれも約0.8モルである。

~0.25 モルである事からも、この時期における蔗糖の増加は細胞の滲透濃度に大きな変化を与えていないことが判る。蔗糖が耐凍性の変化に有効に働くためには、細胞の含水量が少いことが必要であつて、蔗糖の乾物当りの含有量の多少から直に耐凍性を論ずることは出来ない。

すでに報告¹⁰⁾したように、成長期の枝条は全く耐凍性がない上に、低温処理しても耐凍性は増加しない。しかし成長が停止して、成熟状態になつた枝条は $-5^{\circ}\sim-10^{\circ}\text{C}$ で短時間の凍結に耐えられるが、高温状態におく限り、耐凍性も滲透濃度も一定限度以上に増加しない。このような状態の枝条を低温処理すると、著しく耐凍性を増加するし、滲透濃度²³⁾も増加する。本実験においては、9月5日以降は、低温処理効果が著しいが、8月23日以前は無効である。したがつてこの10日間に状態が著しく変つたと考えられる。この期間には蔗糖の増加がないにもかかわらず、含水量の減少のために、滲透濃度は0.25より0.35モルに増加している。また前にのべたように、形態的にも、機能的にも著しい変化が起きてきているので、原形質の状態も大きい変化を受けているものと考えられる。かような原形質の変化が低温処理効果が有効になるために必要な予備的条件になつているように考えられる。

水溶性白蛋白質は Siminovitch^{24),26)}の結果と同じように低温の作用で、蔗糖が著しく増加し始める頃に(10月末)、最大量近くに達する傾向があるので、水溶性蛋白質の増加がまえに述べたように、含水量の減少、澱粉の増加と共に低温処理効果が有効になるための1つの条件となつていとも考えられる。低温処理によつて耐凍性、蔗糖が著しく増大する時に、水溶性蛋白質は殆んど変化しない。したがつて低温処理効果があらわれるようになつてからは、蔗糖とちがつて、水溶性蛋白質は耐凍性に対して、一次的意義を有しないように思われる。春には水溶性蛋白質は3月から減少し始める。4月末~5月初め頃(低温処理効果が著しい)にすでに蔗糖の大部分(冬の値の3/4)が澱粉にかわつてしまうのに、水溶性蛋白質はまだ冬の最大量の約2/3の値を保持している。5月下旬、低温処理効果がなくなる頃に最低値(冬の1/3)に近い値に達する。

冬期に脂質が増加するという報告^{6),13),14),29),30)}が多い。桑の枝条では脂肪*は8~10月までの間は殆んど変化しないが、11月末以降著しく増大し冬期間はその状態を保つている。脂肪の耐凍性に対する役割、脂肪の増加の由来は残された問題である。併行して行なつた酵素化学的実験の結果は次回に発表する。

摘 要

1) 季節的にも、低温処理前後においても、滲透濃度と耐凍性とはほぼ完全に平行的に変化する。

2) 9月中旬以降、含水量が乾物当り約1.5以下に低下してから、低温の作用で澱粉が蔗糖に変る場合には、つまり細胞内の蔗糖濃度が高まつた場合には耐凍性が著しく増加する。含水量が3~4以上の時には蔗糖が増加してもその濃度は増せず耐凍性も増加しない。

* スダン III での組織化学的検査。

3) 蔗糖及び水溶性蛋白質の量は季節的に耐凍性の変化とほぼ平行して変る。しかし人工的低温処理効果が著しい9月及び5月初旬に、低温処理すると蔗糖は耐凍性と平行して増加するのに対し、水溶性蛋白質は殆んど増加しない。

4) 8月20日頃から9月初旬にかけて、形成層の機能が低下し、含水量の半減、それともなう浸透濃度の増大、澱粉粒の細胞内における充満、水溶性蛋白質の増加等が起ると低温処理が有効になり、それ以後、低温に遭うことによつて蔗糖が増加して、耐凍性が増大すると考えられる。

文 献

- 1) 赤羽紀雄・勾坂昭吾・斎藤正人 1954 リンゴ樹の凍害に関する研究 (I). 一年生枝及び芽の耐凍性について. 園芸学雑誌, **23**, 97.
- 2) Bacon, J. S. D. and J. Edelman 1951 The carbohydrates of the Jerusalem Artichoke and other compositate. *Biochem. J.*, **48**, 114.
- 3) Bryson, J. L. and T. J. Mitchell 1951 Improved spraying reagents for the detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, **167** (II), 864.
- 4) Ewart, M. H., D. Siminovitch, and D. R. Briggs 1954 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust in relation to its frost hardiness. VIII. Possible enzymatic process involved in starch-sucrose interconversions. *Plant Physiol.*, **29**, 407.
- 5) Hanes, C. S. 1929 An application of the method of Hagedron and Jensen to the determination of larger quantities of reducing sugars. *Biochem. J.*, **23**, 99.
- 6) Henkel, P. A. and Oknina, E. Z. 1952 Izuchenie glubiny pokoya i diagnostika ikh morozostoychivosti. izd. AN. SSSR. (Moskva)
- 7) Ivanov, S. M. 1939 Activity of growth process-principal factor in frost resistance of citrus plants. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de l'URSS.*, **22**, 277.
- 8) Jeremias, K. 1956 Zur Physiologie der Frosthärtung. *Planta*, **47**, 81.
- 9) 柏田 豊 1954 桑の炭水化物に関する研究 (I). 桑に於ける raffinose, Stachiose の存在とその消長. 日蚕誌, **23**, 325.
- 10) ——— 1955 桑の炭水化物に関する研究 (II). 桑条の遊離糖の時期的変化. 日蚕誌, **24**, 76.
- 11) ——— 1955 桑の炭水化物に関する研究 (III). 秋, 冬期に於ける桑条糖の変化と桑品種との関係. 日蚕誌, **24**, 300.
- 12) 高馬道・宮崎義光・北沢昌明 1955 果樹の耐寒性に関する研究 (I). 落葉果樹の一年生枝について. 園芸学研究集録, **7**, 54.
- 13) Krayevoy, S. Ya. i. E. Z. Oknina 1954 O morozoustoychivosti molodykh dubkokh. *Doklady Akademiy Nauk*, **95**, 677.
- 14) Levitt, J. 1956 *The Hardiness of plants.* (New York)
- 15) Levy, M. and A. H. Palmer 1928 Jodometric estimation of small quantities of Nitrogen without distillation. *J. Biol. Chem.*, **136**, 57.
- 16) Partridge, S. M. 1948 Filter-paper partition chromatography of sugar. 1. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple Juice, egg white and foetal blood of sheep. *Biochem. J.*, **42**, 238.
- 17) Pisek, A. 1950 Frosthärte und Zusammensetzung des Zellsaftes bei *Rhododendron ferrugineum*, *Pinus cembra* und *Picea excelsa*. *Protoplasm.* **39**, 129.
- 18) Parker, J. 1957 Seasonal changes in some chemical and physical properties of living cells of *Pinus ponderosa* and their relation to freezing resistance. *Protoplasma*, **48**, 148.

- 19) 酒井 昭 1955 桑枝条の發育過程と耐凍性獲得の關係. 低温科学, 生物篇, **13**, 21.
- 20) ———— 1955 桑の耐凍性及び皮層柔細胞の生理的状态の季節的变化. 低温科学, 生物篇, **13**, 33.
- 21) ———— 1956 耐凍性の持続及びそれに及ぼす温度の影響 (I). 低温科学, 生物篇, **14**, 1.
- 22) ———— 1956 超低温に於ける植物組織の生存. 低温科学, 生物篇, **14**, 17.
- 23) ———— 1956 植物に於ける耐凍性増大と外圍温度. 低温科学, 生物篇, **14**, 7.
- 24) Siminovitch, D. and D. R. Briggs 1949 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness. 1. Seasonal variations in protein content. *Arch. Biochem.*, **23**, 17.
- 25) ———— 1953 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness. III. The validity of plasmolysis and desiccation tests for determining the frost hardiness of bark tissue. *Plant Physiol.*, **28**, 15.
- 26) Siminovitch, D. 1953 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness. IV. Effects of ringing on translocation, protein synthesis and the development of hardiness. *Plant Physiol.*, **28**, 177.
- 27) ———— 1953 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust in relation to its frost hardiness. V. Seasonal transformations and variations in the carbohydrates; starch-sucrose interconversions. *Plant Physiol.*, **28**, 383.
- 28) Siminovitch, D. and D. R. Briggs 1954 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust in relation to its frost hardiness. VII. A possible direct of starch on the susceptibility of plants to freezing injury. *Plant Physiol.*, **29**, 331.
- 29) 田口亮平 1939 桑樹の枝条並びに根に於ける水分及び貯藏物質の季節的变化について. 九大農学部, 学芸学雑誌, **18**, 4.
- 30) ———— 1953 牧獲法を異にする桑樹の地下部に於ける貯藏物質含有量の季節的变化. 信大繊維学部 研究報告, **3**, 1.
- 31) Vasiliyekh, I. V. 1956 *Zimovkh rasteniy. izd-vo AH. SSSR. (Moskva)*
- 32) 傍島善次 1949 落葉果樹の形成層の季節的活動. 園芸学研究集録, **4**, 37.

Résumé

More precisely to trace the relationship of the contents of carbohydrate constituents and water soluble protein to the grade of frost hardiness, some experiments were made on the cortical tissues of the last year twig in mulberry tree which had been artificially hardened (at 0°C for 10 days), and in parallel the seasonal changes of the content of these substances and of the frost hardiness were also investigated.

Small twig pieces (0.6–0.7 cm in diameter, 1.5 cm in length) were used for the following freezing test. The twig pieces placed in glass dish (diameter 3 cm, depth 1 cm) were cooled in the thermostat of a desired temperature; after 30 minutes they were inoculated with ice and then allowed to stand for 4 hours which may be an ample time to complete freezing of the twig pieces. After 4 hours, freezing, the twig pieces were thawed at room temperature, then thin tangential sections were made from the cortical layer of the piece. The survival percentage of parenchyma cells of the cortical layer in the sections was determined by vital staining with neutral red solution and by the plasmolysis method.

The grade of frost hardiness was represented by the minimum temperature at which

almost all of the parenchyma cells were able to survive after a definite period of exposure to subzero temperatures.

From these experiments the following conclusions were obtained.

1) There is an intimate correlation, between the increase of the osmotic concentration and that of the frost hardiness in the parenchyma cells (fig. 1, 2). While the length of time during which the parenchyma cells can withstand continuous freezing (below -10°C) becomes longer from December on, their osmotic concentration which has reached its maximum in December, still retains the same values to early spring. Accordingly, the capacity to withstand continuous freezing cannot be indicated only by the values of the osmotic concentration of the cells at any one particular time.

2) After the middle of September, when the decrease of the water content and the increase in the sucrose content per dry weight of the cortical tissues result in an increase of the sucrose concentration of the parenchyma cells, those cells distinctly become frost resistant (fig. 2).

3) There is a parallel correlation, in the twig cortex, among the concentrations of sucrose (fig. 2), and of water soluble protein (fig. 4) and the degree of frost hardiness (fig. 1), in the seasonal variations. But in September and early May at which times the artificial hardening is remarkably effective, the increase in the frost-hardiness is closely proportional to the increasing of the sucrose concentration, but not to that of water soluble protein (table 3).

4) Between 20 August and 5 September, there are various considerable changes in the cortical tissues, namely, the decrease of the water content (per dry weight; from 3.5 to 1.6) (fig. 3), that of the activity of the cambium cells (cambium cell layers; from 10 to 5) (fig. 3), the increase of the water soluble protein (fig. 4), that of starch granules (fig. 2) and that of the osmotic concentration (0.25 0.35 Mol) (fig. 1). Unless these various changes in the cortical tissues take place, they can not be hardened artificially by subjection to low temperatures.

5) When the twig had been hardened at 0°C for 10 days, the dehydration resistance measured by Siminovitch's method, in the parenchyma cells, greatly increased over that of the control (unhardened twig) (table 4), but, at that time, the osmotic concentration of the former (0.6 Mol) was 50% higher than that of the latter (0.4 Mol). In order to exclude the influence of the change of the osmotic concentrations resulting from the artificial or natural hardening, as test solutions balanced salts solutions were used having a concentration of five times and eight times isotonicity that of the cells at that time. The experimental results showed that the greater part of the difference of the dehydration resistance obtained by the Siminovitch method are due to the increase of the osmotic concentrations of the cells which resulted from the hardening treatment, artificial or natural²³⁾. It is safely said, therefore, that employment of the values of the dehydration resistance of the cells obtained by Siminovitch's method as a measure of the frost-resistance capacity, involves much risk.