



Title	タマネギの耐凍性について
Author(s)	照本, 勲; TERUMOTO, Isao
Citation	低温科学. 生物篇, 15, 39-44
Issue Date	1957-11-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17596
Type	departmental bulletin paper
File Information	15_p39-44.pdf



タマネギの耐凍性について*

照 本 勲

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和32年6月受理)

I. 緒 言

植物が凍結するとある場合には組織が破壊されその凍結が致命的となる。また、ある植物では固く凍結しても融解するともとの状態に戻って生活を続けることが出来る。凍結して細胞内に氷が出来た(細胞内凍結)ものは融解しても原形質はもとに戻らず破壊されてしまう。また、細胞の外側のみ氷が生ずる場合(細胞外凍結)は細胞から水が細胞外表面に引き出されて凍結し、融解すると水は再び細胞に吸収されもとの状態にもどる。この場合もし温度が非常に低いか又は凍結時間が長い時には、主として原形質の極端な脱水により細胞は凍死してしまう^{1),2)}。

畑で冬を越す蔬菜類は、晩秋気温が下るにつれ自然に耐凍性をえて、一度凍結しても融解するともとに戻るのが普通である。タマネギは昔から耐凍性のない³⁾、すなわち畑で冬をこせない蔬菜類の一つに数えられているが、タマネギもまた低温にさらされることにより、また原形質分離剤の影響で耐凍性が得られることが実験的に確かめられたので報告する。

II. 方 法

温度処理はタマネギ (*Allium Cepa* L.) の鱗茎を二群にわけ、一群を 25°C、他を 0°C 恒温箱中に暗黒のまま保存した。実験は 3 月、4 月にわたって行つた。生死の判定には 1:10,000 の濃度の中性赤(水道水にとかす)中で組織切片を約 30 分間生体染色し、その後 0.5 M 蔗糖溶液に切片をうつして原形質分離の有無を調べた。

固定には Wolman and Behar の低温固定⁴⁾を使用した。固定切片は -10°C に冷却した abs. alcohol+acetic acid (容積 9:1) 混合液に、凍結させた組織小片をそのまま早く投入し 4 時間固定する。組織小片の大きさは 5 mm³ 内外とする。対照は凍結させず直接 -10°C の固定液で固定した。固定後室温にうつし一晩 abs. alcohol で脱水する。染色は Delafield's hematoxylin 及び safranin で行つた。

固定切片での細胞内凍結、細胞外凍結の細胞様式は次のごとく判定した。原形質がばらばらに破壊されて凝固し、核も異状なものを細胞内凍結とし、原形質、核共正常で破壊なく細胞

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 366 号

膜と原形質とが分離状をしているものを細胞外凍結とした。

III. 結 果

実際に実験してみるとタマネギは案外寒さに強く、鱗茎のまま -10°C 以上の温度で凍結させると外側から数枚の鱗片葉が融解後透明になるが、細胞は死んでいないのが普通である。例えば3週間 deharden されたタマネギを鱗茎のまま、 -7°C で24時間凍結させると、凍結で鱗片葉は透明に変ってくるが外側表皮、柔組織及び内側表皮ともに生きていることが生体染色、原形質分離法によつて確かめられた。但し -15°C で2時間鱗片葉を凍結させるとそれは致命的となる。

1. 処理日数による滲透濃度と凍結様式の変化 25°C ならびに 0°C の恒温箱中に入れ人工的に deharden 及び harden させた鱗茎の、外側から2, 3層目の鱗片葉を凍結実験に用いた。すなわち -15°C で2時間凍結させ、その一部を前記方法で固定して、細胞内が凍つたか否かを調べ、残りの部分を融解させ原形質分離法で生死の判定を行つた。結果は第1表に示してある。表中の滲透濃度は鱗片葉の外側の表皮についての値であり、内側表皮はこの値より約 0.04 M づつ低い。

第1表 処理日数と凍結様式の変化

処 理 日 数	原形質分離 (蔗糖)	凍結融解後の生死	固 定 像
1 週 間	25°C	死	細胞内凍結
	0°C	死	細胞内凍結
2 週 間	25°C	死	細胞内凍結
	0°C	生	細胞外凍結
3 週 間	25°C	死	細胞内凍結
	0°C	生	細胞外凍結

鱗片葉 -15°C 2時間凍結後の結果

1週間処理ではまだ処理温度による滲透濃度の変化は見られず、 -15°C 2時間の凍結条件で細胞は全部死んでいる。固定による切片からの結果は全部細胞内凍結をおこしていることを示している。

2週間処理では滲透濃度に差を生じ、 0°C 処理のものすなわち harden されたもののみ、凍結されても細胞は生き残っている。harden されたものの固定像では各細胞は原形質分離を起しているように見えるが、deharden されたものでは原形質が破壊され凝固しているように見える。このことは hardy な状態の細胞は細胞内部の凍らないのに対し、deharden されたものの細胞内部が凍つた事を示すもので凍結様式にも相違が生じたことは明らかである。

3週間目の結果は2週間目の結果と同じであつた。

以上の結果からタマネギも他の耐凍性をもつ植物と同じように、低温処理されることによ

り滲透濃度を増加し細胞外凍結をするようになり、凍死からまぬかれることが出来るようになることが明らかである。

2. 原形質分離の状態での凍結 細胞が単に脱水され滲透濃度を増加することにより、細胞内凍結を防げるものであるか否かを確かめるために次の実験を行った。

分離剤として種々の濃度の塩類、尿素、グリセリン、蔗糖の溶液を用い、予め生体染色した切片を数片ずつ各分離剤に15分間つけて、まづ原形質分離の有無を調べた。その後そのまま切片はスライドガラスの上にのせ、カバーガラスをかけて、このままで凍結させたのである。-15°Cで2時間凍結させた後、室温で融解後検鏡し原形質分離状のままに残っている切片を水道水(中性赤を1:10,000の割に含む)に戻し原形質復帰させ、再び0.5M蔗糖液で原形質分離をするか否かを調べた。分離した切片を(+)として記載する。その結果は第2表にまとめてある。NaCl, KNO₃, 尿素溶液では分離のまま凍結させても細胞は傷害を受けたが、CaCl₂, グリセリン及び蔗糖溶液では融解後正常に原形質復帰及び分離をした。この結果には滲透濃度の外に分離剤の質による影響がはつきり現われている。塩溶液で1価のNa⁺及びK⁺を含むばあいは全く耐凍性が見られないのに反し、2価のCa²⁺を含むときにはその濃度も0.3M以上になると凍結に耐えるようになる事実から考えると、原形質膜の状態変化が関係しているものと思わ

第2表 原形質分離の凍結に及ぼす影響

分離剤		濃 度							
		0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.75	1 M
NaCl	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
KNO ₃	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
CaCl ₂	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	+	+	+	+	+
尿 素	前	-	-	-	-	-	±	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
グ セ リ ン	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	+	+	+	+	+
蔗 糖	前	-	-	-	-	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	+	+	+	+
蔗 糖*	前	-	-	-	-	+	+	+	+
	後	+	+	+	+	+	+	+	+

「前」は各濃度による原形質分離の有無

「後」は-15°C2時間凍結後の切片の生死

* 35日0°C処理した試料, 他は未処理

れる。なをこの他分離剤の種類により分離液中の氷の生長様式の変化も考慮に入れるべき問題で、共に今後の研究にまたねばならない。

低温処理で hardy になっている試料は、原形質分離をしていない状態でもこの程度の凍結には充分耐えられるが、凍結程度が -30°C 位になると完全に傷害を受ける。

3. エチレングリコールの影響 グリセリンなどと同じように細胞内凍結を防ぐと考えられているエチレングリコールの影響をみた。その結果を第3表に示した。タマネギの細胞はエチレングリコールに対してはかなり透過性があり、この溶液に入れられると1時細胞は収縮するが、間もなく元の状態にもどる。例へば1Mでは1.5分、0.75Mでは3分、0.5M溶液では10分の短時間で透過する。

第3表 エチレングリコール処理の影響

	濃 度							
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.75	1 M
生 体 染 色	+	+	+	+	+	+	+	+
エチレングリ コールの処理	-	-	-	-	±	+(10分)	+(3分)	+(1.5分)
-13°C 2時間凍 結融解後の状態	-(破壊)	-(//)	-(//)	-(//)	+(分離状)	+(//)	+(//)	+(//)
0.5 M 蔗糖液に よる原形質分離	-	-	-	-	+	+	+	+
水道水に戻し て原形質復帰					+	+	+	+

第3表からエチレングリコールが約0.4M以上の濃度に細胞内に入っていれば、タマネギの細胞も凍結にたえることが出来ることは明らかである。然し凍結温度が -32°C のときはやはり害を受けた。

予め0.2M、0.75Mのエチレングリコール溶液中に30分間放置した切片を、各々 -13°C で2時間凍結せしめ前述の方法で凍つたまま固定して見た。その結果0.2M溶液で処理された方は細胞内凍結を、0.75M溶液のばあいには細胞外凍結をすることが判つた。エチレングリコールによるこのような凍結様式の変化は、高調溶液による脱水だけでは説明できない^{3),4)}。

委しくは実験を重ねた上別報で論ずることとする。

摘 要

1. タマネギを低温処理(0°C)すると2週間目から耐凍性をもち、滲透濃度をまし -15°C で2時間の凍結に耐えられるようになる。このような細胞は Wolman and Behar の低温固定法で固定し検鏡した結果、細胞外凍結をおこすようになることが明らかになった。

2. 種々の分離剤で原形質分離した細胞は、塩化カルシウム、グリセリン及び蔗糖溶液を

分離剤として用い、そのまま凍結させても傷害は認められなかった。塩化ナトリウム、硝酸カリ及び尿素溶液を用いた場合は、原形質分離をしているにもかかわらず著しい凍害を受けた。

3. エチレングリコールを細胞に充分入れてやると、細胞は細胞内凍結をおこさなくなる。

最後に、この研究について御指導下さった青木藤教授、ならびに有益な御助言をいただいた朝比奈助教授に深く感謝する。

文 献

- 1) Asahina, E. 1956 The freezing process of plant cell. *Cont. Inst. Low Temp. Sci.*, No. 10.
- 2) Levitt, J. 1941 Frost killing and hardiness of plants. A Critical Review. Minneapolis.
- 3) Lovelock, J. E. 1953 The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Bioch. Biophys. Acta.*, **11**, 28.
- 4) Luyet, B. J. and J. F. Keane, Jr. 1953 On the role of osmotic dehydration in the protective action of glycerol against freezing injury. *Biodyn.*, **7**, 141.
- 5) Scarth, G. W. and J. Levitt 1937 The frost-hardening mechanism of plant cells. *Plant Physiol.*, **12**, 51.
- 6) Wolman, M. and A. Behar 1952 A method of fixation for enzyme-cytochemistry and cytology. *Exp. Cell Res.*, **3**, 619.

Résumé

It has generally been considered that the onion is an unhardy plant which can not be hardened by exposure to low temperatures. Such belief seems, however, to be based on insufficient evidence. So an attempt was made to get some certain evidence as to the frost-hardiness of onion.

The outer epidermal cells of scale leaf could be artificially made frost-hardy by exposure to low temperature (at 0°C for 2-3 weeks). In addition, by dehydration in hypertonic medium, their frost-resistance was markedly increased, in this case, however, besides the hypertonicity of the solutions, the nature of solutes in them exerted a decisive influence on the gaining the frost-resistance. In plasmolysed state in the hypertonic solutions of sucrose, glycerol and CaCl₂, the cells obviously showed high frost-resistance; on the contrary the hypertonic solutions of NaCl, KNO₃ and urea were absolutely not effective for increasing the frost-hardiness.

Microscopic observations on the cells fixed in frozen state in the cold fixative (-10°C) of Wolman and Behar clearly revealed that the interior of the cells being not frost-hardy, easily freezes (intracellular freezing), but in all cases of frost-hardy cells freezing does not occur in the cell interior, that is to say, ice is produced only outside of the cells (extracellular freezing). From the facts mentioned above, it may be concluded that the non-freezing of cell interior at subzerotemperatures, in other words, prevention of seeding of ice into cell interior from the outside where ice crystals have formed, is closely related with the state of the protoplasmic membrane of cells.

Ethylene glycol fairly permeable into the cells was a good protective agent against freezing. After 20 minutes' immersion in the ethylene glycol solutions stronger than 0.4 M, the cells became frost-hardy and became able to withstand freezing.

図 版 説 明

- 第1図 タマネギ鱗片葉の外側表皮。
低温固定したもの(対照)。
- 第2図 同上。3週間 deharden 後, -15°C 2時間凍結。
融解後生体染色 (-)。
- 第3図 同上。3週間 harden 後, -15°C 2時間凍結。
融解後生体染色 (+), 原形質分離 (+)。
- 第4図 同上。3週間 deharden 後, 凍結して低温固定
したもの(細胞内凍結)。
- 第5図 同上。3週間 harden 後, 凍結して低温固定し
たもの(細胞外凍結)。

(各 $\times 360$)

