



Title	植物細胞の低温固定像について
Author(s)	照本, 勲; TERUMOTO, Isao
Citation	低温科学. 生物篇, 16, 1-5
Issue Date	1958-12-05
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17603">https://hdl.handle.net/2115/17603</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	16_p1-5.pdf



## 植物細胞の低温固定像について\*

照 本 勲

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和 33 年 7 月受理)

### I. 緒 言

一般に植物が凍結する際には、細胞内凍結と細胞外凍結の二つの凍結様式が知られている<sup>2)</sup>。現在、植物の凍結様式を知るためには、顕微鏡下で実際に細胞あるいは組織切片を冷却してゆき、凍結が始まる過程を観察するか、あるいは凍結している細胞を凍つたまま観察するという以外に適当な方法はない。この方法は確かに一番確実ではあるが、それには相当の設備を必要とする。もし細胞が凍つたそのままの状態で固定されることができ、どのような凍結の状態かを判定することが出来れば、植物の凍害に関する研究をすすめる上に非常に便利である。組織化学的に酵素反応(特にフォスファターゼ)を検出する場合に、組織を固定するのに Wolman and Behar (1952) の低温固定法が利用されるが、著者はこの低温固定法を凍結している組織に応用して、植物組織の凍結様式の判定に役立つことを知つたので報告する。

### II. 方 法

材料としては、寒さに弱いものと耐凍性のあるものを選んだ。

アカビート ( <i>Beta vulgaris</i> L.) の葉、葉柄	耐凍性がある
ダイズ ( <i>Glycine Max</i> Merrill) の胚軸	耐凍性がない
バレイショ ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) の塊茎	耐凍性がない
タマネギ ( <i>Allium Cepa</i> L.) の鱗茎	耐凍性がある
ネギ ( <i>Allium fistulosum</i> L.) の鱗茎	耐凍性がある

試料としては、一個体のままの植物を用い氷点附近の高い温度で人為的に植氷した後、適当な温度(-5°~-20°C)にさらした。冷却速度はかなり遅い。凍結試料を低温室内で長さ5 mm内外の組織小片として、それを-10°Cに冷却してある Wolman and Behar の固定液(純アルコール+氷酢酸 19:1 容積)に、そのまま早く投入し4時間-10°Cで固定する。対照小片は凍結させない新鮮な試料を直接-10°Cの固定液で固定する。その後室温(約10°~15°C)の純アルコールに移し一晚放置する。脱水した試料を徒手切片又はパラフィン切片とし、染色はデラフィールドのヘマトキシリン及びサフラニンで行つた。

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第441号

## III. 結 果

1. アカビート (第7, 8 図) 冬期間中のものは耐凍性を有しており<sup>1), 4), 6)</sup>, 一般には凍結したものを $-20^{\circ}\text{C}$  に冷却して1時間おいても凍死することはない。固定像は葉、葉柄の細胞ともに対照と変りないか、または葉柄の組織で細胞はたてに離れ易くなるのが認められる。これはこの時期には細胞間隙が大きくなり、そこで細胞からとられた水が氷になつて、細胞を一層又は一条に分離しやすくするためであろう。

図にあげた試料は、初秋(10月上旬)のアカビートの葉柄を $-5^{\circ}\text{C}$  で2時間凍結させたのち固定したものと、この時期のものを $25^{\circ}\text{C}$  の高温で処理して耐凍性を失わしめた (dehardening) ものを、同じ条件で凍結させたものである。固定に使用した部分以外の試料は室温で融解し、原形質分離法で生死を判定した。明らかに無処理のものは融解後も細胞は生きており、高温処理したものは細胞膜、核、原形質ともに破壊されている。無処理のものは細胞外凍結を、deharden されたものは細胞内凍結をするかどうかは、この実験では直接確めなかつたが、前の著者達<sup>1)</sup> の実験から、この凍結条件では恐らく前者は細胞外凍結、後者は細胞内凍結をしていたと考えられる。固定像では前者は細胞膜、原形質、核共に正常で破壊されることなく細胞膜と原形質とが、ところどころ分離をしていることがある(第7 図)。後者は原形質がばらばらに破壊されて凝固し、核も異常を呈している(第8 図)。つまり蔗糖液中で原形質分離をしない障害を受けている細胞は固定像にも異常が現われているが、生きてような条件の細胞には固定像にも異常はみられない。故に、低温固定像から細胞外凍結、細胞内凍結を判断することが出来る。

2. ダイズ (第6 図) ダイズは発芽皿で24時間、又は48時間発芽したものの胚軸を氷点附近で植氷して凍らせてから $-20^{\circ}\text{C}$  に1時間さらした後、低温固定した。ダイズは寒さには非常に弱く、固定像は細胞膜、原形質、核共に破壊凝固している。

3. バレイショ バレイショは耐凍性のない植物として知られているが、凍結に際して細胞膜は破壊し、澱粉粒の細胞内の配置がみだされて、かたまり状となつて固定される。

4. タマネギ 低温処理( $0^{\circ}\text{C}$ , 2~3週間)で人為的にhardeningした組織は、 $-15^{\circ}\text{C}$  2時間の凍結に際し細胞の破壊はおこらず、固定像は細胞膜の内側、すなわち細胞膜と原形質とが原形質分離状をしていて、その間に空隙が認められる<sup>9)</sup>。低温処理をしないもの、つまり耐凍性をもたない細胞では、この凍結条件では恐らく細胞内凍結をしていたと考えられる。このような細胞では原形質も核も共に破壊されている。

5. ネギ (第1~第5 図) 低温処理( $0^{\circ}\text{C}$ , 2~4 週間)で耐凍性をもたせた組織、ならびに耐凍性のない組織を $-15^{\circ}\text{C}$  で2時間凍結させて、その結果を第1表にあらわした。

たとえば $0^{\circ}\text{C}$  で4週間hardening処理したネギを $-15^{\circ}\text{C}$  2時間凍結し(第1表)、一部を室温で融解後小切片をつくり、中性赤(1:10,000)で30分間生体染色後、原形質分離法で生死を判定した。その結果、hardeningされたものでは全部生き残ることがわかつた。朝比奈<sup>2)</sup>に

第1表 ネギの耐凍性の有無と固定像

処 理	dehardening			hardening		
	外側表皮	柔細胞	内側表皮	外側表皮	柔細胞	内側表皮
生 体 染 色*	—	—	—	+	+	+
原 形 質 分 離**	—	—	—	+	+	+
固 定 像	核, 原形質破壊			核, 原形質正常。細胞膜と原形質との間に間隙。		

\* 中性赤にて生体染色

\*\* 分離剤は 0.5 M 蔗糖溶液

よれば細胞内凍結は必ず致命的であるから、生存細胞はすべて細胞外凍結と考えられる。同時に残りの部分を凍結のまま低温固定してその固定像を調べたところ、hardening されたものは原形質、核共に正常で、細胞膜と原形質の間に間隙を有し、dehardening されたものでは原形質の破壊が特に目立つ。

以上の結果から、細胞外凍結を起したと判断できるばあいの固定像は、hardening されたアカビート、タマネギ、ネギの細胞にみられるように、原形質、核共に正常であり、ときには細胞膜と原形質とがところどころ分離状をしていることもある。細胞内凍結を起したと判断できるばあいの固定像は、ダイズ、バレイショの細胞と、アカビート、タマネギ、ネギの dehardening された細胞にみられたように、原形質が破壊され凝固し、核も異常である。したがって固定像から細胞外凍結、細胞内凍結の判定ができる。

### 摘 要

植物が凍結する際には、細胞内凍結と細胞外凍結の二つの凍結様式が知られる。顕微鏡下で実際に細胞又は組織切片を冷却してゆき、凍結過程を観察する方法によらず、もし細胞が凍ったままの状態で固定されれば、この凍結様式を判定するのに非常に便利である。固定法は試料を凍結し、 $-10^{\circ}\text{C}$  に冷却してある Wolman and Behar の固定液 (純アルコール+氷酢酸 19:1 容積) に 4 時間固定後室温の純アルコールで脱水する。それを切片とし染色して顕微鏡で調べた。

アカビート、ダイズ、バレイショ、タマネギ、ネギの 5 種類の植物組織について試みたが、凍結後中性赤による生体染色、原形質分離による細胞の生死の判定を同時に行つて、細胞外凍結を起したと思われるばあいの固定像は原形質、核共に正常で細胞はところどころ原形質分離状を呈することがある。細胞内凍結を起したと思われるばあいは原形質が破壊凝固し、核も異常を呈する。したがってこの固定像から細胞外凍結、細胞内凍結を区別出来ることが明らかになった。

最後に、この研究について御指導下さつた青木藤教授、ならびに有益な御教示をいただい

た朝比奈英三教授に感謝する。

#### 文 献

- 1) 青木 廉・朝比奈英三・照本勳 1953 生物の凍結過程の分析 IX, 植物の耐凍性と凍結曲線の型. 低温科学, **10**, 69.
- 2) Asahina, E. 1956 The freezing process of plant cell. Cont. Inst. Low Temp. Sci., No. **10**, 83.
- 3) 照本 勳 1956 植物組織の酸性フォスファターゼの検出について. 低温科学, 生物篇, **14**, 29.
- 4) ——— 1957 アカビートの耐凍性とフォスホリラーゼ. 低温科学, 生物篇, **15**, 31.
- 5) ——— 1957 タマネギの耐凍性について. 低温科学, 生物篇, **15**, 39.
- 6) ——— 1958 植物の耐凍性と滲透濃度. 低温科学, 生物篇, **16**, 7.
- 7) Wolman, M. and A. Behar 1952 A method of fixation for enzyme-cytochemistry and cytology. Exp. Cell Res., **3**, 619.

#### Résumé

The modes of the process of freezing in plant tissue can usually be classified into two fundamental types, viz., intracellular and extracellular freezing. The determination of these types has so far been done mainly by the direct microscopic observation of the actual freezing of cells in cold room. Nevertheless, by means of cold fixative, this can be done at an ordinary room temperature.

The Wolman and Behar's method was applied to plant cells. The frozen tissue pieces were fixed in chilled mixed solution (abs. alcohol-acetic acid mixture 19:1 vol. s) at  $-10^{\circ}\text{C}$ . Fixation lasted for 4 hours and was followed by dehydration overnight in abs. alcohol at room temperature. Control tissue pieces were fixed in chilled mixed solution without previous freezing. These tissues were sectioned by hand or were prepared by ordinary paraffin method.

The fixed pattern in hardened plants suggests the occurrence of extracellular freezing of their cells; the figure both in nucleus and in cytoplasm is quite normal. The tissue cells of hardy plant, frozen in the same way but not fixed, were found to be alive. At least under the present experimental conditions, freezing was fatal in dehardened plant tissue as well as in unhardy material, and the fixed figure in the interior of these tissue cells showed a remarkable destruction which was probably caused by intracellular freezing.

It may, therefore, be safely said that the mode of the freezing process in plant cells can be determined by observation of the figure of frozen cells which have been fixed by Wolman and Behar's cold fixative.

## 図 版 説 明

- 第 1 図 ネギ鱗茎の内側表皮細胞。凍結させない新鮮な組織を低温固定したもの (対照)。
- 第 2 図 同上。4 週間 deharden 後,  $-15^{\circ}\text{C}$  2 時間凍結。融解後の細胞は生体染色しない。
- 第 3 図 同上。4 週間 harden 後,  $-15^{\circ}\text{C}$  2 時間凍結。融解後の細胞は生体染色し, 原形質分離する。
- 第 4 図 同上。4 週間 deharden,  $-15^{\circ}\text{C}$  2 時間凍結後低温固定したもの。原形質の破壊しているのが見られる (細胞内凍結)。
- 第 5 図 同上。4 週間 harden,  $-15^{\circ}\text{C}$  2 時間凍結後低温固定したもの。細胞膜と原形質との間に間隙が見られる (細胞外凍結)。
- 第 6 図 ダイズの胚軸。 $-20^{\circ}\text{C}$  1 時間凍結後低温固定。パラフィン切片としたもの (細胞内凍結)。
- 第 7 図 アカビートの葉柄の柔細胞。耐凍性をもつた組織を  $-5^{\circ}\text{C}$  2 時間凍結後低温固定したもの。原形質正常, 細胞膜と原形質との間に間隙が見られる (細胞外凍結)。
- 第 8 図 同上。deharden,  $-5^{\circ}\text{C}$  2 時間凍結後低温固定したもの。原形質の破壊, 核の異常が見られる (細胞内凍結)。  
(各  $\times 360$ )





