



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物細胞の細胞外凍結による害 I : 連続的凍結状態において速く害が現われる温度範囲
Author(s)	酒井, 昭; SAKAI, Akira
Citation	低温科学. 生物篇, 16, 35-39
Issue Date	1958-12-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17606
Type	departmental bulletin paper
File Information	16_p35-39.pdf



植物の細胞外凍結による害 I*

連続的凍結状態において速く害が現われる温度範囲

酒 井 昭

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和 33 年 7 月受理)

I

細胞内凍結や細胞外凍結の問題は凍害や耐凍性増大に関する問題の基礎をなしている。冬季の耐凍性の大きい木の細胞では草本類とちがつて、細胞内凍結よりも細胞外凍結の方がより問題である。細胞外凍結の問題を抜かう場合に一番困る事は細胞内凍結による害を除く事である。そのためには細胞内凍結を起す危険のないある温度で植氷して、細胞外凍結を起させてから、以後小さい冷却速度で冷却する事が適当である。然し一部の研究者^{1),2)}は植氷しないで、冷却速度を小さくして細胞内凍結を防ごうとしている。この場合、冷却速度が小さいためにより低い温度まで過冷却してから細胞内凍結を起すのでむしろ危険な場合が多い。

本報では細胞内凍結が起りがたい耐凍性の大きい木の枝の細胞を用いて細胞内凍結が起る要因を除くようにした。いろいろな温度で細胞外凍結状態においた場合、どの温度範囲で害が早く現われるかを調べて、細胞外凍結によつて生ずる害の機構の一端を知る第一段階として本実験を行つた。

御校閲して頂戴いた朝比奈教授に謝意を表わします。

II

材料はクワ (*Morus bombycis* Koidz) の品種タキノカワの1年生枝を用いた。1~5月迄に採集した材料を用い、4月以降は材料は採集後、 -5°C の温度で充分低温処理した材料を $-3^{\circ}\sim -5^{\circ}\text{C}$ の温度に貯蔵して使用した。細胞外凍結状態で貯蔵する温度は -10° 、 -15° 、 -20° 、 -30° 、 -35° 、約 -70° 及び -183°C (液体酸素)の各温度を用いた。 -25°C 以上の各温度はそれぞれの温度の恒温箱中にて貯蔵した。約 -70°C の場合はデューワー瓶中にドライアイスを入れて冷却した。枝の小片(長さ1.5 cm, 太さ0.6~0.8 cm)が -10°C に冷却した時、植氷して過冷却を破つてから小片の両端にワセリンをつけて小試験管(長さ10 cm, 外径1 cm)中に入れて、ゴム栓をして冷却した。同一系統の実験には同一枝の同一節間の部分を使用した。小片の温度が外圍

* 北海道大学低温科学研究業績 第451号

温度に達したかどうかは小片の髓部に細い寒暖計を挿入してその読みから判定した。一定期間凍結後に小片を取出して、皮層細胞の縦断切片を1小片について、10~15個切取つて、中性赤でそめてから、高張平衡塩溶液中で原形質分離させて生存率を調べた。

III

実験1. -20°C と -30°C の温度で細胞外凍結状態においた場合の生存率の比較 この両温度に細胞外凍結しておいた場合に、どちらの温度においた場合が早く害を生ずるかを調べるために、同一枝の同一節間からとつた枝の小片を -10°C まで冷却し、その温度になつてから植氷して過冷却を破つてから、小試験管に入れて -20°C の恒温箱に入れて冷却し、8時間後に -30°C の部屋に移した。その温度に達してから1日後と8日後に枝の小片を取出して生存率を調べた。第1表にその結果を示した。枝の小片を両温度にそれぞれ1日間凍結しておいた場合には、いずれの温度においても害された細胞は認めたいが、さらにその温度に7日間おいた場合には、4個体とも -30°C ~ -35°C においた方が、 -20°C ~ -25°C においた時よりも生存率ははるかに高い事が判つた。

第1表 -20°C ~ -25°C と -30°C ~ -35°C の温度における生存率の比較

凍結期間	個体番号	細胞外凍結温度	
		-20°C ~ -25°C	-30°C ~ -35°C
1日	No. 1	100*	100
	No. 2	100	100
	No. 3	100	100
	No. 4	100	100
8日	No. 1	10	40
	No. 2	25	40
	No. 3	35	70
	No. 4	50	90

* 皮層細胞の生存率 (%)

第2表 -30°C と -70°C の温度における生存率の比較

凍結期間	個体番号	細胞外凍結温度	
		-30°C	-70°C
1日	No. 1	100*	100
	No. 2	100	100
	No. 3	100	100
8日	No. 1	60	90
	No. 2	45	70
	No. 3	75	100

* 皮層細胞の生存率 (%)

実験2. -30°C と約 -70°C で細胞外凍結状態におかれた場合の生存率の比較 前と同じ方法で冷却した。第2表から -30°C で貯蔵した方が約 -70°C で貯蔵した場合よりも害が早く生ずる事が判つた。

上の結果から -20°C 以下の温度では、貯蔵温度が低下する程、害が現われにくくなる傾向が明らかとなつたので、 -10°C 、 -20°C 及び -30°C の温度範囲について次に比較してみた。

実験3. -10°C ~ -30°C の各温度で細胞外凍結状態においた場合の生存率の比較 第3表から明らかな様に枝の小片の温度が外圍温度と平衡になつたと思われる時から4日間貯蔵した後は、各温度において生存率の上に殆んど差がないが、12日間おいた時には明らかな差がある。 -15°C と -20°C とにおいた場合に生存率の低下が著しい。次に各温度で貯蔵して期間

第3表 各温度における生存率の比較

凍結期間	個体番号	細胞外凍結温度			
		-10°C	-15°C	-20°C	-30°~35°C
4日	No. 1	80*	—	70	80
	No. 2	100	—	80	100
	No. 3	100	100	100	100
12日	No. 1	40	—	5	25
	No. 2	80	—	20	50
	No. 3	80	45	50	80

* 皮層細胞の生存率 (%)

を追って生存率の変化を調べてみた。

実験4. -10°~-183°Cの間の各温度で細胞外凍結状態においた場合の生存率の比較
材料は全て同一の枝を用い、同一日に取出す材料は同一節間の部分を6等分して用いた。次に取出す材料は次の節間の部分を同様に6等分して用いたので、枝の部分による差は出来る丈除かれた。用いた材料では耐凍性が大きかったため、各温度に8日間貯蔵した後においても生存率の差は少なかったが、15日以後、差は漸次増大して22日後には明らかな差を生じた。-10°C, -30°~-35°C, 約-70°C及び-183°Cの各温度の間には少なくとも貯蔵期間中には明らかな差を見出し得なかつた。生存率の上昇し始める温度が-20°C近くにあるのか、-30°C近くにあるのかを知るために、次に-20°C, -25°C, 及び-30°Cの温度範囲について調べてみた。

第4表 各温度に各期間おいた場合の生存率の比較

凍結期間	細胞外凍結温度					
	-10°C	-15°C	-20°C	-30°~-35°C	約-70°C	-183°C**
4日	100*	100	100	100	100	100
8日	90	70	80	90	90	—
15日	80	50	50	70	80	—
22日	80	10	20	70	80	90

* 皮層細胞の生存率 ** 液体酸素中に入れておいた場合

実験5. -20°C, -25°C及び-30°~-35°Cの温度で細胞外凍結状態においた場合の生存率の比較 第5表より-20°Cより-25°Cの温度の方がより高い生存率を示す傾向がある。以上の実験は耐凍性が大きい材料についての結果で、-15°~-20°Cの温度に細胞外凍結状態で貯蔵した場合でも、害が現われるのは少なくとも4~5日後、耐凍性のさらに大きい材料では10日後でも害されない。もつと耐凍性の小さい材料を用いた場合は-20°C以下の温度にまで冷却する間に害される細胞が多いと思われるので、5月1日と5月13日に採集して低温処理しなかつた枝についてこれを調べてみた。

第 5 表 -20°C と -30°C の温度における生存率の比較

凍結期間	個体番号	細胞外凍結温度		
		-20°C	-25°C	-30°~-35°C
10 日	No. 1	15*	20	55
	No. 2	80	80	100
30 日	No. 2	15	35	80

* 皮層細胞の生存率

実験 6. 耐凍性の比較的小さい枝を-15°C, -20°C 及び-30°~-35°C の温度で細胞外凍結状態においた場合の生存率の比較 枝の小片を-10°Cまで冷却してから植氷して過冷却を破つてから, 前と同様に, 小試験管中に小片を入れて, 漸次-20°Cまで冷却した。枝の小片の温度が-20°Cに達してから5時間後, 一部の小片を-15°Cの温度に, 他の一部を-30°Cの温度に移した。かくて-15°C, -20°C 及び-30°Cの温度に4日間おいてから取出して生存率を調べた。5月13日に採集したような耐凍性の小さい材料では各温度の間の差は見出せなかつたが, 5月1日に採集の材料では上の実験結果と同様な傾向を示した。

第 6 表 耐凍性の小さい枝での比較

凍結期間(日)	個体番号	細胞外凍結温度		
		-15°C	-20°C	-30°~-35°C
4	No. 1(5月1日採集)	15*	20	50
4	No. 2(5月1日採集)	10	35	50
4	No. 3(5月13日採集)	5	10	15

* 皮層細胞の生存率(%)

IV

今迄植物で行われてきた研究では細胞外凍結状態においた場合, 温度が低くなる程, 早く害が現われると考えられていて, -15°~-20°Cにおく方が-30°C以下におくより早く害が現われるという結果は見出されていなかった。本実験では従来の実験とちがって細胞内凍結の影響が除かれている。耐凍性が大きい場合には害は凍結してから約10日後に, 耐凍性の小さい場合には少なくとも4日後には現われてくる。どうして-15°~-20°Cの温度範囲において早く害が現われやすいだろうか。もしも細胞外凍結の害が細胞からの脱水による細胞液の濃縮によつて起るとするならば, -10°Cより-15°C, -20°Cの方がかような脱水による濃縮の害が大きいはずである。然し実際用いた細胞内の塩濃度, 含まれている塩類の種類及びそれらの間の比等について, 又細胞内に塩類が析出した時, 害が生ずるかどうかは条件によつて異なるだろうが, それらの事について今の所, 何も判つていない。また-30°C以下で害が生じにくいのは, 細胞液の濃縮によつて害を生ずると考えられる反応が著しくおそくなるためとも考えられ

るが、その具体的な事は何も判っていない。いずれにせよこれ丈のデータからはまだ考察する段階にはない。

酒井³⁾(1956)はポプラ、桑の枝を -5° ~ -30°C の間の各温度で凍結状態で貯蔵した時、温度が低下する程、害が早く現われる事を報告した。この場合は生死の判定は枝の褐変と芽の発芽状況から判定したし、冷却する時、直接枝を貯蔵する温度に入れて冷却したために、 -30°C の場合は大きい冷却速度で冷却された。この際にすでに -30°C で貯蔵された枝はある程度害を受けていたかも知れない。なお芽の発芽発況、枝の褐変の度合から害の程度を判定したので、かような結果が現われたとも考えられるので、これについてはさらに追試する予定である。

摘 要

耐凍性の大きい桑の枝の小片を細胞外凍結状態で -10° 、 -15° 、 -20° 、 -25° 、 -30° ~ -35° 、 -70° 、 -183°C の各温度に貯蔵して、一定期間後に取出して調べた結果、 -15° ~ -20°C の温度範囲においたものは早く害を受ける事が判明した。この傾向は耐凍性の大きい材料でも、比較的小さい材料でも同じような傾向が認められる。

文 献

- 1) Pisek, A. 1950 Frosthärte und Zusammensetzung des Zellsaftes bei *Rhododendron ferrugineum*, *Pinus cembra* und *Picea excelsa*. *Protoplasma*, **39**, 129.
- 2) Siminovitch, D. and D. R. Briggs 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. *Plant Physiol.*, **28**, 15.
- 3) 酒井 昭 1956 耐凍性の特長及びそれにばす温度の影響 (I). 低温科学, 生物篇, **14**, 1.

Résumé

By the use of small pieces of tissue (0.6~0.7 cm in diameter, 1.5 cm length) from the same segment in the same twig of mulberry tree which had been proven in frost hardy state, studies were made of the temperature range at which the frost injury of the parenchyma cells of the cortex easily appears under continuous extracellular freezing for about 10~20 days at graded temperatures between -10°C and -183°C . After the freezing periods of various lengths the grade of frost injury in these cells was determined by usual plasmolysis test.

It seems that there is a critical temperature range in which the parenchyma cells of the cortex are damaged within short period (5~10 days). This range lies between -15° ~ -25°C .