



Title	植物細胞の耐凍性に影響する媒液中の無機塩類の効果について
Author(s)	照本, 勲; TERUMOTO, Isao
Citation	低温科学. 生物篇, 17, 9-19
Issue Date	1959-10-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17617
Type	departmental bulletin paper
File Information	17_p9-19.pdf



植物細胞の耐凍性に影響する媒液中の 無機塩類の効果について*

照 本 勲

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和34年7月受理)

I. 緒 言

植物が凍害をおこす原因のひとつに細胞内凍結がある。細胞の中の水が凍結して、氷が形成され、原形質の微細構造を機械的に破壊して、不可逆的の傷害をあたえ、凍死をおこすのである。この細胞内凍結が植物細胞におこるか否かは、原形質表層部の性質によるとされている。原形質表層部に氷の侵入を阻止する能力があれば、媒液(外液)が凍結して細胞に氷が接触していても、植氷されることなく或程度凍結に耐える事が可能となる¹⁾。この原形質表層部からの氷の侵入を阻止する要因については、現在まで十分にたしかめられていない。

この研究では、原形質表層の状態を変化させると考えられる、種々の無機塩類溶液を媒液として細胞を凍結させ、種々の陽イオン、陰イオンが如何に細胞の耐凍性に影響するかをたしかめ、細胞の耐凍性を増加させる効果のあるイオンの順列をきめた。又あわせて原形質表層に存在すると思われる Ca イオンの意義について考察した。

II. 方 法

使用した植物は、越冬中のアカビートの葉柄柔細胞組織と、タマネギ鱗片葉の上側表皮細胞組織である。タマネギは鱗茎のまま、適宜温度処理をして、1群を0°Cの恒温暗箱中で2~3週間低温処理して hardy とし、他の1群を20°Cの恒温暗箱中で2~3週間処理し、unhardy とした。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、凍結に際しては細胞外凍結をおこすようになる²⁾。

媒液としては、脱イオン水1,000 cc に対し、0.1N NaHCO₃ 3.5 cc を加えた液を溶媒として、各塩類溶液をつくり、0.1M の低張濃度から順次濃度を高め1M まで、段階的に濃度の異なる溶液をつくつた。この溶液によつて、媒液塩類による原形質表層の変化と、等張以上の濃度でおこる細胞からの脱水の結果細胞の滲透濃度が増加するという、二つの変化を細胞におこさせる事ができる。実験にあつては数種類の媒液を同じ材料、同じ時間に使用し比較を正確

* 北海道大学低温科学研究所業績 第512号

にした。材料は、カミソリで徒手切片とし、各切片を3片ずつ各媒液の種々な濃度の一連の液に10分間つけた。その後、切片とその処理した媒液をスライドガラス上にのせて、カバーガラスをかけ、なるべく迅速に原形質分離の有無を調べた。媒液の細胞内への透過をなるべく少なくするため、次の冷却、凍結までの時間をできるだけ短時間にすませた。この実験では、各媒液に切片を投入してから、切片を凍結するまでの時間は30分以内とした。原形質分離の有無を調べたスライドは、そのまま -13°C の恒温箱で過冷却し、10分後人為的に氷で植氷して凍結せしめた。 -13°C で2時間の凍結後、室温で融解したあと顕微鏡で細胞の生死を調べた。細胞が原形質分離をしているものは、その切片を脱イオン水に戻して原形質を復帰させ、再び0.5 M又は1 M平衡塩溶液(1 M NaClと $2/3$ M CaCl_2 を9:1に混合)で原形質分離をするかどうかをたしかめ、分離した切片を(+)として記載した。

III. 実験結果

1. 各種イオンの影響

使用した媒液の種類は、陽イオン(塩酸塩)として7種類、陰イオンとしてNa塩8種類、Ca塩4種類である。陽イオンの影響を第1, 2表に、陰イオンの影響については第3, 4, 5, 6

第1表 陽イオンの影響 (1)

材 料: アカビート

媒液の種類		濃 度							
		0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.75	1 M
KCl	前*	-	-	-	-	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl	前	-	-	-	-	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
LiCl	前	-	-	-	-	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
BaCl_2	前	-	-	-	-	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
SrCl_2	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	±	±	±	-
MgCl_2	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	±	+	+
CaCl_2	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	±	+	+	+

* 「前」は各濃度による原形質分離の有無。

「後」は -13°C 、2時間凍結後、原形質分離をしているものを復帰させ、再び分離したものを(+)とした。(±)の記載には、凍結融解後すでに凍死していた場合と、脱イオン水に入れ再び平衡塩溶液につけたとき、原形質分離しなかつた場合の両方を含んでいる。

表にその結果をあげた。

切片を凍結融解後、顕微鏡観察により凍死の明らかなものを除き、中性の脱イオン水に入れ、再び平衡塩溶液につけたとき原形質分離した細胞をもつ切片を表では(+)として記載した。耐凍性増大の効果に関するイオンの順列をきめる場合には、凍結融解した直後の細胞の状態も考慮した。

例えば、KCl, NaCl, LiCl, BaCl₂ の各媒液とも第1表では同じ結果であるが、KCl, NaCl, LiCl で処理されたものは凍結融解直後、凍結前原形質分離をしていたものはやはり分離しており、復帰中に細胞は全部破壊した。しかし BaCl₂ の場合だけは、-13°C, 2時間の凍結で融解直後全細胞が破壊した。この経過中の強弱も考慮して次のような順列をえた。



タマネギを材料とした場合(第2表), Ba, Li, K の各媒液は、凍結融解直後すべての細胞が破壊したが、NaCl は 0.75 M 以上, SrCl₂ は 0.4 M 以上の濃度のものは融解後も原形質分離していたが、復帰中に細胞は破壊した。これらの結果から unhardy なものでは各イオンの効果の順列は Ca>Mg>Sr>Ba, Li, Na, K となり, hardy なものでもやはり Ca>Mg>Sr>Ba, Li, Na, K という結果であつた。即ち hardy なものと, unhardy なものとは、共にイオンの順

第2表 陽イオンの影響 (2)

材料: タマネギ

媒液の種類		濃度							
		0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.75	1 M
KCl	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
LiCl	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
BaCl ₂	前	-	-	+	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
SrCl ₂	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
MgCl ₂	前	-	-	+	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	+
CaCl ₂	前	-	-	+	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	+	+	+	+

列は等しいが、0.2 M ずつの耐凍性のずれがある。

第 1, 2 表の陽イオンの結果から、1 価の Li, Na, K の各イオンは、Ba イオンだけは例外であるが、2 価のイオンにくらべて耐凍性を高める効果が小さい事が認められた。又、2 価のイオンのうちでは、Ca イオンが最も効果が大きいといえる。

次にアカビートに対する陰イオンの影響で (第 3 表), 2 時間凍結して融解直後の細胞は、NaCl (0.4 M 以上), Na-Tart., Na-Acet. (共に 0.75 M 以上) の各々で原形質分離していたが、復帰途中破壊した。NaJ, NaSCN, Na₂SO₄, NaNO₃ の各媒液では、融解したときすでに細胞は破壊されていた。

第 4 表 陰イオンの影響 (2)

材料: タマネギ

A. unhardy

媒液の種類		濃度							
		0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.75	1M
NaCl	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
NaJ	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
NaBr	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
NaSCN	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
Na ₂ SO ₄	前	-	-	+	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
NaNO ₃	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
Na-Tart.	前	-	-	+	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
Na-Acet.	前	-	-	+	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-

タマネギの unhardy なもので、NaCl は 0.75 M 以上、Na-Acet. は 1 M だけが融解直後原形質分離していたが、復帰の途中破壊した。NaJ, NaBr, NaSCN, Na₂SO₄, Na-Tart. の各媒液は、融解時すでに細胞は破壊されていた。

hardy なもので、NaCl (0.4 M 以上), Na-Acet. (0.5 M 以上), Na-Tart., NaBr (各 1 M のみ) では融解時原形質分離をしていたが、他のものは融解時すでに細胞は破壊されていた。

B. hardy

媒液の種類		濃 度							
		0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.75	1 M
NaCl	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
NaJ	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
NaBr	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
NaSCN	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
Na ₂ SO ₄	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
NaNO ₃	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
Na-Tart.	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
Na-Acet.	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-

第 5 表 陰イオンの影響 (3)

材 料: アカビート

媒液の種類		濃 度							
		0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.75	1 M
CaCl ₂	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	±	+	+	+
CaJ ₂	前	-	-	-	-	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
CaBr ₂	前	-	-	-	-	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂	前	-	-	-	-	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-

CaBr₂ (0.5 M 以上), Ca(NO₃)₂ (0.75 M 以上) では, 融解時原形質分離していたが, CaJ₂ ではすでに破壊されていた。

第 6 表 陰イオンの影響 (4)

材料: タマネギ

A. unhardy

媒液の種類		濃 度							
		0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.75	1 M
CaCl ₂	前	-	-	+	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	+	+	+	+
CaJ ₂	前	-	-	+	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
CaBr ₂	前	-	-	+	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂	前	-	-	+	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-

B. hardy

媒液の種類		濃 度							
		0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.75	1 M
CaCl ₂	前	-	-	+	+	+	+	+	+
	後	-	-	+	+	+	+	+	+
CaJ ₂	前	-	-	-	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
CaBr ₂	前	-	-	+	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂	前	-	-	+	+	+	+	+	+
	後	-	-	-	-	-	-	-	-

unhardy なものは, CaBr₂, Ca(NO₃)₂ 共に 0.75 M 以上のものは, 凍結融解後原形質分離していたが, CaJ₂ は融解時すでに細胞は破壊されていた。hardy なものは, CaBr₂, Ca(NO₃)₂ 共に 0.5 M 以上のものは, 融解後原形質分離していたが, CaJ₂ は unhardy なものと同じように, 細胞は破壊されていた。

陰イオンでの結果は, Na 塩, Ca 塩とも Cl イオンを除いて各イオン間の順位はきめがた。然し一般に Cl イオンは他のイオンにくらべて耐凍性増大効果が大きく, 特に Ca 塩で差が大きい。

2. Ca 沈澱剤の影響

この実験は, 媒液中の Ca イオンを除くために, Ca 沈澱剤として知られる酢酸塩およびクエン酸塩 (共に Na 塩) で予め切片を処理した後, 前述の二, 三の媒液を使用した場合の耐凍

性を調べた。先ず始めに Ca 沈澱剤で切片を 15 分間前処理し、同時に対照は脱イオン水中で同じく 15 分間処理したあと、媒液としての NaCl, MgCl₂, 蔗糖の種々な濃度溶液に切片を移し、そのあとは前述のイオンの影響の場合と同じ方法を行つた。同時に対照切片を用いた実験もあわせて行つた。凍結融解後は、Ca 沈澱剤で処理した切片がその溶液中で凍結に耐えることのできた溶液の最低濃度と、対照切片を使用した場合にえられる同様な最低濃度との差をとつて、耐凍性の消失度とした。例えばアカビートで、媒液が蔗糖液の場合は、0.7 モ

第 7 表 Ca 沈澱剤処理による耐凍性の消失度

使用した植物	Ca 沈澱剤の種類	媒液の種類	耐凍性の消失度
アカビート	0.1 M oxalate	蔗糖	0.3 M
		NaCl	0.3 M
		MgCl ₂	0.1 M
	0.1 M citrate	蔗糖	0.3 M
		NaCl	0.3 M
		MgCl ₂	0.1 M >
タマネギ unhardy	0.1 M oxalate	蔗糖	0.4 M
		NaCl	0.4 M
		MgCl ₂	0
	0.1 M citrate	蔗糖	0.3 M
		NaCl	0.2 M <
		MgCl ₂	0
タマネギ hardy	0.1 M oxalate	蔗糖	0.3 M
		NaCl	0.3 M
		MgCl ₂	0.1 M
	0.1 M citrate	蔗糖	0.3 M
		NaCl	0.2 M
		MgCl ₂	0.1 M >

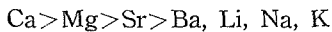
ル以上で -13°C, 2 時間の凍結にたえることができるが、切片が蓆酸塩で前処理されると 1.0 M の蔗糖媒液に入れたものだけが凍結にたえることができる。この場合の差 0.3 M が消失度である。その結果を第 7 表にあげた。

Ca 沈澱剤でもつて予め切片を処理することにより、その後用いた媒液の種類によつて、耐凍性の消失度がちがうことがわかる。すなわち蔗糖, NaCl を媒液とした場合は 0.3 M, MgCl₂ を用いた時は 0.1 M (又はそれ以下) も対照にくらべて耐凍性が失われる。又、タマネギでは、hardy なものと unhardy なもの間に顕著な差は見られなかつたが、蓆酸塩で前処理されたもの間に、蔗糖, NaCl を媒液とした場合、共に耐凍性の上で 0.1 M ずつの差をもっている事が認められた。MgCl₂ を媒液とした場合は、前述のイオンの順列から理解されるように、Mg イオンが Ca イオンの代償作用をして、Ca 沈澱剤で失われた Ca イオンに代つて、耐凍性の消失度が 0.1 M 以下という結果になつたものと思われる。

IV. 考 察

植物が凍死を起す主要な原因のひとつは、細胞内に氷ができる事である。通常、細胞の凍結するときには、細胞外凍結が最初始まる。充分過冷却の状態に細胞がおかれると、細胞外の氷は原形質膜内の水に植氷の役を果すことができる¹⁾。したがつて植物細胞内に氷ができやす

いか、できにくいかは原形質膜および原形質表層の状態によつて支配されると考えられる。このことはウニの卵でみられているが、媒液の凍結が始まつてウニ卵に氷が接した際、最初のうちにはウニ卵の内部にあらためて人為的に植氷すれば常に細胞内に氷ができることから、一次的には原形質表層部の構造が、これより内部に凍結をおこさせることを防いでいるためと思われる³⁾。原形質表層部は種々の程度に凍結の進行を阻止する性質があるので、媒液中に氷が発達しても、細胞内部に、続いて凍結が始まるとは限らない。このように植物細胞が、内部に氷ができる事を阻止する性質があるという事実は、昔から植物学者に知られていた (Sacks 1892)。1932年に Chambers と Hale は、始めて細胞表面に直接マイクロピペットで植氷する方法を使用して、原形質膜は、すでに過冷却している細胞内部に氷が侵入することを防ぐ能力があることを明らかにしている⁴⁾。細胞質の表面及びトノプラストには磷脂類が特に多く存在する。磷脂類は細胞質を構成する蛋白質とゆるい結合をするか、或いは蛋白質ミセルの間隙に存在するといわれている。これらの細胞表層に存在する蛋白、磷脂類などは、無機の塩類によつて変化をうけるものと考えられる。原形質表層の状態を変化させる種々の媒液の作用は、膜を構成する蛋白、磷脂類への作用でもある。ここで植物細胞の耐凍性に作用する陽イオンの順列である



は、このようなイオンを含む媒液中で細胞が凍結にたえられる程度をあらわすにすぎないが、著者はこれを原形質膜を構成している物質が、各イオンによつて変えられて、氷を阻止する能力に変化が現われたことも、耐凍性に影響する原因のひとつと考えたい。2価のイオン特に Ca イオンは1価のイオンのものにくらべて原形質膜の氷の侵入を阻止する能力に影響するところが大きいのであろう。このことは Ca 沈澱剤を使用して得られた結果とあわせて興味ぶかい。

ウニの卵の実験で、外側の膜を破つて細胞内部の原形質を、Ca イオンの存在しない媒液に溶出せしめた場合、原形質は流出を続けるが、極く少量でも Ca イオンが媒液に存在すると、その流出原形質に界面膜が形成されることが知られている。又、Ca イオンは K イオンまたは Na イオンと拮抗的に働く性質をもっている。Ca イオンは生体にとつて最も重要なイオンのひとつであり、原形質のゲル化には Ca イオンの存在は不可欠なものと考えられる⁵⁾。原形質はポリペプチッド鎖のミセル構格構造をもつと考えられ、一般にポリペプチッド鎖の水和を促がすイオンである K, Na イオンの如きは、細胞質の表面に水和をおこし、軟化、膨潤させ、之に反して Ca イオンは正常な細胞の表層に存在して、脱水、縮化、緻密化をおこすが、過剰の濃度の Ca イオンが作用すると細胞質外層に著しい脱水がおこり、その硬化が起る⁶⁾。細胞膜を構成している物質に対し、種々の無機イオンは色々な程度の変化をあたえ、その変化が、原形質内への氷の侵入を阻止する程度の差を与えるものと考えられる。特に植物細胞の原形質膜、原形質表層における Ca イオンと、その代りをする Mg イオンの存在が、氷の細胞内への侵入阻止に大きく影響するものと思われる。

摘 要

植物の凍死をおこす原因のひとつである細胞内凍結のおこりやすさは、原形質表層部の氷の侵入を阻止する能力に支配される。原形質表層の状態を変化させると思われる媒液の条件をかえて、植物組織の耐凍性をしらべた。

使用した媒液は、無機塩類のうち陽イオンとして7種類、陰イオンとして12種類を用いた。使用した植物は、アカビートとタマネギの細胞で、各媒液の低張、等張、高張溶液中で -13°C で2時間凍結させた後、その細胞の生死によつて凍害を防ぐに有効な媒液の濃度を求め、細胞の耐凍性に対する順列をきめた。使用した植物の hardy であるか、又は unhardy であるかによつては、イオンの順列は変らなかつた。結果は次の通りである。

アカビート $\text{Ca} > \text{Mg} > \text{Sr} > \text{Li, Na, K} > \text{Ba}$

タマネギ $\text{Ca} > \text{Mg} > \text{Sr} > \text{Ba, Li, Na, K}$

陽イオンでは Ba イオンを除いて2価のものが、1価のイオンにくらべて耐凍性効果が大きく、その中でも Ca イオンは最も大きい。陰イオンは、使用した12種類の媒液の中で、Cl イオンが最も細胞内凍結を阻止する効果が大きい、陽イオンにくらべて非常に小さい。Ca イオンについては、Ca 沈澱剤を用いて媒液中の Ca イオンを予めとりさつて、その無処理のものとの耐凍性に対する効力のへりかたを調べた。この実験条件では、両植物の細胞で、各媒液中での耐凍性の有効濃度は約 0.3 M 低下する。しかし処理後の媒液を MgCl_2 にすることで、その細胞の耐凍性の消失度をもとに戻すことが可能となる。

最後に、この研究について御指導下さつた青木教授、ならびに有益な御助言をいただいた朝比奈教授に感謝する。

文 献

- 1) Asahina, E. 1956 The freezing process of plant cell. *Cont. Inst. Low Temp. Sci.*, **10**, 83.
- 2) 照本 勳 1957 タマネギの耐凍性について. *低温科学, 生物篇*, **15**, 39.
- 3) 朝比奈英三 1953 生物の凍結過程の分析 X. 卵細胞 (ウニ) の凍結過程. *低温科学*, **10**, 81.
- 4) Chambers, R. and H. P. Hale 1932 The formation of ice in protoplasm. *Proc. Roy. Soc., B* **110**: 337.
- 5) Heilbrunn, L. V. 1952 *An Outline of General Physiology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia and London.
- 6) 坂村 徹 1958 *植物生理学 (上巻)*. 第8版. 東京, 裳華房.

Résumé

It is the purpose of the present study to ascertain the changes in grade of frost resistance in plant cells, when they are immersed previous to freezing in various kinds of media by which the properties of protoplasmic membrane in these cells may probably be affected. For the solutions of these media, various cations as well as various anions were used.

The table beet and onion were used as experimental material. Tissues from these plants were sectioned by hand, and slices from the outer epidermiss of onion scale leaf or parenchyma cells of petiole of table beet were treated with graded solutions (0.1-1 M) of various inorganic salts in which the ability of plasmolysis in these cells was determined. These tissues were frozen at -13°C . for 2 hours. After thawing, the effective concentration of the medium in which cells could stand against freezing was determined.

According to the results of the present experiment, the ions were arranged according to their effects on frost resistance in plant cell in the following series:

table beet	Ca>Mg>Sr>Li, Na, K>Ba
onion	Ca>Mg>Sr>Ba, Li, Na, K

In the case of onion the arrangement for cations was not changed due to the degree in its hardiness. Bivalent cations were found to be more effective to increase the frost hardiness in plant cell than the monovalent cations except for the case of the barium ion. Calcium ion was most effective for frost hardening. As to anions, chloride was most effective among various anions but, in general, anions were less effective than cations.

In the present experiment the calcium precipitants such as oxalate and citrate solutions were also used as the solutes of the media. Oxalate removes calcium ion from solution, and citrate binds it in an inactive form. In either case, in the absence of any free calcium ions, frost hardiness in plant cells was decreased under the present experimental condition. Magnesium seems to compensate the decrease in frost hardiness of plant cells which was brought about by the treatment with calcium precipitant.

From the above facts, it can be concluded that among various inorganic salts, bivalent cations are more effective to increase frost hardiness than the monovalent cations. Calcium ion seems to have a characteristic property to increase the ability to resist the occurrence of intracellular freezing in plant cells.