HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	木本類の耐凍性増大の過程　Ⅷ ： 耐凍性と多価アルコールとの関係
Author(s)	酒井, 昭
Citation	低温科學. 生物篇, 18, 15-22
Issue Date	1960-11-04
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17633
Type	departmental bulletin paper
File Information	18_p15-22.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Akira SAKAI 1960 The Frost-Hardening Process of Woody Plant VIII. Relation of Polyhydric Alcohols to Frost Hardiness. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 18.*** (With English résumé p. 22)

木本類の耐凍性増大の過程 VIII*

—— 耐凍性と多価アルコールとの関係 ——

酒　井　　昭

(低温科学研究所　生物学部門)

(昭和 35 年 6 月受理)

I.

著者はクワの枝の皮層細胞をエチレングライコールの溶液中で数分間処理すると，細胞内凍結が起こりにくくなるし，細胞外凍結に対する抵抗性も著しく高かまることを報告した[1]。このような報告はほかにも知られている[2),3)]。かように，多価アルコールは実験的には植物の耐凍性に対して重要な関係を有していることが明らかである。しかし，天然での植物の耐凍性増大に対して，多価アルコールがどのような役割を果しているか殆んど判つていない。Asai (1932)[4] はクチナシ，オウバイ，ザクロ，ソケイ等の冬の枝や葉において，糖とともに多量のマンニトールが蓄積されていて，マンニトールがこれらの植物では耐凍性増大に対して大きい役割を果していると報告している。この報告がこの問題を扱つた唯一の報告と思われる。しかしここで用いられている定量方法は現在では色々問題があるので再検討してみる必要がある。また Bradfield (1950) はリンゴ，ナシ，アンズの冬の枝には糖とともに同量のソルビトールが含まれていることを報告している。しかし彼はソルビトールと耐凍性との関係にはふれていない。

最近ある種の昆虫の耐凍性をたかめるのに，グリセロールが重要な役割を果していることが数多く報告されている[7),8),9)]。植物の中でも，耐凍性が大きい木本類において，多価アルコール類がこれらの耐凍性をたかめるのに，どのように関与しているかを明らかにすることは興味あることである。耐凍性の大きい木本類 12 種類と多価アルコールの含有量が多いと思われる 5 種類その他 2 種類をあわせて全部で 19 種類について一連の実験を行なつた。

実験材料を送つて頂いた山形大学久佐守氏，東海近畿農業試験場茶業部中山仰氏，多価アルコールの定量法についてお教示頂いた東京大学理学部茅野春雄氏及び原稿を御校閲して頂いた朝比奈教授に謝意を表します。

II.

実験材料　耐凍性の大きい落葉性の材料として，シラカバ (*Betula tauschii* Koidz.)，コリヤナギ (*Salix koriyanagi* Kimura.)，カラマツ (*Larix leptolepis* Murray.)，ポプラ (*Populus*

* 北海道大学低温科学研究所業績　第 551 号

nigra. L. *var. italica* Muenchh.), クワ (*Morus bombycis* Koidz.) の野性種, バラ (*Rosa pendulina* L.) (シベリア産), 針葉樹としてイチイ (*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.), アカエゾマツ (*Picea glehnii* Mast.), キタゴヨウマツ (*Pinus pentaphylla* Mayr.), トドマツ (*Abies mayriana* Miyabe et Kudo.), 北海道に越冬している常緑広葉性のものとしてシロバナシャクナゲ (*Rhododendron fauriae* Franch. *var. roseum* Nakai.), ツルマサキ (*Euonymus radicans* Sieb.) を用いた。また多価アルコール類が多いと思われる材料として, ナナカマド (*Sorbus commixta* Hedlund.), プラタナス (*Platanus orientalis* L.), リンゴ (*Malus pumila Mill.*) (品種ヤマトニシキ), ザクロ (*Punica granatum* L.), 八重クチナシ (*Gardenia jasminoides* Ellis. *var. grandiflora* Nakai.) を用いた。さらに参考のために茶 (*Thea sinensis* L.) (品種ヤマトミドリ) と月桂樹 (*Laurus nobills* L.) を用いた。上記の材料中, ザクロ, 月桂樹は山形市より, 茶は静岡県金谷市より, クチナシは名古屋市より1月下旬送付されたものを 0°C 中にて 14 日間低温処理してから実験に使用した。アカエゾマツとナナカマドは3月1日に, 他の材料はいずれも1月 10 日～30 日の間に採集して直ちに実験に供した。針葉樹と常緑樹は葉を, 落葉樹は枝の先端より 10～30 cm の部位の皮層部を用いた。材料はいずれも1年生の枝の部分を使用した。

木の耐凍性の大きさは冬季, 枝全体や葉が1日間の凍結に耐える最低温度であらわした。また皮層細胞の耐凍性の大きさは原形質分離法で全細胞が生存している最低温度であらわした。

定量方法 枝の皮層部や葉をこまかく切つて, 乳鉢中で石英砂を用いて 80% エタノールでホモゲネートを作り, 遠沈上清 (生じた沈澱をさらに 80% エタノールで再抽出する) を 50°C 以下の温度で減圧濃縮してから, エーテルで脱脂後, 少量の水を加えてシロップを作り, それをペーパークロマトグラフィーに用いた。ピリジンで抽出するのが理想的であるが, 三, 四糖類やマンニトール, ソルビトールは水よりピリジンに溶けにくい。従つて, 含まれている全糖類や多価アルコール類を一様に溶出させるために溶媒として水を用いた。展開液として, n-ブタノール, 氷醋酸, 水を 4:1:2 の容積比に含む液を用いて, 約 15°C の温度で上昇法で 5～7 回展開した。マンニトールとソルビトールは 5 回以上展開を繰返して始めて分離出来る。濾紙はワットマンの No. 1 を用いた。発色剤はアンモニア性硝酸銀溶液を用いた。前報[10]に述べたように, 用いた材料では多価アルコールの外に R_f の近似した糖が約 10 種類含まれており, しかもそれらの含有量が多い。5～7 回展開後においてマンニトールの部位にフルクトーズが重なり, ソルビトールの部位にはグルコーズとガラクトーズが重なつて存在する。したがつてアンモニア性硝酸銀溶液で発色させた場合に, 多価アルコールも糖も同時に発色するために, 定性的には両者を区別することは出来ない。ペーパークロマトグラフィーで分離後, 濾紙を切取つてビューレットから 20 cc の蒸溜水で elution した。含まれている多価アルコールの含有量が少なくて定量出来ない場合が多いので, elution した 20 cc の液を 1～5 cc 迄減圧濃縮してから定量に使用した。定量は過沃素酸で酸化後, クロモトロープ酸で発色させて比色定量した[11]。

クワ，カラマツ，ポプラの冬の枝の皮層部の材料についてペーパークロマトグラフィーで分離後，硝酸銀溶液で発色させると，数カ所に発色が認められる。それらの各々のスポットについて，多価アルコールの反応をクロモトロープ酸試薬で調べた所，マンニトール，ソルビトールの部位とグリセロールの部位に多価アルコールの反応が認められた。イノシトールの部位には反応は認められなかつた。したがつて，多価アルコール類の定量はグリセロール，マンニトール及びソルビトールについてのみ行なつた。なお3～4種類の材料についてはイノシトールの定量も行なつた。用いた比色定量方法は多価アルコールの外に糖にもわずかに反応するが，両者の発色は異なつているし，糖の発色感度は非常に小さい。したがつて，フルクトーズやグルコーズやガラクトーズがマンニトール及びソルビトール部位に混在していても，クロモトロープ酸試薬による多価アルコール類の発色妨害は少ない。したがつて，この方法で含まれている多価アルコールの量を可成り正確に定量出来る。ただ，マンニトールとソルビトールの含量が多い時には，5回展開しても，両者を完全に分離しにくいし，殊にマンニトールの量が多い時には，tailing しやすいので，両者の分離はむずかしくなる。しかし，実験目的から考えて，マンニトールとソルビトールの個々の絶対値が正確に判らなくても両者の和が判るだけでもよい。したがつて，上に述べた方法で定量してもさしつかえない。

定量した値は湿重量当りのそれぞれの多価アルコールの量(%)であらわした。低温処理は10月5日に枝をビニール布につつんで0°Cで10日間行なつた。

III.

1. 冬における多価アルコールの含有量 耐凍性が最も大きい1月に各種の木の枝の皮層部や葉にどの程度の多価アルコールが含まれているかについて調べた。第1表からわかるように，グリセロールはプラタナス，茶，ツルマサキを除いては，いずれの種類も湿重量当り0.1%以下である。したがつて，少なくとも，用いた18種類については，グリセロールは耐凍性に対して殆んど関与していないと考えられる。マンニトールはどの種類も普遍的に存在していて，クワ，アカエゾマツ，茶以外のものでは湿重量当り0.1～0.4%含まれている。まえに述べたように，マンニトールの含有量が多い時には tailing する傾向があるので，第1表のマンニトールの値は実際より少なく現われており，逆にソルビトールは多目にあらわれている。ソルビトールの含有量は0.1%に達しないものが多い。ただ，ザクロ，クチナシ，リンゴ，ナナカマドではその含有量が湿重量当り1%前後にも達している。またグリセロール，マンニトール及びソルビトールの全含有量が0.6%に達しないものが多い。ザクロ，クチナシ，リンゴ，ナナカマドはその含有量が約1.5%に達している。シラカバ，ヤナギ，ポプラ，カラマツ，イチイ等の最も耐凍性の大きい種類の全多価アルコールの含有量はいずれも0.5%以下である。なお第1表に示すように，全多価アルコールの量は全糖量の10%以下のものが多い。したがつて，これらの種類では冬期間の耐凍性増大に対して多価アルコール類は殆んど直接には関与していないものと考えられる。ザクロ，クチナシ，リンゴ，ナナカマドのようにその比が40～55%

第1表 冬の枝の皮層部や葉の中の多価アルコールの含有量

木の種類		マンニトール	ソルビトール	グリセロール	全多価アルコール量	全糖量	$100\times\frac{\text{全多価アルコール量}}{\text{全糖量}}$	耐凍性の大きさ ℃
シラカバ	*Betula tauschii*	0.23	0.05	0.07	0.35	5.23	6.76	−30
ポプラ	*Populus nigra*	0.14	0.05	0.02	0.21	4.69	4.44	〃
コリヤナギ	*Salix koriyanagi*	0.20	0.06	0.08	0.34	5.40	6.34	〃
カラマツ	*Larix leptolepis*	0.40	0.09	0.03	0.51	5.29	9.70	〃
イチイ*	*Taxus cuspidata*	0.16	0.10	0.06	0.31	4.27	7.15	〃
ゴヨウマツ*	*Pinus pentaphylla*	0.13	0.03	0.06	0.22	3.97	5.60	−28
バラ	*Rosa pendulina*	0.35	0.06	0.04	0.45	5.26	8.55	〃
シャクナゲ*	*Rhododendron fauriae*	0.18	0.10	0.05	0.22	4.65	4.77	〃
トドマツ*	*Abies mayriana*	0.11	0.04	0.08	0.24	4.00	5.89	〃
クワ	*Morus bombycis*	0.07	0.03	0.04	0.15	4.29	3.43	−25
リンゴ	*Malus pumila*	0.47	1.15	0.03	1.64	3.15	52.10	〃
プラタナス	*Platanus orientalis*	0.33	0.08	0.13	0.54	4.77	8.88	〃
ツルマサキ*	*Euonymus radicans*	0.14	0.20	0.15	0.45	3.82	11.85	〃
ザクロ	*Punica granatum*	0.50	0.91	0.05	1.49	3.56	41.80	−15
月桂樹*	*Laurus nobills*	0.25	0.45	0.03	0.73	3.61	20.22	〃
茶*	*Thea sinensis*	0.08	0.05	0.12	0.13	3.33	4.00	〃
クチナシ*	*Gardenia jasminoides*	0.80	0.59	0.02	1.36	2.54	55.00	−12
アカエゾマツ*	*Picea glehnii*	0.07	0.06	0.04	0.16	2.89	5.66	
ナナカマド	*Sorbus commixta*	0.35	1.05	0.02	1.42	3.48	40.90	

* 葉を使用
- 数値はいずれも湿重量当りの百分比
- 耐凍性の大きさは枝又は葉が1日間の凍結に耐える最低温度であらわした
- アカエゾマツとナナカマドは3月1日に採集して定量

に達しているものでは，冬の耐凍性に対して多価アルコール類もある程度関与しているものと考えられる。

2. 夏と冬における多価アルコールの含有量の比較 7種類の枝の皮層部の夏と冬における多価アルコールの量を比較した結果を第2表に示す。クワは冬の方が夏より明らかにその含有量が少ないが，他の多くの種類ではそれが約2倍に増加している。リンゴは約3倍に増加している。しかし，その増加した量は多くの種類では湿重量当り 0.2% 以下で，リンゴの場合にのみ 1% に達している。その際に，糖も8月から1月の間にいずれも3～4倍増加している。その増加量は湿重量当り2～4% である。8月から1月の間における多価アルコールの増加量と糖の増加量の百分比 $\left(\frac{\Delta P}{\Delta S}\times 100\right)$ を調べてみると，リンゴを除いていずれも数%以下である。リンゴは約 38% に達している。したがつて，リンゴを除いては，8月～1月の間の耐凍性の増大に対して多価アルコール類は殆んど関与していないとおもわれる。

第 2 表 夏と冬の多価アルコールと糖の含有量* (枝の皮層部)

木の種類		多価アルコール			糖			$\frac{\Delta P}{\Delta S}\times 100$
		8 月	1 月	増加量 (ΔP)	8 月	1 月	増加量 (ΔS)	
コリヤナギ	*Salix koriyanagi*	0.14	0.34	0.20	1.69	5.40	3.71	5.5
シラカバ	*Betula tauschii*	0.18	0.35	0.17	1.33	5.23	3.90	4.4
ポプラ	*Populus nigra*	0.12	0.21	0.09	1.04	4.69	3.65	2.4
カラマツ	*Larix leptolepis*	0.28	0.45	0.17	1.22	5.29	4.07	4.3
クワ	*Morus bombycis*	0.27	0.13	−0.14	1.77	4.03	2.26	—
バラ	*Rosa pendulina*	0.21	0.23	0.03	1.29	5.26	3.97	6.9
リンゴ	*Malus pumila*	0.54	1.54	1.01	0.85	3.25	2.44	37.7

* 数値はいずれも湿重量当りの糖及び多価アルコールの量(%)であらわす。

3. 低温処理による多価アルコールの変動 10月5日から0°Cで10日間低温処理した場合における多価アルコールの量の変動を第3表に示す。比較のために，その際増加した糖の量も記した。10月5日頃はどの種類も低温処理によつて，耐凍性を著しく増加する時期である。しかし用いた7種類のいずれも低温処理による多価アルコールの著しい増加は認められなかつた。最も多く増加したカラマツでも，湿重量当り0.45%にすぎない。その際，同時に測定した

第 3 表 低温処理前後における多価アルコールと糖の変動* (枝の皮層部) 10月15日

木の種類		多価アルコール			糖			$\frac{\Delta P}{\Delta S}\times 100$
		処理前	処理後	増加量 (ΔP)	処理前	処理後	増加量 (ΔS)	
コリヤナギ	*Salix koriyanagi*	0.15	0.21	0.06	1.80	2.76	0.96	6.3
シラカバ	*Betula tauschii*	0.24	0.28	0.04	1.40	2.93	1.53	2.6
ポプラ	*Populus nigra*	0.14	0.16	0.02	1.48	3.14	1.66	1.2
カラマツ	*Larix leptolepis*	0.28	0.45	0.17	1.46	2.56	1.10	15.0
クワ	*Morus bombycis*	0.06	0.07	0.01	1.86	3.60	1.74	5.8
バラ	*Rosa pendulina*	0.21	0.23	0.02	1.82	2.80	0.98	2.0
リンゴ	*Malus pumila*	0.75	0.85	0.10	1.33	2.33	1.00	10.0

* 数値はいずれも湿重量当りの多価アルコール及び糖の量(%)をあらわす。

糖の量はいずれも約1%以上増加している。さらに低温処理による多価アルコールの増加量に対する糖の増加量の百分比を調べてみると，第3表から判るように，いずれも数%以下で，低温処理による植物細胞の耐凍性増大に対して多価アルコール類は殆んど直接には関与していないことが判る。

IV.

生物材料の凍結保存法の研究が近年めざましく発展した結果，凍害防止剤としてのグリセロールの効果が多く報告されている。さらにグリセロールが昆虫の体内にも天然に存在することが発見された結果[6]，昆虫の耐寒性の機構をグリセロールの増加によつて説明しようとする

試み[7),8),9)]が盛んに行なわれるようになつた。木の皮層組織をエチレングライコールの水溶液中に数分間処理するだけで，細胞内凍結がおこりにくくなるし，細胞外凍結による強度の脱水と収縮にも耐えられるようになる[1)]。

しかし，天然においてグリセロールが植物体内に蓄積するかどうかについては従来調べられていなかつた。非常に耐凍性が大きい木本類の耐凍性増大に対して低分子の多価アルコール類が関与しているかどうかは興味ある問題であつた。しかし，調べた 19 種類についての実験結果では，3 種類において湿重量当り 0.1～0.15% のグリセロールの存在が確められたが，他の大部分の種類においては痕跡的程度にしか存在していない。従つて，木本類の耐凍性増大に対してグリセロールは関与していないものとみなされる。

マンニトールは多くの植物にかなり普遍的に存在していることが知られている。たとえば，トネリコ科の植物の樹皮，菌類，藻類，ソケイ，オウバイ，モクセイ，クチナシ等の樹皮や葉に含まれていることが知られている[4)]。本実験の結果でも，ソルビトールとちがつてマンニトールは多くの木本類にその存在が認められる。ソルビトールはイバラ科のナシ，アンズ，リンゴやナナカマドに多量に存在することが知られている[5)]。実験の結果も同様に，リンゴ，ナナカマドにおいて，湿重量当り 1.0% 以上の存在が確められた。しかし，他の材料では極めて少量しか存在しない。

全多価アルコールの量は冬は夏より約 2～3 倍増加するが，その絶対量が少ないために，リンゴ以外では，同時期における糖の増加量の数%以下にすぎない。多価アルコール類が耐凍性をたかめるのに関与しているかどうかを論ずる時には，それらの多価アルコールや糖の量からのみでなく，それらの耐凍性をたかめる大きさをも併せ考えることが必要である。後報[12)]で報告するように，クチナシの葉の細胞中に同一条件下で糖や多価アルコール類を増加させて，それらの物質の凍害に対する保護効果の大きさを調べた結果，エチレングライコールやグリセロールのような低分子の多価アルコールは凍害保護効果が大きい。しかし，マンニトールは三糖類のラフイノーズと同程度の効果があるが，単糖類や二糖類と較べるとその効果ははるかに小さいことが判つている。この際，単糖類や二糖類の作用の大きさはエチレングライコールやグリセロールと同程度かそれよりわずかに小さいだけである。木本類の場合，含まれている糖の大部分は単糖類と二糖類である。かりに，マンニトールやソルビトールの凍害を防ぐ効果が単糖類や二糖類と同程度であるとしても，用いた材料では，リンゴ，ナナカマド，クチナシ以外のものでは全多価アルコールの量が全糖量の数%以下である。したがつて，多価アルコールはこれらの種類では，耐凍性を高かめるのに殆んど関与していないと考えざるをえない。ただ多価アルコールの量が全糖量の約 40% をしめているリンゴ，ナナカマド，クチナシでは，多価アルコールの量が糖の量の約半分をしめているので，耐凍性に対す役割も或程度はある。しかし，実際には，マンニトール，ソルビトールは同一量で比較した時，単糖類や二糖類より凍害に対する保護効果が小さいために，耐凍性を高かめるのに糖類とくらべてマンニトール，ソルビトールの関与する度合はより小さいと考えざるをえない。また，人工的に低温処

理した場合には，耐凍性は増加するにも拘わらず，多価アルコールの増加量は糖のそれの数%以下である。さらに第1表に示したように，用いた17種類の中，耐凍性の大きいものほど，多価アルコールの含有量が多いという傾向も認められなかつた。したがつて，天然の場合にも，人工的に低温処理した場合にも，多くの木では多価アルコールは耐凍性をますのにあまり関与していないものと考えられる。

摘　　要

耐凍性の異なつたいろいろな植物材料を用いて，グリセロール，ソルビトール及びマンニトールの季節的変動や人工的低温処理前後におけるこれらの値の変動から，植物の耐凍性増大とこれらの物質との関係を調べてみた。

1. グリセロールは用いた19種類の材料の中では，茶，ツルマサキ，プラタナスにおいて冬季，湿重量当り0.1～0.15%含まれている。それ以外の種類では，痕跡的に含まれているにすぎない。

2. マンニトールは冬季に多くの種類で，湿重量当り0.1～0.5%含まれているものが多い。ソルビトールはザクロ，クチナシ，リンゴ，ナナカマドでは約1%含まれているが，他の種類では極めて少量含まれているにすぎない。マンニトールやソルビトールは，多くの種類では，夏から冬にかけて2～3倍増加するが，クワでは冬は夏より半減している。

3. 用いた材料では，冬における多価アルコールの全量が糖の全量の10%以下のものが多い。ザクロ，クチナシ，リンゴ，ナナカマドではその割合が40～55%である。

4. 人工的に低温処理した場合，多価アルコールの増加量は湿重量当り0.1%に達しないものが多いのに，糖では大部分の木で湿重量当り約1.0～1.6%増加している。

5. 耐凍性の大きい木ほど多価アルコールの含有量が多いという傾向は認められない。

したがつて，用いた19種類の木の大部分において，多価アルコールは，天然の場合にも，人工的な低温処理の場合にも，耐凍性をたかめるに殆んど関与していない。ただ，冬季，多価アルコールの全含有量が糖のそれの40%以上をしめるクチナシ，ナナカマド及びリンゴでは，多価アルコールがこれらの耐凍性をたかめるのに或程度関与しているものと考えられる。

文　　献

1) 酒井　昭 1958 木本類の耐凍性増大過程 II. 耐凍性増大と糖類及び水溶性蛋白質の関係 (2). 低温科学, 生物篇, ***16***, 23.
2) 照本　勲 1957 タマネギの耐凍性について. 低温科学, 生物篇, ***15***, 39.
3) Levitt, J. 1957 The role of cell sap concentration in frost hardiness. Plant Physiol., ***32***, 237.
4) Asai, T. 1932 Untersuchungen über die Bedeutung des Mannit im Stoffwechsel einiger höheren Pflanzen. Teil 1 Japan J. Bot., ***4***, 63.
5) Bradfield, A. E. and Flood A. E. 1950 Soluble carbohydrate of fruit Plants. Nature, ***166***, 264.
6) Wyatt, G. R. and Meyer, W. L. 1959 The chemistry of insect hemolymph III. Glycerol. J. Gen. Physiol, ***42***, 1005.

7) Chino, H. 1958 Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silkworm, *Bombyx mori*. III. Conversion of glycogen into sorbitol and glycerol during diapause. J. ins. Physiol., **2**, 1.
8) Salt. R. W. 1959 Role of glycerol in the cold-hardiness of *Bracon cephi* (Gahan). Can. J. Zool., **37**, 59.
9) 竹原一郎・朝比奈英三 1959 越冬昆虫の体内にあるグリセリンについて. 低温科学, 生物篇, **17**, 159.
10) 酒井 昭 1960 木本類の耐凍性増大過程 VI. 糖類の季節的変動 (1). 日本林学会誌, **42**, 97.
11) Burton, R. M. 1957 The determination of glycerol and dihydroxyacetone. Methods in Enzymology. (edited by S. P. Colowick & N. O. Kaplan) Academic Press, N. Y. Vol. III, 246.
12) 酒井 昭 1960 木本類の耐凍性増大過程 IX. 糖類の凍害に対する保護作用. 低温科学, 生物篇, **18**, 23.

Résumé

To clarify the relation of polyhydric alcohols to frost hardiness, the fluctuation of mannitol, sorbitol and glycerol in twig bark or leaf of 19 species of woody plants was studied quantitatively by the method of paper chromatography in the process of both natural and artificial frost hardening.

1) The content of glycerol in winter, ranged from about 0.1 to 0.15% (per wet weight) in the tea (leaf), climbing spindle-tree (leaf) and platanus (twig bark), while in the other 16 species, its content was very small in quantity (Table 1). Furthermore, during hardening both seasonal and artificial, glycerol content showed only a slight change which was obviously not significant. Therefore, it may be safely said that no direct relation exists between the frost hardiness and the content of glycerol.

2) In winter, the content of mannitol ranged from about 0.1 to 0.5% (per wet weight) in many species. Sorbitol content amounted to about 1% in apple tree (twig bark), gardenia (leaf), pomegranate (twig bark) and mountain ash (twig bark), but its content is very small in the other 15 species. In winter the contents of mannitol and sorbitol in many species increased 2 to 3 fold as much as in August, but in mulberry tree they reduced to a half of the summer value (Table 2). The total content of poly hydric alcohols in the pomegranate (bark), gardenia (leaf), apple tree (bark) and mountain ash (bark) in winter amounted to about 40 to 50% of total sugar content, but in other species used it does not amount even to 10% (Table 1).

3) In artificial hardening in early October when the artificial hardening in these trees is remarkably effective, increase in polyhydric alcohols did not exceed 0.1% to untreated controls in many species, while the increases in sugars ranged from about 1.0 to 1.7% in many species (Table 3).

4) Any positive correlation between the amount of polyhydric alcohols and the hardiness of trees was not observed in 19 species used (Table 1).

From the result mentioned above, in both natural and artificial frost hardening, polyhydric alcohols play little part in the increase of the frost hardiness in most of woody plants. However, in the species in which the total content of polyhydric alcohols amounts to about 40% of the total sugar content, namely, in the gardenia, apple tree, mountain ash and pomegranate, polyhydric alcohols are considered to play some part in the increase of their frost hardiness.