



Title	植物細胞間隙にできる氷晶について
Author(s)	照本, 勲; TERUMOTO, Isao
Citation	低温科学. 生物篇, 19, 17-22
Issue Date	1961-12-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17646
Type	departmental bulletin paper
File Information	19_p17-22.pdf



植物細胞間隙にできる氷晶について*

照 本 勲

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和36年8月受理)

I. 緒 言

アカビートの根が比較的高い温度 ($-4^{\circ}\sim-5^{\circ}\text{C}$) で長時間凍結されると、根の中には大きく成長した氷ができる。この氷は、主にアカビートの根の同心円的に発達した維管束環の部分に密にでき、容易に採集することができる。著者は¹⁾先に、この採集した氷を大量集めて、外側から順次融解して、その融解水の電気伝導度を測定して、その氷の純粋程度と細胞の凍結の様式とを考察した。今回は、予めアカビートを温度処理して、耐凍性をもつ hardy なもの、寒さに弱い unhardy なもの、および両者の中間のものをつくって、この寒さに対して異なった性質をもつアカビートの根が、凍結に際しどのような氷晶(単結晶)をつくり成長して行くかを比較検討し、アカビートの耐凍性と原形質膜の水に対する透過性との関係について考察した。

II. 方 法

この実験に使用したアカビート *Beta vulgaris* L. var. *Rapa* Dumort は耐凍性をもつ植物として知られている^{2),3)}。低温および高温処理は次のようにして行なった。鉢植えにしたアカビートを 0°C の恒温箱および 20°C の恒温箱の中に2~3週間処理する。照明を必要とするとき (hardy なものと unhardy なものの中のものをつくる場合は、葉上約20cmの距離から20W 棒型蛍光灯2本で24時間連続照射をし、2~3週間処理した。

凍結は、葉をつけたままの上述処理のアカビートの根をビニール布で包み、 $-4^{\circ}\sim-5^{\circ}\text{C}$ の低温室に1~3カ月にわたって凍結保存した。氷塊の採集は -10°C の低温室内で行ない、凍結したままの根をナイフで薄く横断し、予め冷却した清潔なピンセットで、冷却コルベン中に氷塊を集めた。採集した氷塊は、室温でコルベンを振盪しつつ徐々に氷塊の外部より融解させて、融解した水は順次2cc あて分注し、その各々について電気伝導度を測定した。水の電気伝導度は、コールラウシュブリッジを使用して測定した。低温固定は、凍結した組織を -10°C の冷固定液で4時間固定する方法によった⁴⁾。

氷晶の構造は、偏光顕微鏡によって観察した。最初、 -5°C の低温室で、アカビートの根の凍結組織より数mmの大きさの氷塊をとりだし、これを -20°C の低温室に移して、スライ

* 北海道大学低温科学研究所業績 第595号

ドグラス上におき、 -10°C に保ったアニリン液で接着させる⁵⁾。次に -30°C の低温室でよく研いだカンナで氷塊の表面をできるだけ平滑に削った上で、アニリンをはがして試料を裏かえし、再びアニリンで接着して新しい表面をカンナでけずる。試料の厚さは 0.5 mm くらいにする。これを -10°C の低温室に移し -7°C でアニリンをとかすと、氷の部分がよく判別できるようになる。このようにして作った切片標本を同じ -10°C の低温室に備えつけた偏光顕微鏡で観察し、カラーフィルムで撮影した。

なお、凍結組織細胞の生死は、室温で融解後顕微鏡的にしらべた。

III. 実験結果

1. アカビートの根の組織の生死

アカビートの根は、著しく肥大して肉質をなし、形は紡錘状倒円錐形をしている。このアカビートの根は、 $-4^{\circ}\sim-5^{\circ}\text{C}$ という比較的高い氷点下の温度で徐々に凍結させると、根の横断面では、細胞外にとられた水が大きな氷塊として成長し、管束環に約 1 cm の幅をもった氷の帯が形成される¹⁾。又、維管束と維管束とにはさまれた柔細胞層に数 mm おきに上記の氷の帯に直角に粒状の氷晶が同時に発達しているのが見られる。低温固定した横断面からわかることは、長時間にわたり徐々に細胞外に脱水されたため柔細胞層は異常に収縮し、一成長層ごとに分離されている組織が見られた¹⁾。

第 1 表 $-4^{\circ}\sim-5^{\circ}\text{C}$ 長期凍結による組織の生死と含水量

アカビートの状態	凍結日数	融解後の生死	含水量 (%)
hardy なもの	33	生	73.6
	57	生	83.1
	71	死	84.9
中間の性質をもつもの	33	70~80%生	83.6
	57	死	83.9
	71	死	84.5
	84	死	85.1
unhardy なもの	33	50%生	86.4
	57	死	82.6
	71	死	83.4
	84	死	80.7

先ず第一に 3 種の異なった性質をもったアカビートの根の $-4^{\circ}\sim-5^{\circ}\text{C}$ での凍結保存中におこる細胞の生死ならびに含水量の変化をしらべた(第 1 表)。第 1 表からわかるように、hardy な状態のアカビートは 57 日後もこの凍結のままではほとんどの細胞が生きている(図版 I-1)。unhardy な状態のものは 33 日で約 50% が凍死をおこし、57 日後では全細胞が凍死した。中間

の状態のものでは, unhardy なものにくらべて幾分耐凍性が大きい。何れの場合にも, 細胞が生きている時の低温固定像は, 明らかに細胞外凍結で, 凍死をおこした時には, 細胞内凍結像をあらわした。含水量については, hardy なものの 33 日後で 73.6% という非常に小さい値をとったが, 3 種の間で比較はできなかつた。この場合の含水量は, 粒状で容易にとりのぞくことのできる氷晶をのぞいたあとの柔組織の含水量で, 細胞内にできた小さな氷晶は含水量に含まれる。

2. 融氷水の電気伝導度

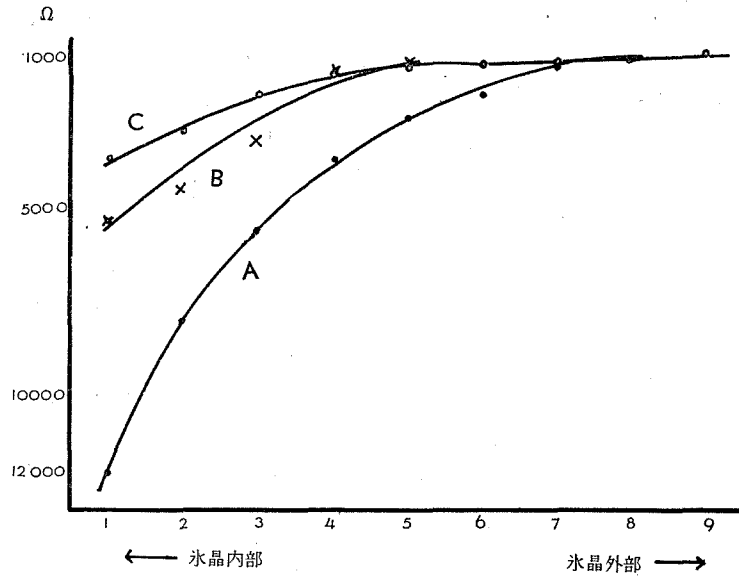
管束環にできる氷塊を大量あつめ, この氷塊をコルベン中でとかし, 初めに融けたものから順次均等にわけて試験管に分注して, この各々について電気伝導度を測定した結果を第 2 表にあらわした。No. 1 の試料は, 氷塊の最も外側の氷の融けた部分の水でアントシアンの滲出によって濃い紅色をしている。番号があとになるにつれ, 氷塊の中心部, すなわち維管束又は細胞間隙での凍結の初期に氷になった部分で, アントシアンの紅色は肉眼ではほとんど認められない。

第 2 表 融氷水の比伝導度 (凍結後 33 日の試料) (Mho)

	A: hardy なもの	B: 中間の性質をもつもの	C: unhardy なもの
No. 1	0.002314	0.002104	0.002571
No. 2	0.001780	0.001653	0.002336
No. 3	0.001157	0.001052	0.002104
No. 4	0.000890	0.000514	0.001925
No. 5	0.000625	0.000437	0.001780
No. 6	0.000437		0.001543
No. 7	0.000289		0.001157
No. 8	0.000193		0.000771
No. 9			0.000625

融氷水の電気伝導度は, 第 2 表からわかるように hardy なもの, 中間の性質をもつもの, unhardy なアカビート間で, 最初のとかし始めの試料はほとんど同じで, 比伝導度は最も大きい。すなわち最初の融氷水には電解質が多いが, 分注がすすむにしたがって hardy なものでは測定値の差が大きくなってくるが, unhardy なものでは分注がすすんでも, 測定値は余り変化しない。中間の性質をもつものは両者のほぼ中間の比伝導度を示した (第 1 図)。

この結果からわかることは, hardy なものでは氷晶のでき始め, 又, その発達経過において細胞破壊などの結果によって起る電解質の混入することが割合に少なかったのに反し, unhardy なものでは氷晶のできる最初から電解質の混入が多かったことをあらわしている。



第 1 図 氷塊内部から外部にわたる融解水の
電気伝導度 (凍結 33 日後の試料)

A: hardy なもの B: 中間の性質をもつもの C: unhardy なもの
縦軸……実測した電気伝導度 横軸……氷塊融解水の順序

3. 氷晶 (単結晶) の大きさ

アカビートの根の柔細胞は、 $150\mu \times 120\mu$ 位の大きさをもつ不規則な立方形をした細胞で、核は小さく、細胞液はアントシアンを含むために濃紅色をしている。葉柄の柔細胞と同じく hardening されると、最終温度 -6°C 程度の凍結でほとんど細胞外凍結をおこす²⁾。はじめ細胞膜の外面に生じた氷は細胞内部から水をうばって氷自身はしだいに発達して大きくなる。その結果、相当量の水分が細胞外に移される。凍結に際して、細胞の原形質膜が正常なうちは、細胞外の氷の成長に伴って水だけが徐々に細胞間隙に移って凍結し氷晶が成長して行く。この状態で unhardy のものは、比較的短期間に不可逆的な傷害をうけ、原形質膜の半透性が失われて電解質の溶出がおこり、アントシアンに対する半透性も失われて、細胞外の氷晶中に現われてくるようになる。

植物体内にできる氷は、天然の雪や霜などと同じように、できる場所は違ってもいずれも六方晶系に属する単結晶の集まりである。つまり、それらの外形の相違はこの単結晶の大きさ

第 3 表 単結晶の大きさ

アカビートの状態	単結晶の大きさ (mm^2)
hardy なもの	19.6
中間の性質をもつもの	13.9
unhardy なもの	3.1

や結晶の間に入っている夾雑物の違いによるのである。氷の結晶状態を知るためには、厚さが 1 mm 以下の薄片を作って、偏光顕微鏡でみると容易にわかる。色の同じ所が一つの単結晶で、おのおのの単結晶の結晶主軸の向きがそれぞれ違うため、色模様となる。これらの写真から、単結晶の大きさや、形や、

氷の中のすき間や他の夾雑物などの存在を知ることができる。

第3表はアカビートの根の凍結中にできる氷塊を偏光顕微鏡でみたものであるが、いずれの場合も単結晶の集まりであることがわかった。単結晶の大きさは明らかに三者で異なり、hardyなもの是最も大きく、中間の性質をもつものの単結晶は次に大きく、unhardyなものでは最も小さな単結晶からなっている(図版I-3, II-4, 5)。unhardyのもの凍結した場合にみられるように、小さな単結晶の集まっているものでは、結晶間に電解質やアントシアンなどの溶液がはさまりやすい。即ち、氷塊をとかしていった場合に、氷塊の中心部に近づいても融解水が、hardyなものにくらべて電解質が多い結果となっている(第1図)。

hardyなものアカビートにできる単結晶が大きく、unhardyなもの小さい単結晶ができることは、植物細胞の水に対する透過性が関係していると考えられる。植物細胞の水及び有機溶質に対する透過性は、その植物をhardenすると強く上昇し、この両者は年経過においても平行しておることがみとめられている⁶⁾。細胞の水に対する透過性が高ければ一定温度で凍らせた場合に、細胞表面での氷の生成速度は大きく、従って潜熱の放出が多くこの場所の温度は高められる。このことは必然的にそこにできる氷晶の大きさを増大する⁷⁾。この実験では、凍結温度が一定(-4°~-5°C)であるので、結晶核の成長には、アカビートの細胞の水に対する透過性の大小が関係し、hardyなものでは大きな単結晶、unhardyなものでは小さな単結晶を細胞間隙中に生成したものと考えられる。

摘 要

アカビートの根を、氷点下の比較的高い温度(-4°~-5°C)で凍結すると、根の中には大きく生成した氷塊が主に同心円的に発達した維管束環に密にできる。この氷は容易に採集できるが、この集めた氷塊を外側から順次とかし分注し、その各々について電気伝導度を測定し、更に氷塊を形づくっている単結晶の大きさ、形を偏光顕微鏡でしらべた。hardyなアカビート、unhardyなもの、その中間の性質をもつものの三者間で、氷塊はいずれも単結晶の集まりからなるが、単結晶の大きさはhardyなものでは最も大きく、unhardyなものでは最も小さい。又後者は結晶間に相当不純物を含んでいることは、電気伝導度の測定から明らかとなった。これらの単結晶の大きさをきめるものは、細胞の水に対する透過性であることを考察した。

終りに、御校閲下さった朝比奈英三教授、偏光顕微鏡写真撮影に御協力願った浅田実氏に感謝する。

文 献

- 1) 照本 勳 1960 植物組織内にできる氷塊について. 低温科学, 生物篇, **18**, 39-42.
- 2) 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**, 69-78.
- 3) 照本 勳 1958 植物の耐凍性と滲透濃度. 低温科学, 生物篇, **16**, 7-21.
- 4) 照本 勳 1958 植物細胞の低温固定像について. 低温科学, 生物篇, **16**, 1-5.

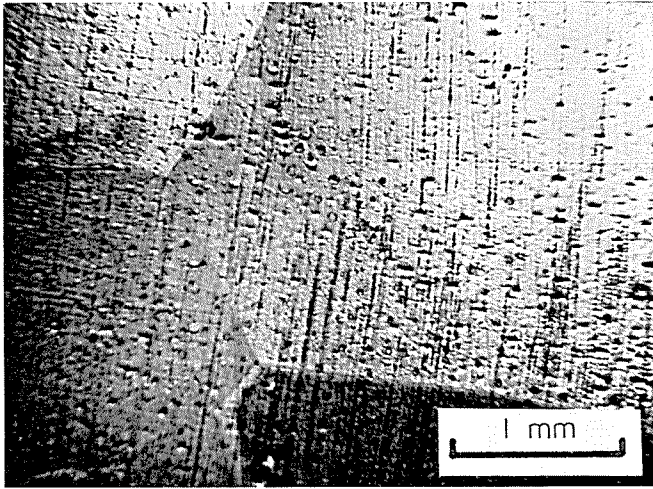
- 5) 木下誠一・若浜五郎 1959 アニリン固定法による積雪の薄片. 低温科学, 物理篇, **18**, 77-96.
- 6) Levitt, J. and Scarth, G. W. 1936 Frost-hardening studies with living cells. II. Permeability in relative to frost resistance and the seasonal cycle. *Canad. Jour. Res. C*, **14**, 285-305.
- 7) Asahina, E. 1956 The freezing process of plant cell. *Cont. Inst. Low Temp. Sci.*, **10**, 83-126.

Résumé

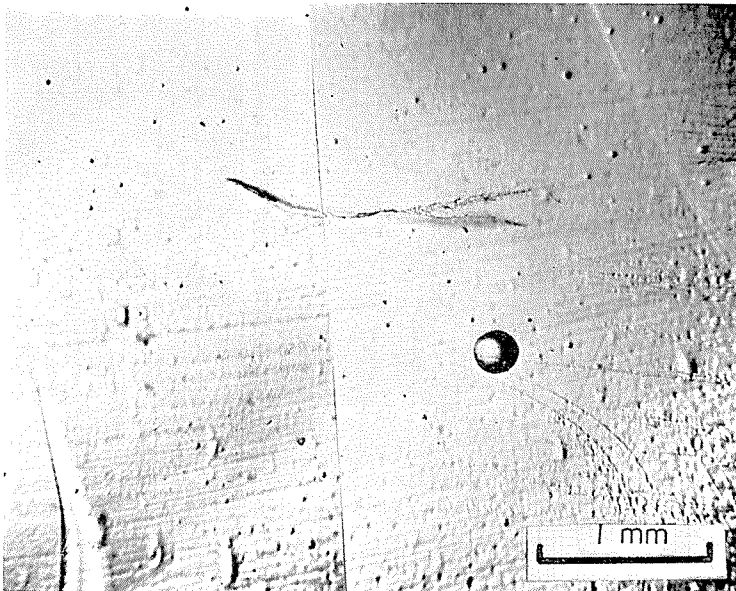
When the root of table beet was subjected to freezing at $-4^{\circ}\sim-5^{\circ}\text{C}$, ice masses appeared between cells, mostly in the concentric spaces in the vascular bundle ring region. The ice masses were collected from frozen root sectioned in cold room, and then thawed. As the thawing proceeded melted water from the ice masses was collected into test tube with every 2 cc of water. In tubes of water melted in this way, the electric conductivity was measured. Single crystals within ice masses were observed with polarizing microscope at -10°C .

Hardy, unhardy and a medium table beets were used as experimental material. Observation showed many hexagonal single crystals in ice masses in all three materials, however, in hardy table beet the size of a single crystal was largest while in unhardy beet it was the smallest. Besides, melted water from the ice masses in unhardy material contained a larger quantity of impurity than that from hardy one. The latter's specific conductivity remarkably increased successively from the inner part to outer surface of the ice masses, but in the former it was almost the same throughout the whole ice mass.

The difference in size of single crystals constituting the ice mass formed in root tissue seems certainly to be caused by the difference in permeability to water of cells in these three materials.



第4図 中間の性質をもつアカ
ビートの根の中にできる
氷塊の偏光写真。

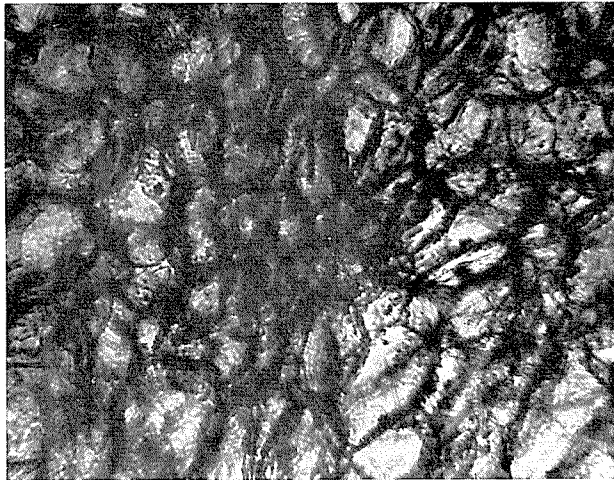


第5図 hardy なアカ
ビートの根の中
にできる氷塊の
偏光写真。

第1図 hardy なアカビートの根を
-4°~-5°C で33日間凍結後
融解, 生きている細胞を1M
平衡塩溶液中で原形質分離さ
せたところ。 ×110



第2図 同上のアカビートの根を低
温固定したもの。全部の細胞
が生きている。 ×110



第3図 unhardy なアカビートの根
の中にできる氷塊の偏光写
真。

