HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ボウアオノリの耐凍性
Author(s)	照本, 勲; TERUMOTO, Isao
Citation	低温科學. 生物篇, 19, 23-28
Issue Date	1961-12-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17647
Type	departmental bulletin paper
File Information	19_p23-28.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Isao TERUMOTO 1961 Frost-Resistance in a Marine Alga *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. *Low Temperature Science. Ser.* ***B*, *19*.** (With English résumé p. 28)

ボウアオノリの耐凍性*

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

寒冷，熱，乾燥，滲透濃度等に対する植物の抵抗性の研究は，海藻を材料として実験されたものが多い。特に海藻の垂直分布と種々な抵抗性との関連についての研究が多い[1),2),3)]。

著者は[4)]，さきに体制が比較的簡単なアナアオサの扁平葉状体を用いて，氷点下の種々の温度で凍結された場合の寒冷抵抗性を報告したが，今回は同じアオサ科の最も近縁な属に入るボウアオノリについて，その中空管状体組織の致死温度の測定と，その凍結様式とを細胞学的に調べ，あわせて原形質分離による害を耐凍性のわかったアナアオサと比較して，これらの海藻の耐凍性に対する滲透濃度の意義を考察した。

II. 方　法

使用したボウアオノリ *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. は，9月下旬に北海道小樽市忍路臨海実験所付近で採集したもので，実験に使用するまで0°Cの海水中に保存した。氷点下の種々の温度に対する抵抗性の実験は，小ペトリ皿（径3 cm，高さ2 cm）に海水2 cc を入れ，その中に約5〜7 cm の長さのボウアオノリを数個体入れ，種々の温度にさらし，適宜植氷してやり，容器中の海水の氷結が始まってから，それぞれ必要な時間だけ凍結させた。

その後，室温で融氷してから中性赤溶液 (1:10,000) で染色した。生きている細胞には，容易に中性赤溶液が透入し，液胞が赤く染まる。又，前報[4)]で使用したものと同じ条件のアナアオサ *Ulva pertusa* Kjellman を同時に実験材料として使用した。アナアオサは前述の容器に海水2 cc を入れ，その中に約2×2 cm の大きさに切った扁平葉状体小片をつけ凍結させた。アナアオサの染色の場合，中性赤は，容易に細胞内に透入するが，ボウアオノリのように液胞が赤く染まらず，細胞内にこんぺい糖状又は星状に赤く染まった部分が現われる。更に両者とも原形質分離法をも利用して細胞の生死を判定した。原形質分離剤としては，1M平衡塩溶液 (NaCl 等調) を用いた。低温での固定処理は[5)]，各凍結温度で4時間，低温固定して，その後室温で脱水し，サフラニン，ヘマトキシリン溶液で染色後，顕微鏡観察を行なった。この場合の切片の凍結方法は，カバーグラス上に一滴の海水をおき，その中に数 mm の長さに切ったボウアオノ

* 北海道大学低温科学研究所業績　第596号

リの管状切片を入れて凍結させ，カバーグラス共，冷固定液（エタノール＋氷酢酸，19＋1 容積）に入れて固定した。次に原形質分離による害をしらべるときは，1〜5 M の各平衡塩溶液 ($NaCl : CaCl_2 : 9 : 1$) 中に 10 分間入れてから，次いで脱イオン水に移し，再び 1 M 平衡塩溶液で原形質分離させ，そのときの再分離が可能な細胞の割合からその生存率をきめた。

III. 実 験 結 果

(1) 細胞学的観察

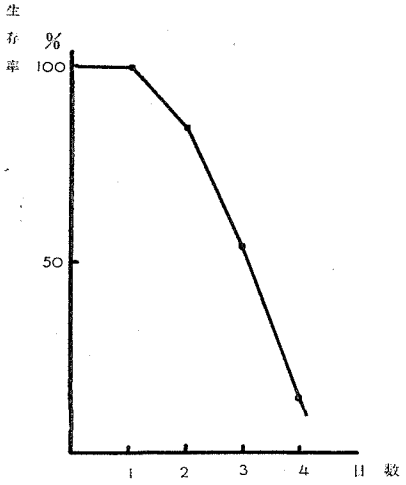
ボウアオノリの体は，単条又は分岐し，又は時には上部より僅の副枝を出す。長さは数 cm で組織は中空管状となり，一層の細胞よりなる（図版 I-1, 2)。細胞は 10〜16 μ の直径をもち，円形又は多角形にして，緑色の色素体は 1 個の盤状体をなし，その中央に 1 個のピレノイドをもつ。この組織は細胞間隙をもたない。この細胞の原形質分離の限界濃度は 0.79 M (NaCl) である。

(2) 耐 凍 性

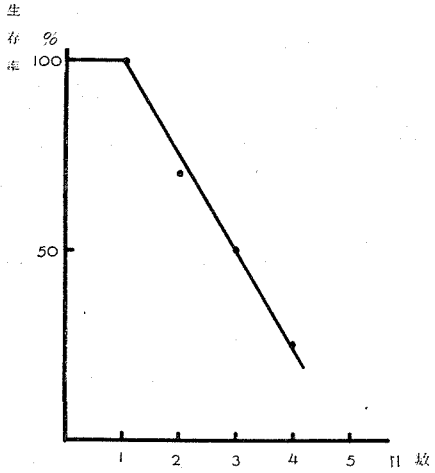
正常な細胞は，中性赤溶液を用いた生体染色で，容易に液胞が染色される（図版 I-2, 3)。

第 1 表 ボウアオノリの耐凍性 (24 時間凍結)

凍結温度 (°C)	凍結融解後の染色性 (中性赤)	凍結融解後の原形質分離の有無
−5	+	+
−10	+	+
−15	+	+
−20	+	+
−25	−	−



第 1 図 −20°C におけるボウアオノリの耐凍性

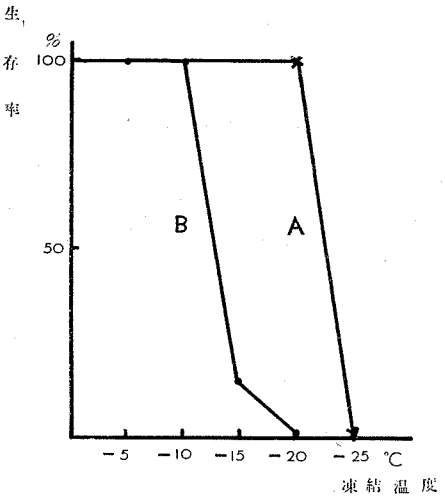


第 2 図 −10°C におけるアナアオサの耐凍性

凍結によって死んだ細胞は，融解後中性赤溶液で染色されず，原形質が凝固してしまっていることが分る（図版 I-4)。凍死によって凝固した細胞の原形質は，細胞膜よりはなれ，中央部に収縮していることが認められる。凍死した細胞では，色素体の形も色もピレノイドもほとんど変化ない。

ボウアオノリは，−20°C で 24 時間の凍結に耐えることができるが，それ以上の低温では凍死した。その結果は第 1 表にあらわした。又，第 1 図にあらわしたように，−20°C での凍結の場合，4 日目で大部分の細胞は凍死した。この凍死の傾向は，−10°C で凍結したアナアオサの場合とほとんど同じであった（第 2 図)。

第 3 図ではボウアオノリ，アナアオサの凍死曲線を示した。

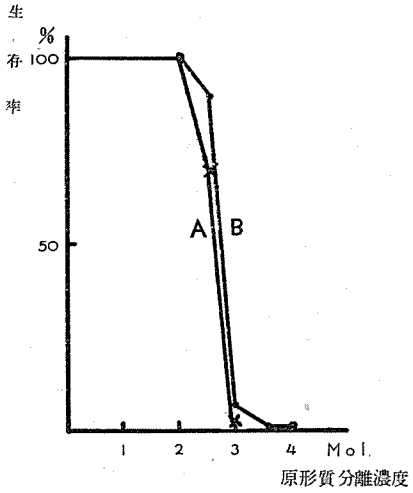


第 3 図　ボウアオノリ，アナアオサの凍死曲線
A：ボウアオノリ　B：アナアオサ

(3) 原形質分離の害に対する抵抗性

ボウアオノリの原形質分離による害は，第 4 図で示したが，3 M で原形質分離された場合には，大部分の細胞が死んでしまう。図からわかるようにボウアオノリとアナアオサとでは抵抗性の相違はみとめられなかった。

すなわち，−10°C (24 時間凍結) と −20°C (24 時間凍結) の致死温度をもつ，アナアオサとボウアオノリの間では，原形質分離の害に対する抵抗性は等しいことがわかった。



第 4 図　ボウアオノリ，アナアオサの原形質分離の害の比較
A：ボウアオノリ　B：アナアオサ

(4) 低温固定像

低温固定は，細胞が凍結している際の原形質の状態を知る目的で行なった。固定像は，原形質が膜より離れて収縮した，いわゆる凍結原形質分離像をあらわし，この状態で細胞外凍結をしていたものと思われた（図版 I-5, 6)。

IV. 考　　察

緑藻であるボウアオノリは，比較的強い海藻で，アオノリ属に属するものは海に産するのみならず，淡水中にもよく生育しており，殊に半鹹水の所に多い[7]。主に潮間帯付近に生育す

る。このアオノリ属の海藻は，現在まで寒冷抵抗の実験に二，三使用されてきた。

例えば *E. compressa* −8°C で 12 時間の凍結に耐える (Biebl '58)[2]。

E. clathrata (Roth) Greville −15°C で 21 時間の凍結に耐える (Biebl '56)[1]。

E. intestinalis −18°〜−20°C で 10 時間凍結後でも生存できる (Kylin '17)[8]。

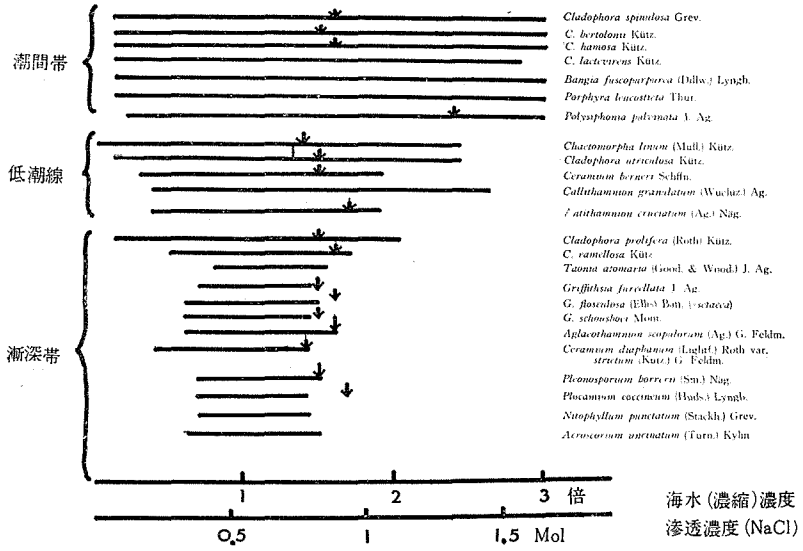
で，本実験で使用されたと同じ種は，前に Kylin によって実験されたが，致死温度は調べられてない。このようにアオノリ属は非常に寒さに強く，細胞が死んでも膜の収縮が少なく，葉緑体はほとんど変化しないのが特徴とされている。又，寒冷に対して抵抗性をもっているものは，熱，滲透濃度等に対する抵抗も同じように大きいのが普通であり，乾燥についても同じような事がいえる。例えば同じアオノリ属の *E. linza* は最高 84% の脱水にも耐えることができる (Kanwischer '57)[9]。

本実験に使用したボウアオノリの寒冷抵抗性は非常に大きく，−20°C, 24 時間の凍結には容易に耐えることができ，融氷後は正常に生存できた。然し，−20°C で 4 日間凍結させると，細胞の大部分は凍死した。又，固定細胞像から考えると，凍結に際して，細胞間隙をもたないこの組織では，細胞膜と原形質膜との間に氷ができ，このため細胞から水がとられ，細胞質は収縮して凍結原形質分離をおこすらしい。−20°C, 24 時間程度の凍結では，このような原形質の収縮したままの状態で凍結に耐えることができるが，処理日数の増加とともに凍死率も増加する。

藻類全般に，稀薄海水，濃縮海水，乾燥，光等の生態的要因に対して，同じ分布地をしめている海藻間では非常に似た反応を示すことが知られている。例えば三つの生態的グループ

(1) 潮間帯の海藻 (2) 潮だまり，低潮線のもの (3) それより深い所に生育するもの の間では明らかに上述の要因に対する抵抗性は異なっている。同じ生育地をもつ海藻は，寒冷抵抗と滲透抵抗が非常に似ていることが認められているが，現在まで滲透価については何にもいわれていない。同じ滲透価をもつものでも寒冷に弱いものと強いものがある。ボウアオノリとアナアオサは，原形質分離の害に対する抵抗が同じであるが，両者の滲透濃度が異なっている。すなわち，両者の耐凍性は滲透濃度と平行関係をもっているといえる。

第 5 図は，Biebl (1952) の表をグラフに書きかえたものであるが，これからわかることは，滲透抵抗は生育の場所によって非常に異なっているのがわかるが，滲透濃度は三つの生態的グループで余り変っていない。即ち，この場合には滲透抵抗の度合が耐凍性の要因となっている。Biebl の用いた低張，高張抵抗 (Hypo-und Hyper-tonieresistenz) は，種々の稀釈又は濃縮海水中に 24 時間藻類試料を入れる方法で，著者の実験で用いた Siminovitch and Briggs の原形質分離害に対する抵抗実験 (Test for resistance to plasmolysis injury) と本質的に同じものといえる。又，両者ともその抵抗性の値は原形質分離後の細胞に無害である濃度の限界をもとにしている。この Biebl の結果と，本実験の結果とから，海藻の耐凍性については次の如くいうことができる。即ち，原形質分離の害に対する抵抗が大きい海藻は，抵抗の小さなものにくらべて耐凍性は大きく，又，この抵抗の等しい海藻間では，滲透濃度に比例し高いものは低いものに



第 5 図　生育場所を異にする海藻間の，滲透圧に耐えられる範囲と滲透価 (Biebl 1952 の第 1 表をグラフに書きかえたもの)
↓: 滲　透　価

くらべて耐凍性は大きいといえる。

摘　　要

体制が比較的簡単なボウアオノリの中空管状の組織を用いて，氷点下の種々の温度で凍結させた場合の致死温度をしらべた。この緑藻は潮間帯に分布する海藻としては，低温に対する抵抗性大きく，−20°C，24 時間の凍結にもよく耐えることができるが，−25°C で 24 時間の凍結では凍死した。低温固定像から，凍結中のボウアオノリの細胞は，原形質が収縮して凸型の凍結原形質分離の状態で，凍結に耐えているようにみえる。温度がより低下すると凸型凍結原形質分離のまま凝固死をおこしてしまう。故に，ボウアオノリの凍結様式は，この冷却条件では細胞外凍結で原形質内に氷はできない。凍結に耐えた細胞は融氷に際して，とけた水を原形質内に吸水してもとの正常な細胞にもどることができる。次に，ボウアオノリとアナアオサの原形質分離の害に対する抵抗性を比較し，Biebl のデーターをもとにして，次のことを考察した。即ち海藻の耐凍性は，培養の滲透濃度に対する抵抗が等しい限りにおいて，滲透濃度の高いもの程大きく，低いものほど小さいといえる。

終りに，御校閲下さった朝比奈英三教授，本種の同定を願った理学部阪井与志雄氏に感謝する。

文 献

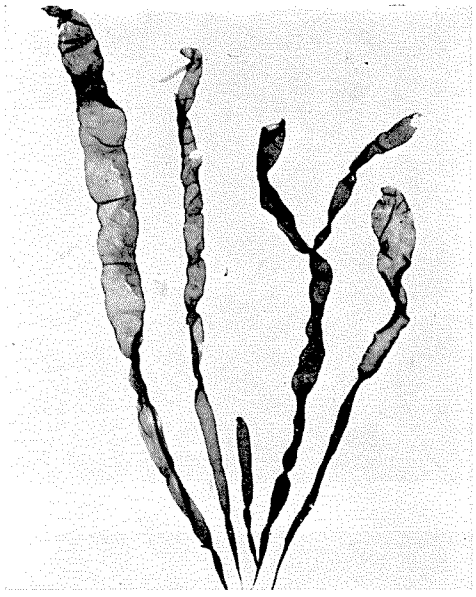
1) Biebl, R. 1956 Zellphysiologisch-ökologische Untersuchungen an *Enteromorpha clathrata* (Roth) Greville. Ber. Dtsh. Bot. Ges., ***69***, 75-86.
2) Biebl, R. 1958 Temperatur- und osmotische Resistenz von Meeresalgen der bretonischen Küste. Protoplasma, ***50***, 217-242.
3) Biebl, R. 1959 Das Bild des Zelltodes bei verschiedenen Meeresalgen. Protoplasma, ***50***, 321-339.
4) 照本 勳 1960 アナアオサの耐凍性. 低温科学, 生物篇, ***18***, 35-38.
5) 照本 勳 1858 植物細胞の低温固定像について. 低温科学, 生物篇, ***16***, 1-5.
6) Siminovitch, D. and Briggs, D. R. 1953 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust in relation to its frost hardiness. III. The validity of plasmolysis and desiccation tests for determining the frost hardiness of bark tissue. Plant Physiol., ***28***, 15-34.
7) 岡村金太郎 1936 日本海藻誌. 内田老鶴圃 (東京).
8) Kylin, H. 1917 Über die Kälteresistenz der Meeresalgen. Ber. Dtsh. Bot. Ges., ***35***, 370-384.
9) Kanwisher, J. 1957 Freezing and drying in intertidal algae. Biol. Bull., ***113***, 275-285.
10) Biebl, R. 1952 Ecological and non-environmental constitutional resistance of the protoplasm of marine algae. J. Mar. Biol. Ass. ***31***, 307-315.

Résumé

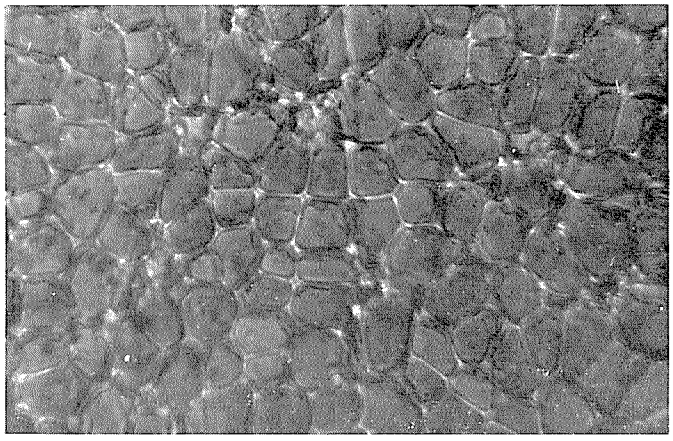
To examine its frost-resistance, a marine alga *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. was subjected in sea-water to graded temperatures from −5°C to −25°C for various length of time.

As a result of the experiment it was found that, at least for 24 hours, the algae can tolerate freezing at −20°C without death. Even under the continuous frozen state at −20°C about half of all the tissue cells in this algae could survive freezing for 3 days. In this alga, freezing of the tissue at temperatures below −25°C results in fatal injury to the cells. As the present species grows chiefly in the intertidal zone, its resistance to low temperature is very high. The fixed pattern of cells of this algae with a cold fixative observed under microscope shows the occurrence of frost-plasmolysis in the cells (Plate II-5). In cells frozen in this way intracellular freezing does not occur. The cause of frost-killing of this algae seems to be excessive dehydration of protoplasm.

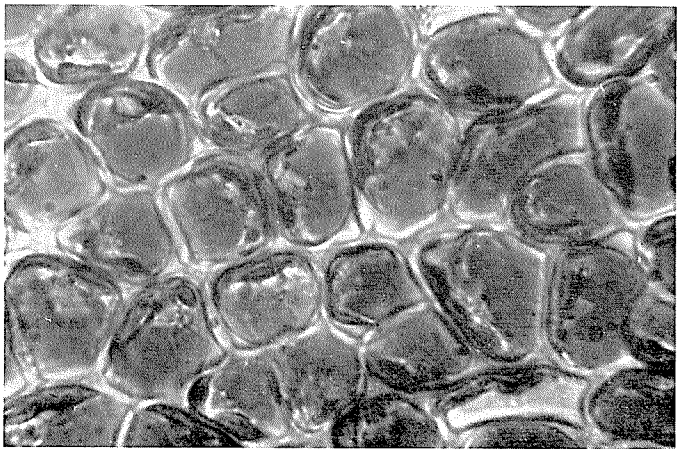
Further, *Ulva perutusa* Kjellman was used as experimental material. The frost-resistance and tonicity in cells of this algae is lower than in *E. intestinalis*. In this algae freezing of the tissue at temperatures below −15°C results in fatal injury to the cells. In both the alga studied the plasmolysis in their cells caused by 3 M balanced salt solution was remarkably injurious. It may, therefore, be safely said that in algae cells having similar osmotic-resistance or resistance to plasmolysis, the higher the osmotic concentration, the higher the frost-resistance.



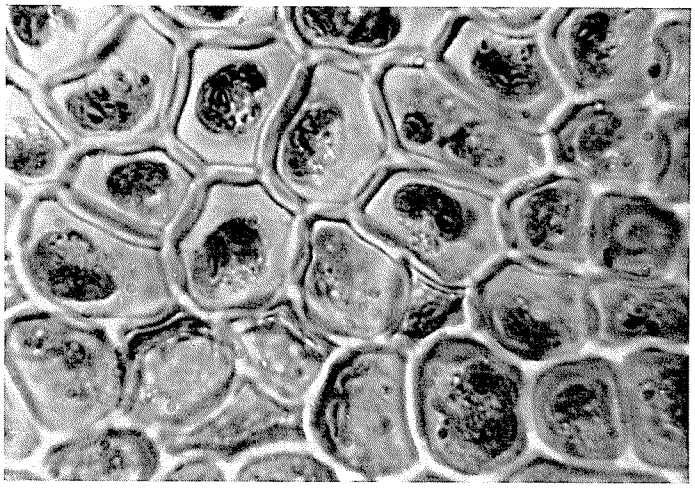
第1図　ボウアオノリ。
× 0.95



第2図　正常なボウアオノリの細胞（中性赤で染色）。
× 390

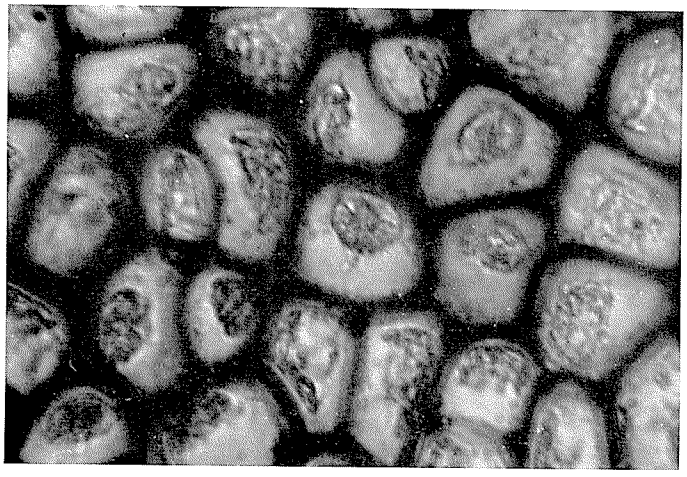


第3図　−20℃, 24時間凍結し融解後中性赤で染色後の原形質分離像（原形質分離剤，1M平衡塩溶液）。
× 1000



第4図　−35°C，2時間凍結し融解した凍死細胞。　× 1000

第5図　−10°C，2時間凍結後低温固定し染色した細胞。原形質が膜よりはなれたこの状態で凍結に耐えている。　× 1000



第6図　−25°C，24時間凍結後低温固定し染色した細胞。凍死細胞。　× 1000