



Title	超低温における植物の生存 III : 耐凍性の大きさと効果的予備凍結温度との関係
Author(s)	酒井, 昭; SAKAI, Akira
Citation	低温科学. 生物篇, 21, 1-16
Issue Date	1963-12-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17669
Type	departmental bulletin paper
File Information	21_p1-16.pdf



超低温における植物の生存 III*

—耐凍性の大きさと効果的予備凍結温度との関係—

酒 井 昭

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和38年7月受理)

I. 緒 論

著者は生物を超低温で生存させる一つの方法としての予備凍結法を報告した^{1),2),3)}。この方法は細胞外凍結によってあらかじめ細胞内の凍り易い水を十分に除いておけば、致死的な細胞内凍結が防げるので、生物を急速に超低温に冷やしても生物は害を受けないという立場にもとづいている。そしてクワの皮層組織やコリヤナギ、ポプラの枝を用いて、これらの植物を超低温で生存させる予備凍結温度が -30°C 前後にあることを明らかにした^{1),2),3)}。また朝比奈の実験では、昆虫^{4),5)}やカキの鱗⁶⁾の細胞は -30°C で予備凍結した場合にのみ生存し、それより高い温度で予備凍結したものは超低温に生きられなかった。グリセリン処理した人⁷⁾や牛⁸⁾の精液は -20°C 以上の予備凍結温度では生存率がきわめて低いが、 -30°C 以下では生存率が最高になる。また木の枝やその皮層細胞では、 -30°C 以下 -70°C までいろいろな温度で予備凍結してから液体チッソ¹⁾又は液体ヘリウム⁹⁾の中に入れても生存率は殆んど変わらない。

Tumanov等^{10),11),12)}は -30°C から -70°C までの温度範囲においても、急速冷却によって細胞内凍結がおこると考え、約 -70°C まで徐々に冷却後始めて液体チッソ中に投入している。またParker^{13),14)}はストロブ松の葉を -90°C まで徐々に冷却してから液体酸素中に投入している。彼はこの実験を成功させるには、冷却及び融解の速度のおそい事が最も必要であると強調している。しかし、TumanovもParkerも -30°C の温度で予備凍結してから液体チッソ中に投入する実験を行っていない。かように、TumanovもParkerも、凍害は -30°C 以下においても温度の低下とともに増すものと考えている。また著者は3年前、ヤナギの枝で効果的予備凍結温度が採集の時期や樹種によってかなり異なることを見出した。このような事実から考えて、効果的予備凍結温度を従来のように固定して考えることには問題があるように思われる。

本論文は超低温における生物の生存の機構を明らかにする目的で、耐凍性の大きさと効果的予備凍結温度との関係を中心にして、1961年から1963年4月までの間に行なったものである。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第642号

実験材料を使用させて頂いた北大農学部林学科村井教授、東三郎氏及び実験材料を送って頂いた北大雨竜演習林派出所の各位に対して感謝の意を表します。

II. 実験材料及び方法

実験材料として次の樹種を用いた。コリヤナギ (*Salix koriyanagi* Kimura), ナガバヤナギ (*Salix sachalinensis* Fr. Schum.), ドロノキ (*Populus maximowiczii* Henry), ポプラ (*Populus nigra* L. var. *italica* Muenchh.), シラカバ (*Betula tauschii* Koidz.), バラ (*Rosa pendulina* L.), ヤマハンノキ (*Alnus hirsuta* Turcz.), リンゴ (*Malus pumila* Mill.), ゲイマツ (*Larix dahurica* Turcz. var. *japonica* Maxim.), ハイマツ (*Pinus pumila* Regel), トドマツ (*Abies sachalinensis* Masters), アカエツマツ (*Picea glehni* Masters), ドイツトウヒ (*Picea abies* Karst), オウシュウアカマツ (*Pinus sylvestris* L.).

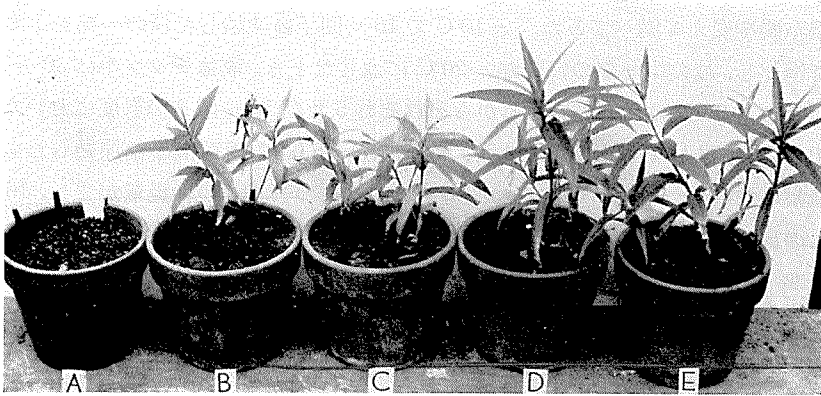
実験材料はその年に伸長した枝の先端部を用いた。予備凍結させるばあいには、枝は5～7 cmの長さに切り、2～3本の枝を糸でしばり、乾燥を防ぐためポリエチンの袋に入れて -5°C の恒温箱で凍結させた。なお枝の先端に水をつけて過冷却を破れやすいようにした。 -5°C で凍結後、30分毎に 5°C 宛低い恒温箱に移して所定の温度まで冷却した。なお液体チツソ (-196°C) 中に入れる場合には、ポリエチレンの袋を取去り、おもりをつけて枝を液体チツソ中に入れた。この場合、 -20°C で予備凍結した枝(長さ10 cm, 直径0.5 cm)の髄の中に熱電対を挿入して測定した結果、約8～9秒で枝の温度は -196°C に達した。したがって、この場合の冷却速度は1分間に約 1300°C であった。液体チツソから取出して1時間 -10°C の部屋においた後、 0°C の部屋に取出しそこに24時間おいてから室温に移した。それから2カ月間水挿した後、芽の伸長状態、茎の各組織における褐変の度を調べて害を判定した。約2カ月間水挿しないと害の判定ができないが、このような長い水挿期間中に枝の切口から腐敗菌が侵入して二次的に害されることがある。ことにある程度凍害を受けている枝ではその傾向が多い。常緑樹の場合には2カ月間の水挿後なお葉が正常で枝のどの組織にも褐変がなく、芽が伸長しているものを正常なもののみとした。この水挿の方法は時間がかかるし、理想的な方法ではないが、発根しない切枝の場合には、これ以外に適当な方法がない。原形質分離法やテトラヅリュウムクロライドを用いて調べても、それは用いた細胞についての害の相対値はわかるが、切枝全体としての害を判定することは出来ない。ヤナギのように発根しやすい材料では、もし枝が正常であれば発根して個体となるので害を正しく判定できる。したがって、やむをえない場合以外は出来るだけヤナギを実験材料として用いた。

III. 実験結果

1. ヤナギの枝を液体チツソ中で生存させる効果的予備凍結温度

効果的予備凍結温度を知るために、耐凍性の最も大きい状態のヤナギの枝を -10° , -15° , -20° , -25° 及び -30°C の各温度でそれぞれ16時間凍結後、液体チツソ中に15分間入れた。ついで -10°C の部屋に取出して1時間おいてから $0^{\circ}\sim-2^{\circ}\text{C}$ の部屋に移しそこに1日間おい

た。第1図は液体チッソ処理後、温室にて2カ月間挿木したヤナギの枝の生育状態を示す。
 -10°C で予備凍結した枝は死んでいたが、 -15°C 以下 -30°C までの温度で予備凍結したものは正常に発芽し発根した。



第1図 予備凍結温度と液体チッソ処理後の生育状態との関係 (1)

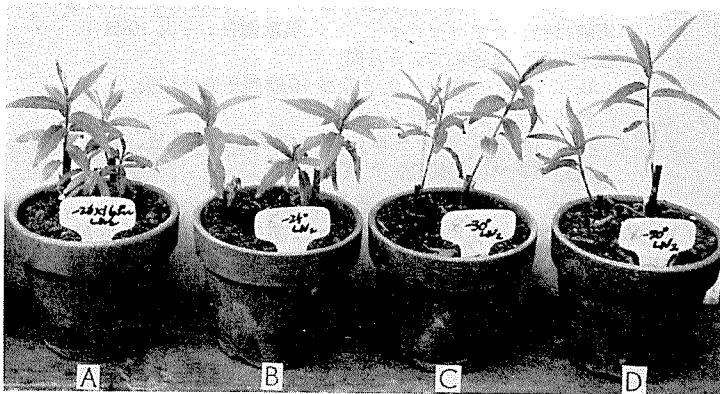
実験材料：ナガバヤナギ 実験期日：1月15日

挿木期間：温室にて2カ月間 予備凍結：16時間

A, B, C, D 及び E はそれぞれ -10° , -15° , -20° , -25° 及び -30°C の各温度で予備凍結後、液体チッソ中に処理した枝を示す。

第1図の B, C の枝は D, E より伸長量がすくない。これは B, C の枝では1本の枝から2本新梢が出ているのに、D, E では1本の枝から1本の新梢しか出ていないためである。なお B, C の枝はすくなくとも半年間は正常に伸長をつづけた。

2月初旬、耐凍性がやや低下している時期の材料を -15° , -20° , -25° , -30° 及び -70°C の各温度でそれぞれ16時間予備凍結してから液体チッソ中で処理した。第2図にその結果を



第2図 予備凍結温度と液体チッソ処理後の生育状態との関係 (2)

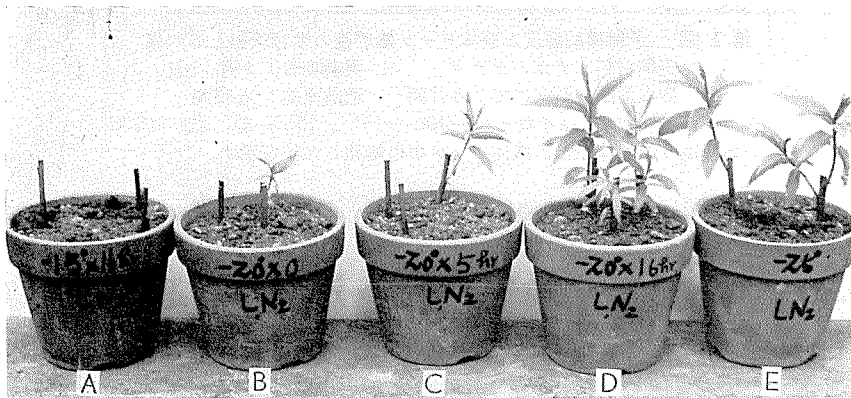
実験材料：ナガバヤナギ 実験期日：2月10日

挿木期間：温室にて2カ月間 予備凍結：16時間

A, B, C 及び D はそれぞれ -20° , -25° , -30° 及び -70°C の各温度で予備凍結後、液体チッソ中で処理した枝を示す。

示す。−20°C 以下の温度で予備凍結した場合には、正常に発芽、発根したが第1図の場合とちがって、−15°C で16時間予備凍結したものは発芽しなかった(第3図A*)。したがって、同一のヤナギの木からとった枝でも採集時期によって予備凍結温度が異なる。

この時期のヤナギの限界予備凍結温度が−20°Cであることが判ったので、−20°Cにおける予備凍結時間を変えて調べてみた。−10°Cで16時間予備凍結した枝の一部を1時間5°Cの冷却速度で冷却し、枝の中心部の温度が−20°Cに達したとき、液体チッソ中に30分間入れた。なお他の材料は−20°Cの温度に達してからそれぞれ5及び16時間その温度においたのち、液体チッソ中に30分間入れた。第3図に示すように、−15°Cで16時間予備凍結したものは殆んど発芽、発根しないが、−20°Cにおく時間が長くなるにつれて芽の伸長量がまし、16時間予備凍結したものは正常に発芽発根した。なお−15°Cから1時間5°Cの冷却速度で冷却し、枝の中心部の温度が−25°Cに達したときその枝を液体チッソ中に入れたばあいにはどの枝も正常であった。



第3図 −20°Cにおける予備凍結時間と液体チッソ処理後の生育状態との関係

実験材料：ナガバヤナギ

実験期日：2月10日

挿木期間：温室にて2カ月間

B, C Dは−20°Cで0, 5及び16時間予備凍結後、
液体チッソ中で処理した枝

A, Eは−15°及び−20°Cで16時間予備凍結後、
液体チッソ中で処理した枝

2. 液体チッソ及び液体ヘリウム中で処理したばあいの効果的予備凍結温度

いろいろな温度で予備凍結してから、液体チッソ(−196°C)と液体ヘリウム** (−272°C) 中で処理したばあいの効果的予備凍結温度に差があるか調べてみたが、第1表に示すように両者の間に差が認められなかった。

* 第2図と第3図に示した実験は同一期日に行った。

** この実験は東京都武蔵野市電気通信研究所で行なった⁹⁾。

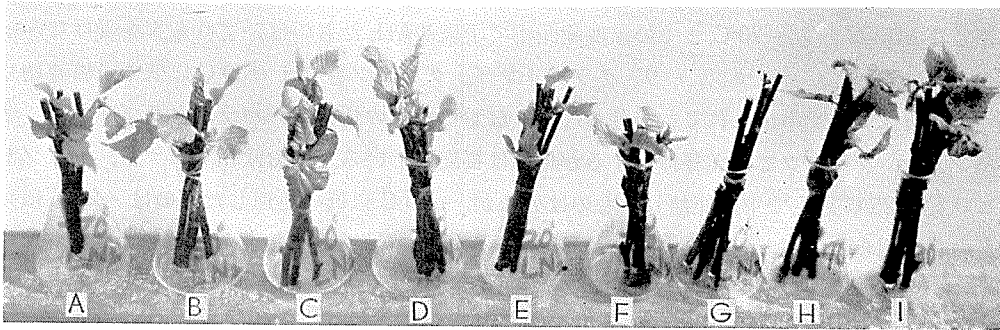
第 1 表 液体チッソと液体ヘリウム中で処理した場合の効果的予備凍結温度

	予 備 凍 結 温 度 (16 時間)				
	-10°C	-15°C	-20°C	-30°C	-70°C
液体チッソ	×	×	○	○	○
液体ヘリウム	×	×	○	○	○

実験期日：2月12日 実験材料：ナガバヤナギ ×：死，○：正常

3. ヤナギ以外の材料における効果的予備凍結温度

1月にシラカバ及びダケカンバの枝を -10° 、 -15° 、 -20° 、 -30° 、 -40° 、 -50° 及び -70°C の各温度に16時間予備凍結してから液体チッソ中に30分間入れた。シラカバもダケカンバも -10°C での予備凍結後、液体チッソ中に処理したものは死んだが、 -15°C 以下で予備凍結したものは正常に発芽したし、材部にも害が認められなかった。第4図にシラカンバの結果を示す。

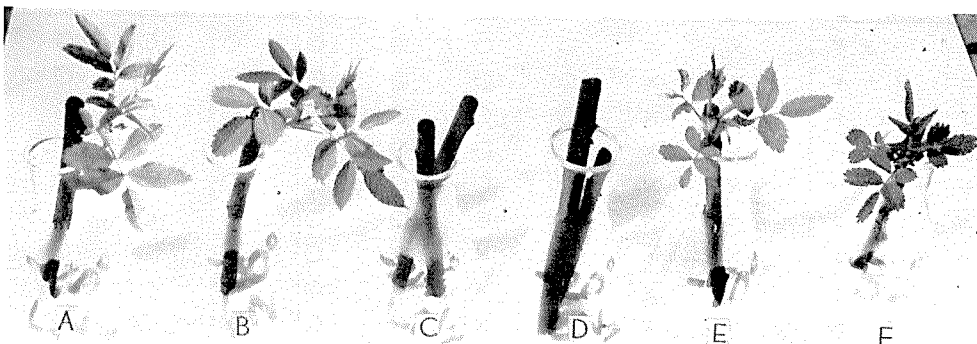


第 4 図 予備凍結温度と液体チッソ処理後の発育状態との関係 (3)

実験材料：シラカバ 実験期日：1月20日

予備凍結：16時間 水挿期間：1カ月

A, B, C, D, E 及び F はそれぞれ -70° 、 -50° 、 -40° 、 -30° 、 -20° 、 -15° 及び -10°C の各温度で予備凍結後、液体チッソ中に処理した枝
H, I は -70° 及び -30°C で16時間凍結した枝



第 5 図 予備凍結温度と液体チッソ処理後の枝の発育状態との関係 (4)

実験期日：1月20日 実験材料：バラ

予備凍結：16時間 水挿期間：2カ月

A, B, C 及び D はそれぞれ -70° 、 -30° 、 -25° 及び -20°C の各温度で予備凍結後液体チッソ中で処理した枝
E, F は -70° 及び -30°C で16時間凍結した枝

第5図はバラを各温度で予備凍結後、液体チッソ中に入れた場合の結果である。バラの枝の耐凍性を高めるために、あらかじめ -10°C で5日間凍結状態において十分にhardeningした後、 -15°C から -70°C までの各温度で16時間予備凍結した。なおバラの枝の中で最も耐凍性の大きい芽は、 -30°C 及び -70°C での16時間の凍結に耐えるが、材部は -30°C 以低で害を受けるので、枝全体として無害で耐えうる温度は $-27^{\circ}\sim-28^{\circ}\text{C}$ である。第5図に示すように、 -30°C 以低で予備凍結したものは、液体チッソ処理後正常に発芽したが、 -25°C 以高で予備凍結したものは全く発芽しなかった。この場合発芽している枝でも材部は害を受けて褐変していた。

いろいろな樹種における耐凍性の最も大きい状態の枝の効果的予備凍結温度が第2表に示されている。この場合、ヤマハンノキ、クラブリンゴ、バラ、グイマツ、ハイマツの枝は予備凍結前、 -10°C であらかじめ7日間hardeningして耐凍性を高めておいた。どの樹種も -5°C 以高の温度で予備凍結した場合には例外なく死ぬ。耐凍性の大きいヤナギ、ドロノキ、シラカバ等では -15°C から -70°C までの温度範囲内で予備凍結したものはいずれも害を受けなかった。それに対して、ハイマツ、バラ、クラブリンゴ、グイマツ等では -30°C 以低で予備凍結しなければ液体チッソ中に入れても発芽しない。なおこれらの樹種中、バラ、クラブリンゴ、ヤマハンノキ、グイマツでは発芽伸長するが材部は褐変している。なお欧州アカマツ、ドイツトウヒでも -25°C 以高で予備凍結したものは死ぬが、 -30°C 以低で処理したものは -25°C 以高のものより明らかに害が少なくない。 -30°C と -40°C で予備凍結したものの差は殆んどないが、ハイマツでは耐凍性の小さいものは -30°C より -40°C で予備凍結した方が害が少なくないが、耐凍性の大きいものでは両者の間に差が認められない。また -30°C 又は -40°C で予備凍結するより -70°C で予備凍結した方が害が少なくないという結果は得られなかった。

第2表 樹種による効果的予備凍結温度の差 (1月)

樹 種	予 備 凍 結 温 度								
	-5°	-10°	-15°	-20°	-25°	-30°	-40°	-50°	-70°
ナカバヤナギ	×	△	○	○	○	○	○	○	○
コリヤナギ	×	×	○	○	○	○	○	○	○
ドロノキ	×	×	○	○	○	○	○	○	○
ダケカンバ	×	×	○	○	○	○	○	○	○
シラカバ	×	×	○	○	○	○	○	○	○
ポ プ ラ	×	×	×	○	○	○	○	○	○
ハイマツ	×	×	×	×	×	○	○	○	○
バ ラ	×	×	×	×	×	○*	○*	○*	○*
クラブリンゴ	×	×	×	×	×	○*	○*	○*	○*
ヤマハンノキ	×	×	×	×	×	○*	○*	○*	○*
グイマツ	×	×	×	×	×	○*	○*	○*	△*

いずれの樹種も耐凍性のもつとも大きい状態の枝について測定した。

○：正常，△：発芽するが害を受けている場合，×：死

*：正常に発芽するが材部が褐変している場合

4. hardening による効果的予備凍結温度の変動

上に述べた結果から、枝を液体チッソ中で生存させる予備凍結温度は耐凍性の大きさによってかなり異なることが判った。このことをさらに確かめるために、hardening してあらかじめ耐凍性を高めた場合に効果的予備凍結温度が変わるか調べてみた。枝を採集してから -15°C から -70°C までの各温度で4時間予備凍結したものと、 -10°C で5日間 hardening してから同一条件で予備凍結したものとを液体チッソ中に入れて害の割合を比較した。この場合、耐凍性の比較的小さい材料では、冷却速度を小さくしたり、予備凍結時間を長くすると、その間に hardening するおそれがあるので、 -5°C で凍結後2時間以内に -30°C まで冷却した。また予備凍結は各温度で4時間おこなった。第3表は12月初旬から3月下旬までの各時期の枝及び各時期に -10°C で5日間 hardening した枝を液体チッソ中に入れたあとの枝の生死を示す。効果的予備凍結温度は -15°C から -30°C までの温度範囲内で変動していて、耐凍性の大きいものほどその温度が高い傾向がある。また -30°C での16時間の凍結に耐えない枝は何度で予備凍結しても超低温で生存できない。しかし、これらの枝を -10°C で5日間低温処理すると耐凍性は著しく増す。なお -5°C で予備凍結後、液体チッソ中に入れた場合には例外なく死ぬ。しかし、 -10°C で予備凍結した場合には、凍耐性が最も大きい枝では発芽、発根するが正常のものより伸長量が少なく発芽、発根もおくれる。なおヤナギでは、 -30°C の凍結に耐えられる

第3表 Hardening による効果的予備凍結温度の変動

実験期日	予 備 凍 結 温 度								枝の耐凍性* (16時間凍結)
	-10°	-15°	-20°	-25°	-30°	-40°	-50°	-70°	
12月5日	N	●	△	○	○	○	○	○	-70°C
	H	●	○	○	○	○	○	○	-70°C
1月5日	N	●	○	○	○	○	○	○	-70°C
	H	△	○	○	○	○	○	○	-70°C
2月28日	N	●	●	●	○	○	○	○	-70°C
	H	●	△	○	○	○	○	○	-70°C
3月11日	N	●	●	●	●	●	●	●	-25°C
	H	●	●	△	○	○	○	○	-70°C
3月20日	N	●	●	●	●	●	●	●	-25°C
	H	●	●	△	○	○	○	○	-70°C
3月25日	N	●	●	●	●	●	●	●	-25°C
	H	●	●	●	△	○	○	○	-70°C

実験材料：ナガバヤナギ

hardening の条件： -10°C で5日間凍結状態

N：無処理，H：hardening したもの，予備凍結：4時間

○：液体チッソ処理後正常なもの △：液体チッソ処理後発芽発根するが異常なもの

●：液体チッソ処理後死んだもの

*：耐凍性の大きさは -20°C から -70°C までの各温度で16時間凍結し、耐える最低温度であらわした。

ようになった枝は -70°C の凍結にも耐えうる。

5. 耐凍性を効果的にます温度について

上に述べたように、 -30°C の凍結に耐えうるヤナギはそれ以下のどの低温度にも耐えうるので、このような枝では耐凍性の大きさを比較できない。しかし、枝の効果的予備凍結温度を測れば、それらの耐凍性の大きさを比較出来るので、この方法を用いて効果的な hardening 温度が調べられるはずである。

2月11日に同一の木から採集したヤナギの枝を 0° 、 -5° 、 -10° 及び -15°C の各温度で5日間 hardening した。処理後 -15°C から -30°C までの各温度で4時間予備凍結してから液体チッソ中に入れた。この場合に、それぞれの予備凍結温度まで冷却する速さがおそく、また予備凍結時間が長いと、その間に hardening するおそれがあるので、材料は室温から -5°C の部屋に入れて凍結後、約2時間で -30°C まで冷却した。なお予備凍結は4時間おこなった。第4表に示すように、 -10°C で hardening したものが最も hardening 効果が大きい。 -15°C で hardening したものは -10°C で予備凍結できないので、 -10°C で予備凍結後液体チッソ中に入れた結果をしることが出来ない。しかし、 -15°C 以下で予備凍結した場合には、 -10°C と -15°C 処理との間に hardening 効果の差が認められない。図版 (I-1, 2, 3) にそれぞれ 0° 、 -5° 及び -10°C の各温度で5日間 hardening した場合の結果を示す。

第4表 Hardening の温度と効果的予備凍結温度との関係

hardening の温度	予 備 凍 結 温 度			
	-10°	-15°	-20°	-30°
無 処 理	●	△	○	○
0°	●	●	○	○
-5°	●	△	○	○
-10°	△	○	○	○
-15°	—	○	○	○

実験材料：ナガバヤナギ

実験期日：2月11日

hardening：各温度で5日間

予備凍結：4時間

○：液体チッソ処理後正常なもの

△：液体チッソ処理後発芽発根するが正常でないもの

●：液体チッソ処理後死んだもの

6. -40°C 以下における凍害について

前に述べたように、ヤナギ、ドロノキ、シラカバ類では -30°C での凍結に耐えられるようになった枝はそれ以下のどの低温にも耐えられる。しかし、 -30°C での1日間の凍結に耐えうるが、 -40°C 以下では害が現われる樹種も少なくない。第4表に示すように、クラブリング、バラ及びヤマハンノキでは -30°C での1日又は2日間の凍結に害なく耐えるが、 -40°C まで温度をさげると材部に害が現われる。材部の害は温度の低下とともに増し、ことに -50°C から -70°C まで温度をさげると害は著しくす。落葉樹の冬芽は一般に木の組織中もっとも耐凍性が大きく -70°C での凍結に耐えられるものが多いが、材部の害のために -70°C で処理したものは発芽がおくれる。落葉樹とちがって針葉樹の芽は一般に葉より耐凍性が小さい。欧州アカ

第 5 表 -40°C 以下における凍害

樹 種	凍 結 温 度				
	-30°C (1日)	-30°C (2日)	-40°C (6時間)	-50°C (6時間)	-70°C (6時間)
ク ラ ブ リ ン ゴ	B-	B-	B-	B-	B-
	C-	C-	C-	C-	C-
	X-	X-	X+	X++	X##
	P+	P+	P++	P##	P##
バ ラ	B-	B-	B-	B-	B-
	C-	C-	C-	C-	C-
	X-	X-	X+	X++	X##
	P+	P+	P++	P##	P##
ケ ヤ マ ハ ン ノ キ	B-	B-	B-	B-	B-
	C-	C-	C-	C-	C-
	X-	X-	X+	X++	X##
	P+	P+	P++	P##	P##

実験期日：1月20日 B, C, P, X: それぞれ芽, 皮層部, 髓部, 材部をあらわす。

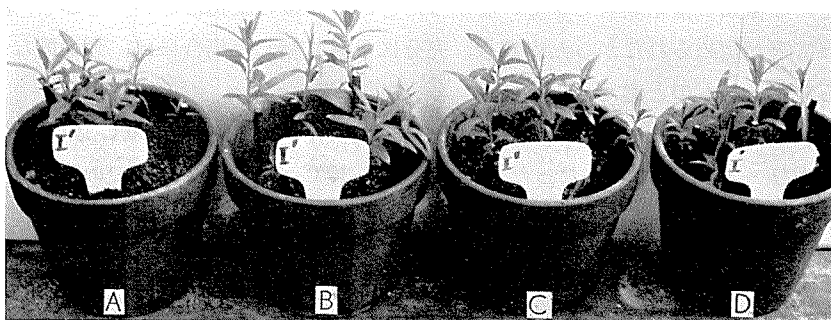
-: 無害, +: わずかに褐変が認められるもの, ++: 中等度の褐変を有するもの

##: 完全に褐変しているもの, 芽の場合の-は正常な発芽を示す。

マツの葉は -30°C から -70°C までの温度範囲内では害されない。しかし、芽が -60°C 以下まで冷却されると、形態的には害が認められないが発芽しない。ドイツトウヒの葉は -70°C までの低温で殆んど害されないが、-55°C 以下の低温で芽の原基が褐変する。トドマツは -40°C 以下で、アカエツマツは -50°C 以下で芽と葉が害される。

7. 液体チッソ処理後の加温条件と凍害との関係

予備凍結後、液体チッソ中に処理する場合、もし細胞内に微結晶が多量にできているならば、液体チッソから取出してゆっくり加温すれば、それらの微結晶が成長するために害が現わ



第 6 図 液体チッソ処理後の加温条件と凍害

実験期日：1月17日

実験材料：ナガバヤナギ

予備凍結：-20°C で 16 時間

挿本期間：温室にて 1 カ月

A, B, C 及び D は液体チッソ処理後、それぞれ -30°, -20°, -10° 及び 0°C の各温度に 1 日間おいたものである。

れるはずである。この事を確めるために、 -20°C と -30°C で予備凍結後液体チッソ中に入れた枝をいろいろな加温条件で加温して比較してみた。 -20°C または -30°C で16時間予備凍結後、液体チッソ中に入れた枝をただちに -70° , -30° , -20° , -10° 及び 0°C の各温度の恒温箱中に移して1日間放置した。その後、 $0^{\circ}\sim-2^{\circ}\text{C}$ の部屋に移してそこにさらに1日間おいた。その結果、どの加温条件のものも後の生育状態に差が認められなかった。 -20°C で予備凍結した場合の結果を第6図に示す。

IV. 考 察

1. 超低温で生物を生存させるのに必要な予備凍結温度

十分に予備凍結させた植物が液体チッソ中に投入後生存できるのは、細胞外凍結が充分に進んでいて生物体内の凍り易い状態の水が充分脱水されているため、本来ならば必ず細胞内凍結を起こさせる程の急冷却を行なっても、細胞内部に凍結がおきないためと考えられる。ここで問題になるのは細胞内に凍りうる水が少しでもあれば致命的な細胞内凍結がおこるか否かである。細胞内の凍り易い水は -10°C では細胞内の含水量の約80%、 -30°C では約90%が凍結するが¹⁵⁾、そのため細胞内は非常に濃縮された状態になっている。その上、こういう状態の細胞を -196°C の液体チッソ中に入れて急速に冷却するので、たとえ細胞内に少量の凍りうる水があっても、細胞に害を与えるほどには結晶は成長できないだろうと考えられる。しかし、液体チッソから取出してゆっくり加温する場合には、冷却中細胞内に出来ると考えられる微結晶が加温中に成長して細胞に害を与えるようになるかもしれない¹⁶⁾。しかし、本実験では液体チッソから取出して1日間 -10°C の部屋におき、さらに $0^{\circ}\sim-2^{\circ}\text{C}$ の部屋に1日間おいているので、もし細胞内に微結晶ができていならば、加温の過程で当然再結晶するはずである。しかし液体チッソから取出して -70° , -30° , -20° 及び -10°C の各温度に1日間おいてから $0^{\circ}\sim-2^{\circ}\text{C}$ の温度に移す実験を行なったが、 -20°C や -30°C で予備凍結した場合には、いずれも害が認められなかった。なお -20°C や -30°C で予備凍結後、液体チッソ中に入れた時、細胞内にどんな種類の微結晶もできていなかったという直接の証拠はない。しかし、こうした処理によって害が認められなかった事から、十分に予備凍結した場合には、致命的な細胞内凍結はおこらなかったものと考えられる。

クワの皮層組織をいろいろな温度で予備凍結した場合の生存率は -20°C 以低から -30°C まで漸次高まり -30°C で最高になった。そして、 -30°C から -70°C までの間には差が認められなかった¹⁾。なお -30°C と -196°C の間で冷却と加温を5回繰返したが生存率には変化が認められなかった¹⁾。朝比奈はカキの鰓の小片をグリセリン処理後 -20°C と -30°C で予備凍結してから液体チッソ中に入れて調べた結果、 -20°C で処理したものは全滅したが、 -30°C で処理のものは殆んど生存している事を明らかにした⁹⁾。また越冬イラガの前蛹やエゾシロチョウの越冬幼虫を 0° , -10° , -20° 及び -30°C の各温度で予備凍結してから液体チッソ中に入れて急冷した場合、 -30°C での予備凍結のみがその後の急冷却にさいして昆虫を生存させるのに役立つ、その他の処理をしたものは1個の生存者も見出せなかった⁴⁾。また Luyet はグリセ

リン処理した牛の精液を -20° , -23° , -27° , -30° , -40° , -45° 及び -50°C であらかじめ凍結してから液体チッソ中に入れた場合、 -20°C で処理のものは殆んど全細胞が死ぬが、 -23°C より生存率はまし、 -27°C で最高に達し、以後 -35°C までの温度範囲では生存率に差が認められないが、 -40°C 以低では生存率はやや低下すると報告している⁸⁾。著者もまたグリセリン処理した人の精液を用いて調べた結果、Luyet とほぼ同様な結果をえた⁷⁾。ただし、生存率や生存率が高まり始める温度は使用する精液によってかなり異なるが、いずれも -30°C 前後の温度で生存率が最高になった。また著者はグルコース溶液に浸したキャベツの葉柄の皮層細胞で調べた結果^{17,18)}、 -20°C での予備凍結では液体チッソ処理後全細胞が死ぬが、約 -30°C で生存率が最高になることを見出した。

以上のように、従来用いた材料に関するかぎり、動植物どの材料についても効果的予備凍結温度は -30°C 前後にある。そしてこの -30°C という温度は細胞外凍結によって細胞内の凍りやすい水が殆んど無くなってしまいう温度と考えられる。しかし、本実験の結果から明らかのように、効果的予備凍結温度は動植物の種類により、また同一樹種でもその時期によって異なり、一般的には耐凍性の大きいものは効果的予備凍結温度が高く、耐凍性の小さいものほど、それが低い傾向が認められる。また高温処理や低温処理によって耐凍性の大きさを変えると、それにつれて効果的予備凍結温度も変動する。これらの事実から、効果的予備凍結温度は従来考えていたように、生物の種類に関係なくあるていど固定的なものであるとはいえない。

ヤナギは耐凍性の変動につれて効果的予備凍結温度が -15°C から -30°C まで変動する。なぜ耐凍性の小さい時には、 -15°C から液体チッソ中に入れて急冷すると枝は死ぬのに、耐凍性の大きい時には同じ処理をしても枝は死なないだろうか。すでに述べたように、本実験は加温速度が非常に小さいので、超低温に急冷した場合におこる害は致命的な細胞内凍結によるものと思われる。しかし、耐凍性の大きい場合には、 -15°C での予備凍結後生存していることから考えて、致命的な細胞内凍結はおこらなかったものと思われる。したがって、耐凍性の大きい枝では、 -15°C での予備凍結によって細胞内には凍りうる水が殆んどなくなっているものと考えざるをえない。しかし、今のところ耐凍性の変動につれて細胞内の水の状態がどのように変るかについて具体的な事は殆んど判っていない。この問題は凍結状態での **hardening** の機構と併せ考えると興味深い。

2. 凍結状態での **hardening**

hardening の温度条件は木の発育の **stage** によって異なるが、一般的には植物が害を受けない限度で温度が低いほど効果的である¹⁹⁾。冬に植物を数日間 0°C の温度におくと一度高まった植物の耐凍性が低下する。そのため高い耐凍性を長く保持するためには -5°C 以低の温度に植物を保つことが必要である²⁰⁾。しかし、ヤナギ、ドロノキ、シラカバのような耐凍性の高い木では、 -30°C での凍結に耐えられるようになった枝はそれ以低のどの温度にも耐えられるので、それらの枝の耐凍性の変動を従来は測ることが出来なかった。しかし、効果的な予備凍結温度を測ることによって耐凍性の大きさやその変動をある程度知ることが出来るようになった。この方法で調べた結果、 -5°C よりも -10°C で数日間凍結状態においた方が耐凍性の高

まりかたが著しかった。なお -10°C で凍結状態におく時間の長さ と **hardening** 効果との関係についてはまだ調べていない。

Tumanov は植物を十分に **hardening** させるには **hardening** の2つの段階を経させることが必要で、第一段階では 0°C に近いプラスの温度で、第二段階では 0°C 以下の温度で処理するのがもっとも効果的であると述べている¹⁰⁾。彼は -5° , -10° , -15° , -20° 以下 -60°C までの各温度に1~4日間宛順次にさらして 0°C 以下での **hardening** を行なっている。なお、こうした処理を受けたヤナギ、シラカバ、マツ、グスベリの枝は液体チソ処理後害を受けなかった。しかし、著者の実験では -20°C での凍結にしか耐えられない3月上旬の耐凍性の比較的小さいヤナギの枝を -10°C で数日間 **hardening** すると、その枝は液体チソ処理に耐えられるようになった。この事実から考えて耐凍性を最大に高めるために、Tumanov 等^{10,11,12)} が行なっているような非常に低い温度での長時間にわたる面倒な **hardening** が不可欠とは思われない。数日間 -10°C で凍結状態におく事によって耐凍性を著しく高められるが、この機構はまだよく判っていない。とにかく耐凍性をある限度以上に高めるためには、ある期間植物を凍結状態におくことが必要である。

3. -40°C 以下における凍害

細胞内に含まれている凍りやすい水は少なくとも約 -30°C の温度でなくなるものと考えられている^{15,21,22)}。したがって、生物の温度を -30°C 以下まで下げてもはや細胞はそれ以上殆んど脱水されないし、また致命的な細胞内凍結もおこらないと考えられる。そのため著者は -30°C での凍結に耐えうる生物は時間が長くない限り、それ以下のどんな低温にも耐えられるものと考えていた¹³⁾。実際に、ヤナギ、ドロノキ、ポプラ、シラカバ等のような耐凍性の大きい枝では、 -30°C での凍結に耐えられるようになったものは、 -40°C にも -70°C にも耐えられる。このことは多くの落葉樹の冬芽や木の皮層細胞等についてもいえる。ただし、細胞を溶液に浸して凍結する場合には、 -30°C までの凍結に耐えるが、 -40°C 以下では耐え得ない場合がある^{17,18)}。これはある温度以下になると、外圍媒液が凍結のため濃縮されて細胞に害を及ぼすためと考えられる。植物細胞ではグリセリン、エチレングライコール、ジメチール、サルホ、オキサイド等の溶液中で凍結した場合には、 -30°C 以上では全細胞が生存しているが、 -40°C 以下では例外なく全細胞が死ぬ^{17,23)}。しかし、媒液が濃縮されても細胞に害を与えない場合、たとえば植物細胞をグルコースやサッカロース溶液に浸して凍結する場合には、 -30°C 以下 -70°C までの温度範囲内では生存率は殆んど低下しない¹⁷⁾。

バラ、クラブリング、ヤマハンノキ等では -30°C での凍結には殆んど害なく耐えるがそれより温度が低下すると材部に害が現われる。これらの樹種では -70°C まで冷却しても、また -30°C で予備凍結後液体チソ中に入れた場合でも、発芽するし皮層部は殆んど害を受けない。なお害を受けるのはおもに材部で、この褐変は少なくとも -70°C まで温度の低下とともに増加する。なお材部の褐変は髄線柔細胞、形成層に内接した初生材部の細胞、髄周辺細胞及び導管周辺細胞の死のためにおこる²⁴⁾。

Parker は植物の耐凍性の大きさは樹種によって異なり、 -5°C から -90°C までの範囲に

およんでいて、 -30°C での凍結に耐える植物はそれ以下のどんな低温にも耐えられるという著者の意見に反論している¹⁹⁾。本論文の結果もある樹種では -40°C 以低少なくとも -70°C までは、温度の低下とともに害が増大するので、 -40°C 以低でも凍害がおこることを認めざるをえない。しかし、この事実をどう解釈すべきだろうか。 -30°C 以低 -70°C までの温度範囲内ではまだ細胞内に凍りうる水が残っているので、細胞内凍結がおこるという Tumanov の意見についてはすでに反論した。細胞内の凍りうる水は -30°C 前後の温度で殆んどなくなるという多くの実験結果^{15,21,22)}を認めれば、脱水量の増加のために細胞外凍結がおきるとは考えがたい。あるいは細胞から脱水される水の量は変らないが、温度の低下とともに何らかの mechanical stress がますために害が現われるとも考えられるが、その具体的な内容は今のところ判らない。

摘 要

1. 液体窒素中で生存させる効果的な予備凍結温度は植物の樹種により、同一樹種では季節によって異なり、その値は -15°C から -30°C までの温度範囲内にある。一般に耐凍性の大きいものほど効果的な予備凍結温度は高い。また効果的予備凍結温度は hardening と dehardening によって変えられる。

2. 効果的予備凍結温度は耐凍性の大きさによって変わるので、効果的予備凍結温度をはかることによって耐凍性の大きさやその変動を知ることが出来る。この方法で調べた結果、冬の耐凍性の大きい木では -10°C で hardening した場合にもっとも耐凍性をました。

3. ヤナギ、ポプラ、シラカバ等では -30°C の凍結に耐えられる枝はそれ以下の低温にも耐えられるが、バラ、リンゴ、グイマツ等では -30°C での2日間の凍結に殆んど害なく耐えられるが、 -40°C 以低の温度では害が現われ始め、少なくとも -70°C までは温度の低下するにつれて害はます。トドマツア、カエヅマツ等の針葉樹でも同様な傾向が認められる。

文 献

- 1) 酒井 昭 1956 超低温における植物組織の生存. 低温科学, 生物篇, **14**, 17-23.
- 2) 酒井 昭 1958 超低温における植物組織の生存 II. 低温科学, 生物篇, **16**, 41-53.
- 3) Sakai, A. 1960 Survival of the twig of woody plants at -196°C . Nature, **185**, 393-394.
- 4) 朝比奈英三 1958 耐凍性昆虫を超低温で凍結生存させる一つの方法. 低温科学, 生物篇, **16**, 55-63.
- 5) Asahina, E. and Aoki, K. 1958 Survival of intact insects immersed in liquid oxygen without any antifreeze agent. Nature, **182**, 327-328.
- 6) 朝比奈英三 1958 超低温で生存する動物細胞の凍りかたについて. 低温科学, 生物篇, **16**, 65-75.
- 7) 酒井 昭 未発表.
- 8) Luyet, B. J. 1955 A critical temperature range apparently characterized by sensitivity of Bull semen to high freezing velocity., Biodynamika, **7**, 281-292.
- 9) 酒井 昭 1962 液体ヘリウム中での木の生存. 低温科学, 生物篇, **20**, 121-122.
- 10) Туманов, И. И и Красавцев, О. А. 1959 Закаливание северных древесных растений отрицательными температурами. Физиология Растений, **6**, 654-667.
- 11) Красавцев, О. А. 1961 Закаливание древесных растений к сверхнизким температурам. Известия Академии Наук, серия биология, No. **2**, 228-232.
- 12) Туманов, И. И., Красавцев, О. А. и Хвалин, Н. Н. 1959 Повышение морозостойкости

- березы и черной омородины до -253° путем закаливания. Доклады Академии Наук, **127**, 1301-1303.
- 13) Parker, J. 1960 Survival of woody plants at extremely low temperature. *Nature*, **187**, 1133-1134.
- 14) Parker, J. 1959 Seasonal variations in Sugars of conifers with some observations on cold resistance. *Forest, Sci.*, **5**, 56-63.
- 15) Shinozaki, J. 1962 Ammount of ice formed in the prepupa of Slug Moth and its periodicity. *Contrib. Inst. Low Temp. Sci., Ser. B*, No. **12**, 1-52.
- 16) Luyet, B. J. 1957 On the growth of ice phase in aqueous colloids. *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, **147**, 434-451.
- 17) 酒井 昭 1961 植物細胞の凍害の機構 I. — 凍害に対する媒液の影響 (1) — 低温科学, 生物篇, **19**, 1-16.
- 18) Sakai, A. 1962 Mechanism of the protective action of sugars against frost injury in plant cells. *Nature*, **193**, 89-90.
- 19) 酒井 昭 1956 植物における耐凍性増大と外囲温度. 低温科学, 生物篇, **14**, 7-15.
- 20) 酒井 昭 1956 耐凍性の持続及びそれに及ぼす温度の影響 (1). 低温科学, 生物篇, **14**, 1-6.
- 21) Scholander, P. F., Flagg, W., Hock, R. J. and Irving, L. 1953 Studies on the physiology of frozen plants and animals in arctic. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **42**, Supp. 1, 1-56.
- 22) Tranquillini, W. und Holzer, K. 1958 Über das Gefrieren und Auftauen von Coniferennadeln. *Berich. Deutsch. Bot. Gesellschaft*, **71**, 143-156.
- 23) 酒井 昭 未発表.
- 24) 酒井 昭 1955 木本類の生死の判定法. 低温科学, 生物篇, **13**, 43-50.

Summary

In previous papers it was shown that after a sufficient extracellular freezing, the twigs of some woody plants could survive in liquid nitrogen or even in liquid helium, and that the effective temperature for such a pre-freezing lies around -30°C in various plants. However, in order to keep a twig of willow alive in liquid nitrogen a pre-freezing at temperatures below -15°C was enough in midwinter, while in early spring, a pre-freezing temperature below -30°C was required. This fact suggests that the effective pre-freezing temperature may be variable according to the grade of frost-hardiness of plants employed. To obtain more informations about this problem, some experiments were made.

Twigs (10 cm long, about 0.5 cm in diameter) were prefrozen within the temperature range from -5°C to -70°C , and were then immersed directly in liquid nitrogen. The cooling rate of the twig immersed into liquid nitrogen after pre-freezing at -30°C was about $22^{\circ}\text{C}/\text{sec}$. After being kept there for 30 minutes, they were transferred into air at -10°C for 4 hours and then at about 0°C for 16 hours. After thawing, twigs were placed in water under room temperature or were planted in moist sand in a green house to test the capacity of their development.

1. In midwinter the effective pre-freezing temperatures in various plants were as follows: below -15°C in willow, popular and white birch, below -20°C in Italian popular and below -30°C in creeping pine, alpine rose, crab-apple and black elder. In the case of rose, apple and black elder, buds put forth normally, but the tissues of their xylem and pith were injured by deep frost. In twigs of willow and popular, the effective pre-freezing temperature ranged from -15°C and to -30°C according to the degree of their frost-hardiness: in

general, the greater their frost-hardiness, the higher the effective pre-freezing temperature.

2. The effective pre-freezing temperature can be used as a reliable index of frost hardiness of the hardy plants, such as willow, poplar, white birch etc. In these plants the grade of their frost-hardiness can not be determined by usual method, because their twigs which can withstand freezing at -30°C are not injured even when exposed to an extremely low temperature. The most effective temperature for the frost-hardening of willow's twig in winter was investigated by keeping the twigs for 5 days at 0° , -5° , -10° and -15° respectively. The result showed that -10°C was most effective, and the effectiveness decreased with rise in temperature of frost-hardening.

3. In willow and poplar, as mentioned above, their twigs are not injured even when exposed to an extremely low temperature, provided they can withstand freezing at -30°C . In the twigs of alpine rose, crab-apple, black elder etc., their xylem and pith can survive freezing at -30°C without any damage at least for 2 days, but cannot below -40°C , though their buds survive and put forth after thawing from a freezing at -70°C as well as -30°C . Moreover, the frost damage in xylem and pith increased with decreasing temperature to -70°C . The mechanism of frost injury below -40°C in these tissues is not yet clear.

図 版 説 明

図版 I 0°, -5° 及び -10°C の各温度で 5 日間 hardening した枝を, 各温度で 4 時間予備凍結後, 液体チッソ中で処理したナガバヤナギを室温にて 1 カ月間水挿したばあいの生育状態を示す。

- 1: 0°C で hardening したばあい
- 2: -5°C で hardening したばあい
- 3: -10°C で hardening したばあい
 - A: -10°C で 4 時間予備凍結
 - B: -15°C で 4 時間予備凍結
 - C: -20°C で 4 時間予備凍結
 - D: -30°C で 4 時間予備凍結

