



Title	キクイモ塊茎の凍結について
Author(s)	照本, 勲; TERUMOTO, Isao
Citation	低温科学. 生物篇, 23, 21-26
Issue Date	1965-12-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17691
Type	departmental bulletin paper
File Information	23_p21-26.pdf



キクイモ塊茎の凍結について*

照 本 勲

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和40年7月受理)

I. 緒 言

北米原産の多年生草本であるキクイモは、札幌付近では現在野生状態を呈して、路傍等に生育している。この塊茎にはイヌリンが含まれるが、温度処理によって塊茎の組織の二三の生理的性質が変り、これを凍結させた場合に組織の凍結様式も影響されることがわかったので報告する。なお、キクイモの凍結については、今までに若い塊茎を用いて凍結過程を観察した結果が報告されているにすぎない^{1,2)}。

II. 材料と方法

この実験に使用したキクイモ *Helianthus tuberosus* L. 塊茎は、本研究所裏庭付近に野生しているものを採集し、実験は10月から3月にわたっておこなった。温度処理は塊茎を2群にわけ、1群を25°Cに他を0°C恒温箱中にポリエチレンでつつみ暗黒中に保存した。生死の判定は、1:10,000の濃度の中性赤水溶液中で組織切片を生体染色し、その後0.5M平衡塩溶液(NaCl等張)に切片をうつし原形質分離の有無できめた。固定にはWolman and Beharの低温固定を用いた³⁾。還元糖の検出は前回⁴⁾と同じFehling's solutionテストを用いた。イヌリンの検出には、組織を小さく切り、70%エタノール中に2週間保存し、その後徒手切片となし、顕微鏡観察を行なった。イヌリンは、柔細胞にイヌリンの球状結晶として析出する(図版I-1)。凍結させる試料の温度の測定は、前報^{5,6)}と同様に熱電対(0.2mmの太さの銅、コンスタンタン線で作成)の先端を、試料の中心部にくるように挿しこみ、光電管を使ってミリアンメーターに自記した。冷却槽の温度は-10、-20、-30°Cを使用し、植氷は行なわず、自発的に過冷却の破れるのを待った。冷却速度は0°Cにおいて0.6°C/分、1.3°C/分、2.5°C/分の3種を採用した。

III. 結 果

1. 形態的、生理的变化

キクイモ塊茎の柔細胞は、断面120 μ ×80 μ 内外の細胞からなり、細胞間隙は明瞭でない。中性赤水溶液で生体染色すると、30分ほどでよく液胞内に中性赤が透入するが、一晚染色を続

* 北海道大学低温科学研究所業績 第730号

けると中性赤による滴状分離像⁷⁾が見られた。低温処理 (0°C) した場合の原形質層は高温処理 (25°C) のものにくらべ厚く、中性赤で染色される顆粒は、高温処理されたものに多く認められる。蔗糖 1 M 溶液で原形質分離すると、低温処理したものでは凸型分離を、高温処理したものは凹型分離をした。低温及び高温処理の組織の生理的变化は第 1 表に示した。高温処理のもので明瞭に観察できたイヌリンの結晶が低温処理のもので消失し、逆に還元糖が証明されてくる。生理的平衡塩溶液による原形質分離限界濃度は、低温処理により増張現象がおり、低温処理細胞の滲透濃度は、高温処理のもの 0.27 M に対して 0.33 M と高くなっている。

第 1 表 温度処理によるキクイモ塊茎の生理的性質の変化

生理的性質	処理温度 (2週間)	
	0°C	25°C
還元糖	+	-
イヌリン	-	+
含水量	88.3%	84.0%
原形質分離限界濃度 (NaCl 等張)	0.33 M	0.27 M

2. 耐凍性

正常な細胞は、中性赤水溶液による生体染色で容易に液胞が染色される。凍結によって死んだ柔細胞は、融解後中性赤水溶液で染色されず、原形質が凝固してしまっている。第 2 表からわかるように、-10°C, 24 時間の凍結で、高温処理されたものでは、ほとんど融解後細胞が死んでしまうが、しかし組織のところどころに中性赤で染色される細胞が残っている。凍結後の塊茎の横断面をみると、例えば -10°C, 24 時間の凍結では、低温処理したものは、融解後皮層部と柔細胞部の境界部分と、柔細胞部の中心から放射状に数本の組織が透明になっており、この部分に死細胞が多い。高温処理のものでは皮層部も柔細胞部も共に透明に変化していることを認めることができる。-20°C, 24 時間の凍結では、両処理塊茎とも生存細胞はなかった。

第 2 表 キクイモ塊茎の耐凍性 (各 24 時間凍結)

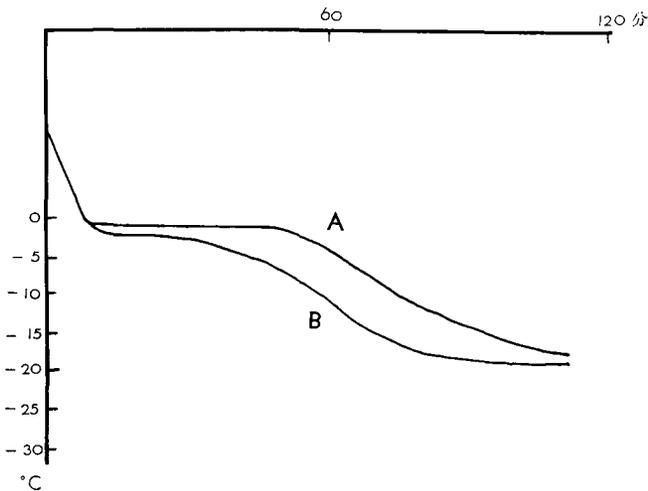
処理温度 (°C)	処理日数	凍結温度 (°C)	細胞の生存率 (%)
0	13	-10	70~100
25	19	-10	0~30

3. 凍結曲線

凍結曲線の測定には、10 g 前後の塊茎そのままを使うか、又は 1×1×3 cm の角柱状の組織小片を用いた。

-10°C: 冷却槽 -10°C の場合の凍結曲線では、高温処理のものは必ず 2~3°C 過冷却してから凍結が始まったが、低温処理したものでは過冷却せずに凍結が始まった。又、低温処理した塊茎の方が、高温処理したものにくらべて早く凍結が完了した。

-20°C: 冷却槽 -20°C の場合の凍結曲線では、高温処理した塊茎は凍結が完了するのに低温処理した塊茎の場合より約 30 分長くかかった。すなわち低温処理されたものでは、いわゆる第 2 氷点¹⁾の部分が非常に短かく、徐々に温度が低下してくることがわかる。両者間の第 2 氷点部の温度差は約 1~1.5°C である(第 1 図)。角柱状の組織小片を用いた場合、高温処理の試料は第 2 氷点で、なめらかな曲線にならず不規則に上下に振れているのが認められる。低温処理の場合には不規則な振れは全く見られない。



第 1 図 2 週間温度処理されたキクイモ塊茎の凍結曲線
(冷却槽温度 -20°C)
A...25°C (8.3 g) B...0°C (7.5 g)

-30°C: -30°C の場合の凍結曲線は、塊茎が凍結しおわるまでに高温処理のものの方が低温処理のものにくらべて時間がよけいにかかることが特徴である。

以上の凍結曲線の結果を比較してみると、冷却温度が -10°C では高温処理された試料は、低温処理されたものにくらべ過冷却しやすく、又何れの冷却温度でも第 2 氷点が高く、フラッシュ型凍結を表わすと思われる曲線の上下の振れがあり、試料の凍結完了までの時間がよけいにかかることが認められる。これはおそらく双方の試料が、その温度処理のために異なる凍結様式を現わしたものと考えられる。

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。第 3 表から明らかのように、凍結温度が -20°C でも -30°C でも共に低温処理した塊茎は常に細胞外凍結をしている低温固定像が認められ、原形質が細胞壁より離れて収縮した、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と考えられる(図版 I-2)。高温処理した場合、低温固定像は細胞内凍結をあらわし、原形質も核も共に凝固破壊した像が認められる(図版 I-3)。

第3表 キクイモ塊茎組織の低温固定像

処理温度 (°C)	処理日数	凍結温度 (°C)	凍結時間	固定像からの 凍結様式
0	7	-20	2	細胞外凍結
0	14	-20	2	細胞外凍結
25	14	-20	2	細胞内凍結
0	15	-30	1.5	細胞外凍結
25	9	-30	1.5	細胞内凍結

IV. 考 察

キクイモの塊茎は貯蔵物質として多糖類のイヌリンを含んでいる。このイヌリンは27~30の果糖からなっているといわれる。イヌリンはキクイモのすべての器官に分布しているものでなく、葉では澱粉、蔗糖、葉柄では蔗糖、少糖類、茎で少糖類だけが認められ、イヌリンは塊茎の中だけにしか証明されていない⁸⁾。馬鈴薯塊茎が低温貯蔵されると細胞中の澱粉が蔗糖に変わり⁹⁾、滲透濃度も増加するが¹⁰⁾、この場合と同じように、キクイモ塊茎の温度処理が耐凍性にいかに影響するかは非常に興味あるところである。キクイモ塊茎には貯蔵中に蔗糖とイヌリンの中間に位する少糖類が連続して共存するようになる¹¹⁾。本実験結果でも、低温処理でイヌリンが消失し、還元糖が増加していることが認められた。細胞内のイヌリンの分解により、滲透的作用物質も増加して滲透価が高まり、2週間処理で約0.06 Mの溶質の増加が原形質分離限界濃度の測定から明らかである。

低温処理をうけた状態、すなわち耐凍性が増加している場合と、高温処理をうけた耐凍性のない場合とは、同じ植物の同じ組織であってもその凍結様式は全く異なっている¹²⁾。耐凍性の失なわれているときは細胞内部が凍りやすく、耐凍性の高い状態では細胞外凍結をおこし、細胞は氷に接していながら脱水されているだけで、細胞内部に氷は侵入しない。つまり細胞内部は凍りにくくなっている。このような耐凍性の高い細胞に細胞外凍結がおこり、脱水されると細胞内の滲透濃度はますます高くなる。従って細胞液の氷点がさらに下るので内部は凍りにくくなる。融解されると、凍結中細胞外に奪われた水を吸収してもとに戻る。キクイモ塊茎で13日間低温処理されたものでは、-10°Cで24時間凍結融解後70~100%の細胞が生きていた。又、凍結に際し細胞内凍結をおこしたものは、融解されると細胞質は凝固した塊となって細胞は完全に死んでしまう。キクイモ塊茎で19日間高温処理されたものでは、-10°Cで24時間の凍結で融解後生きのこっている細胞は30%にすぎなかった。

植物からきりとった組織小片の凍結曲線に氷点が二重になって現われる場合、一過性の第1氷点は温度計の感温部に近い破壊されている組織の凍結に由来するものであり、持続性の第2氷点は小片内部の正常細胞群の凍結の現われである^{5,13)}。キクイモ塊茎の凍結曲線では第1氷点は不明瞭で、直ちに第2氷点があらわれた。氷の生成速度は等しい冷却条件の下では、細胞の凍結様式に左右されるもので、一般に細胞外凍結はわりあい高い温度で始まり、氷の生成

速度が遅いのに対し、細胞内凍結は細胞外凍結にくらべて低い温度になってから、すなわち過冷却の程度がすすんでから起るものであり、氷の生成速度は早い。キクイモの場合、冷却槽の温度が -10°C の場合にこのことが認められた。耐凍性のある状態と耐凍性の失なわれた状態とでは細胞の凍結様式は全く異なっているので、当然その差は凍結曲線の上に現われてくる。2週間低温処理されたものの塊茎の凍結曲線は、第1図のとおり凍結が始まってからの温度の下り方には著しいおくれはみとめられないので、第2氷点は15分位で経過してしまう。高温処理されたものでは、凍結と同時に、温度の降下はほとんど停止し、その後40分位はその温度を保ちつづける。すなわち、第2氷点部は明瞭に現われる。若い塊茎ではフラッシ型凍結は起っても単に散発的にしかおこらないことがみられているが¹⁾、本実験では角柱状小片を試料に用いた場合、高温処理したものの第2氷点部には曲線の上下の振れが認められ、これはフラッシ型凍結を表わすものと思われる²⁾。

低温固定は、凍結曲線測定後の試料について行なったが、冷却温度が -20°C 、 -30°C にかかわらず、低温処理された塊茎ではほとんどすべての細胞で細胞外凍結像を、高温処理された塊茎では細胞内凍結像を認めた。

摘 要

この実験は、多糖類イヌリンを含むキクイモ塊茎の温度処理効果をしらべたもので、低温処理で塊茎は耐凍性を獲得し、高温処理された塊茎では耐凍性を失なう。

耐凍性が高い状態での塊茎は、イヌリンを消失し、還元糖が増加し、滲透濃度は高まる。これらの塊茎は、凍結曲線の測定と低温固定像の観察から、凍結にさいしては細胞外凍結が主となり、塊茎は -10°C 、24時間の凍結に耐えるようになる。耐凍性が弱いときに塊茎を凍らせると、ほとんどすべて細胞内凍結がおこる。

終りに、御校閲下さった朝比奈教授に深く感謝する。

文 献

- 1) 青木 廉 1950 生物の凍結過程の分析 I. 植物組織の凍結曲線の型と凍結様式の関係. 低温科学, **3**, 219-227.
- 2) 朝比奈英三 1950 生物の凍結過程の分析 II. 植物柔組織の凍結過程の顕微鏡的観察. 低温科学, **3**, 229-246.
- 3) 照本 勲 1958 植物細胞の低温固定像について. 低温科学, 生物篇, **16**, 1-15.
- 4) 照本 勲 1957 アカビートの耐凍性とフォスフォリラーゼ. 低温科学, 生物篇, **15**, 31-38.
- 5) 照本 勲 1953 生物の凍結過程の分析 XI. 植物組織の第一氷点の意義について. 低温科学, **10**, 93-102.
- 6) 照本 勲 1956 植物組織の凍結曲線の氷点について (予報). 低温科学, 生物篇, **14**, 25-28.
- 7) 堀江格郎 1950 原形質分離及び生体染色による馬鈴薯塊茎細胞の生理的性質に関する研究. 植物学雑誌, **63**, 183-188.
- 8) Porter, H. K. 1962 Synthesis of polysaccharides of higher plants. *Ann. Rev. Plant physiol.*, **13**, 303-328.
- 9) Arreguin-Lozano, B. and Bonner, J. 1949 Experiments on sucrose formation by potato tubers

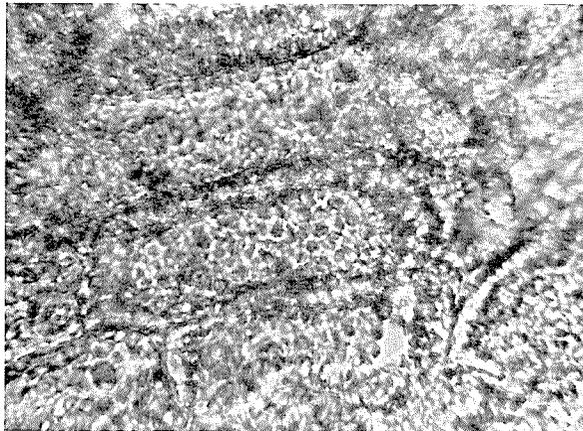
as influenced by temperature. *Plant physiol.*, **24**, 720-738.

- 10) 照本 勲 1951 貯蔵馬鈴薯塊茎の過冷却について. 低温科学, **8**, 177-178.
- 11) Jofford, T. G. and Edelman, J. 1961 Changes in content and composition of the fructose polymers in tubers of *Helianthus tuberosus* L. during growth of daughter plants. *J. Exptl. Botany*, **12**, 177-187.
- 12) 青木 廉・朝比奈英三・照本 勲 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**, 69-79.
- 13) 青木 廉 1949 植物組織の凍結曲線. 生物学の進歩, **4**, 145-176.

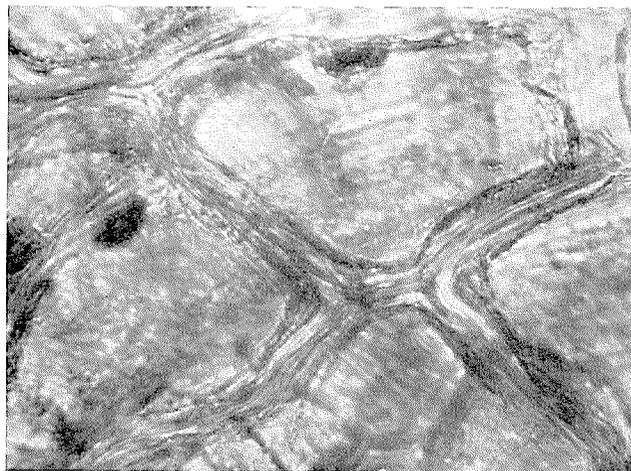
Summary

The effect of the temperature treatment on the tuber of the Jerusalem artichoke was examined. The tuber apparently became frost-hardy by a low temperature treatment at 0°C. It could be dehardened, however, by a high temperature treatment at 25°C. The osmotic concentration of the hardy artichoke tuber increased with the disappearance of inulin and accumulation of reducing sugar in tissue cells. Freezing curve analysis of tuber tissue and the microscopic observation of tuber cells, fixed with a cold fixative, revealed that the freezing process of the hardy artichoke tuber is the extracellular freezing type. The cells in the hardy tuber could tolerate extracellular freezing at -10°C at least for 24 hours without death. On the other hand, the freezing process of dehardened artichoke tuber was found to be the intracellular freezing type, and most of cells in its tissue were killed by a freezing at -10°C for 24 hours.

1. 25°C, 2週間温度処理塊茎にみられるイヌリン球状結晶をもった細胞。 ×440



2. 0°C, 2週間温度処理塊茎を-10°C, 2時間凍結後低温固定。細胞外凍結。 ×440



3. 25°C, 2週間温度処理塊茎を-10°C, 2時間凍結後低温固定。細胞内凍結。 ×440

