



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	超低温における植物組織の生存 V : 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, 25, 1-7
Issue Date	1967-12-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17715">https://hdl.handle.net/2115/17715</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	25_p1-7.pdf



## 超低温における植物組織の生存 V\*

耐凍性の大きさと効果的予備凍結温度との関係 2

酒 井 昭

(低温科学研究所 植物凍害科学部門)

(昭和42年9月受理)

### I. 緒 言

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<sup>1-4)</sup>を報告した。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うる水を十分に除いておけば、致命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考えにもとづいている。

前報<sup>5,6)</sup>において、液体窒素中で生存させうる効果的予備凍結温度は植物の種類により、同一種類では季節によってことなること、および用いた材料では、その値は $-15^{\circ}\text{C}$ から $-30^{\circ}\text{C}$ までの温度範囲内にあることを明らかにした。一般に耐凍性のたかいものほど効果的予備凍結温度はたかいし、また、効果的予備凍結温度は hardening や dehardening によってかなりかわる。従来の著者の実験では、使用する材料が主として耐凍性のたかい落葉樹種に限られていたので、本論文においては、従来使用していなかった耐凍性のたかい多くの針葉樹を用いて、耐凍性の大きさと効果的予備凍結温度との関係について詳細に検討を加えてみた。さらに、予備凍結後液体窒素処理に耐えるために必要な植物の耐凍度、液体窒素処理後の加温条件、凍結状態での温度上昇にともなう水の細胞内への再吸収の速さ等について一連の実験を行なった。

本実験は1965年12月から1967年2月までの間に行なったものである。

### II. 材料と方法

実験材料としてつぎの樹種を用いた。ヲノエヤナギ (*Salix sachalinensis* Fr. Schm.), ポプラ (*Populus nigra* L. var. *italica* Muenchh.), シラカバ (*Betula tauschii* Koidz.), マカンバ (*Betula Maximowicz.* Regel), カラマツ (*Larix leptolepis* Murray), アカエゾマツ (*Picea glehni* Mast.), トドマツ (*Abies sachalinensis* Mast.), ハイマツ (*Pinus pumira* Regel), オウシュウアカマツ (*Pinus sylvestris* L.), オウシュウクロマツ (*Pinus nigra* L.), ストローブマツ (*Pinus strobus* L.), バンクシヤマツ (*Pinus Banksiana* Lamb.), チョウセンゴヨウマツ (*Pinus Koraiensis* Sied. et Zucc.), ニオイヒバ (*Thuja occidentalis* L.)

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第844号

実験材料は北大構内、林業試験場北海道支場、および道立林業試験場で植栽中のものを使用した。なおその年に伸長した枝の先端部のみを実験材料として使用した。予備凍結させるばあいには、5~10 cm の長さいきり、枝を糸でしばり、乾燥を防ぐために、ポリエチレンの袋に入れて  $-5^{\circ}\text{C}$  の部屋で凍結させた。 $-5^{\circ}\text{C}$  で凍結後、30 分毎に  $5\sim 10^{\circ}\text{C}$  ずつ低い恒温箱に移して所定温度まで冷却し、そこに少なくとも 6 時間以上おいた。なお、液体窒素中に入れるばあいには、ポリエチレンの袋を取去っておもりをつけて枝を液体窒素中に入れた。そこに 10 分間入れておいてから、 $-30^{\circ}\text{C}$  の部屋に取出し 2 時間おいたのち、 $0^{\circ}\text{C}$  の部屋でとかした。 $-30^{\circ}\text{C}$  以低、 $-120^{\circ}\text{C}$  まで冷却するばあいには、 $-120^{\circ}\text{C}$  まで冷却可能なディープフリーザーを用いた。

被害の判定は 2 カ月間室内で水挿してから芽の伸長状態、各組織の褐変度から判定した。耐凍性の大きさは害なく耐えうる最低温度で、効果的予備凍結温度は液体窒素処理後害のない最高予備凍結温度であらわした。

### III. 結 果

#### 1. 液体窒素処理に耐えるために必要な植物の耐凍度

ことなつた耐凍度を有する木の枝を用いて、このことがたしかめられた。第 1 表に示すように、マカンバの枝は  $-25^{\circ}\text{C}$  の凍結に耐えるが、 $-30^{\circ}\text{C}$  で凍結すると、芽は正常であるが、芽の基部と材部が害される。 $-25^{\circ}\text{C}$  の凍結にしか耐えないマカンバの枝はどんな温度で予備凍結しても液体窒素処理に耐えなかった。耐凍度がより高いトドマツ ( $-40^{\circ}\text{C}$ )、アカエゾマツ ( $-45^{\circ}\text{C}$ ) およびドイツウヒ ( $-45^{\circ}\text{C}$ ) を用いて同様な実験を行なつた。しかしマカンバのばあいと同様に、どの温度で予備凍結しても、これらの枝は液体窒素処理に耐えなかった。 $-50\sim$

第 1 表 マカンバの耐凍度と効果的予備凍結温度

	温 度 ( $^{\circ}\text{C}$ )							
	-15	-20	-25	-30	-40	-50	-60	-70
凍 結 温 度*	○	○	○	△	●	●	●	●
予 備 凍 結 温 度**	●	●	●	●	●	●	●	●

\* 耐凍度をきめるための凍結温度

\*\* 液体窒素中に入れるまえの予備凍結温度

○: 正 常    △: 被害が認められるもの    ●: 死

$-70^{\circ}\text{C}$  までの温度にしか耐えられない樹種を見出すことができなかつたので、ストロブマツについて同様のことを調べた。ストロブマツは  $-70^{\circ}\text{C}$  までの凍結にも、 $-100^{\circ}\text{C}$  や  $-120^{\circ}\text{C}$  での凍結にも耐え、さらにこの枝を各温度で予備凍結後、液体窒素中に入れたところ、 $-70^{\circ}\text{C}$  以低の温度で予備凍結したものはいずれも正常であつた。 $-20^{\circ}\text{C}$  以高の温度で予備凍結したものは処理後まもなく褐変したが、 $-30\sim -50^{\circ}\text{C}$  の温度で予備凍結したものは処理後 10~20 日間は正常であつたが、次第に葉が褐変した。第 2 表にその結果を示す。さらにニオイヒバについて同様な実験を行なつた (第 3 表)。ニオイヒバもストロブマツと同様、すくなく

第 2 表 ストローブマツの耐凍度と効果的予備凍結温度

	温 度 (°C)									
	-15	-20	-30	-40	-50	-60	-70	-90	-100	-120
凍 結 温 度*	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
予 備 凍 結 温 度**	●	●	●	●	●	△	○	○	○	○

\* 耐凍度をきめるための凍結温度

\*\* 液体窒素中に入れるまえの予備凍結温度

○：正 常    △：被害が認められるもの    ●：死

第 3 表 ニオイヒバの耐凍度と効果的予備凍結温度

	温 度 (°C)									
	-15	-20	-30	-40	-50	-60	-70	-90	-100	-120
凍 結 温 度*	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
予 備 凍 結 温 度**	●	●	△	△	○	○	○	○	○	○

\* 耐凍度をきめるための温度

\*\* 液体窒素中に入れるまえの予備凍結温度

○：正 常    △：被害が認められるもの    ●：死

第 4 表 効果的予備凍結温度と耐凍度との関係

樹 種	予 備 凍 結 温 度 (°C)										耐 凍 度 (°C)
	-10	-15	-20	-30	-40	-50	-60	-70	-90	-120	
マ カ ン バ			●	●	●	●	●	●			-25
カ ラ マ ツ			●	●	●	●	●	●			-30
ト ド マ ツ			●	●	●	●	●	●			-40
ア カ エ ゾ マ ツ			●	●	●	●	●	●			-45
ド イ ツ ト ウ ヒ			●	●	●	●	●	●			-40
ス ト ロ ー プ マ ツ		●	●	●	●	●	△	○	○	○	-70 以低*
欧 州 ア カ マ ツ								○			-70 以低**
欧 州 ク ロ マ ツ								○			-70 以低**
バ ン ク シ ア マ ツ								○			-70 以低**
朝 鮮 ゴ ヨ ウ マ ツ		●	●	●	●	△	○	○	○	○	-70 以低**
ニ オ イ ヒ バ		●	●	△	△	○	○	○	○	○	-70 以低*
ハ イ マ ツ		●	●	△	△	○	○	○	○	○	-70 以低*
シ ラ カ バ (12月7日)		●	●	△	△	○	○	○	○	○	-70 以低*
シ ラ カ バ	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-70 以低*
ヲ ノ エ ヤ ナ ギ	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-70 以低*

12月下旬から1月中旬に採集した枝で実験を行なった。

○：正 常    △：被害を受けたもの    ●：枯 死

加温条件： いずれも液体窒素処理後、2時間 -30°C の部屋においてから 0°C の部屋に取り出した耐凍度は害なく耐える最低温度であらわした

\* -120°C の凍結にも耐えたことを示す

\*\* -120°C での凍結を試みなかった

とも  $-120^{\circ}\text{C}$  までの凍結に耐え、 $-50^{\circ}\text{C}$  以下の温度で予備凍結したものは液体窒素処理後正常であった。 $-15^{\circ}\text{C}$  や  $-20^{\circ}\text{C}$  で処理したものは融解後 1~2 日で葉が変色したが、 $-30^{\circ}\text{C}$  以下の予備凍結したものは処理後約 20 日を過ぎてから、徐々に変色した。これらの結果から予備凍結後、植物が液体窒素処理に耐えるためには、その植物が  $-30^{\circ}\text{C}$  や  $-40^{\circ}\text{C}$  での凍結に耐えるだけでは不十分で、すくなくとも  $-70^{\circ}\text{C}$  以下の凍結に耐えることが必要であることを示している。このことをたしかめるために、さらに多くの樹種を用いて同様な実験を行なった。その結果を第 4 表に総括して示す。この表からわかるように、予備凍結後液体窒素処理に耐えるためには、その植物がすくなくとも  $-70^{\circ}\text{C}$  の凍結に耐えることが必要のようである。また、ストロブマツ、ハイマツ、ニオイヒバ、シラカバ、ヲノエヤナギでは  $-70^{\circ}\text{C}$  での凍結に耐えるだけでなく、 $-100^{\circ}\text{C}$  や  $-120^{\circ}\text{C}$  の凍結にも耐えた。他のマツ類は  $-70^{\circ}\text{C}$  でしか凍結しなかった。これらの実験結果から  $-70^{\circ}\text{C}$  の凍結に耐えるものはそれ以下のどんな低温にも耐えられるものと考えられる。 $-70^{\circ}\text{C}$  以下の凍結に耐える樹種間でも、効果的予備凍結温度は樹種によって  $-15^{\circ}\text{C}$  から  $-70^{\circ}\text{C}$  までかなり異なっている。なお、耐凍性のたかいものほど効果的予備凍結温度はたかい。

## 2. 効果的予備凍結温度におよぼす加温条件の影響

耐凍度がまだ最高値にまでたかまっていなかった 12 月 12 日のポプラの枝を用いて、液体窒素処理後ただちに  $0^{\circ}\text{C}$  の空中に取出したばあいと、 $-30^{\circ}\text{C}$  の部屋に 2 時間おいてから  $0^{\circ}\text{C}$  の空中に取出したばあいの結果を比較してみた。第 5 表に示すように、このポプラの枝は  $-40^{\circ}\text{C}$  までの凍結にしか耐えないが、液体窒素から取出して  $0^{\circ}\text{C}$  の空中でとしかしたばあいには、 $-20^{\circ}\text{C}$  ~  $-40^{\circ}\text{C}$  の温度で予備凍結したものは液体窒素処理に耐えたが、液体窒素処理後  $-30^{\circ}\text{C}$  に 2 時間おいたものはいずれの温度で予備凍結したものも生存できなかった。

第 5 表 効果的予備凍結温度におよぼす加温条件の影響

加 温 条 件*	予 備 凍 結 温 度 ( $^{\circ}\text{C}$ )							
	-15	-20	-30	-40	-50	-60	-70	-100
$0^{\circ}\text{C}$ の 空 中	●	○	○	○	△	△	△	△
$-30^{\circ}\text{C}$ に 2 時間おいてから $0^{\circ}\text{C}$ の空中	●	△	△	△	△	△	△	△

\* 液体窒素から取り出したあとの加温条件

実験材料：ポプラの枝 (12 月 12 日) この枝は  $-40^{\circ}\text{C}$  までの凍結に害なく耐えるが、 $-50^{\circ}\text{C}$  以下では芽は正常であるが材部が害を受ける

## 3. 凍結状態で温度をあげたばあいの細胞内への水の再吸収の速さ

凍っている細胞は温度の上昇につれて細胞内に水を再吸収するが、シラカバの枝を用いてその速さを間接的な方法で調べてみた。前記のべたように、液体窒素処理後、シラカバの枝を生存させるのに必要な予備凍結温度は  $-15^{\circ}\text{C}$  である。いま  $-30^{\circ}\text{C}$  で凍結した枝を  $-10^{\circ}\text{C}$  に移し、一定時間後、この枝を液体窒素中に入れたとき、もし枝が死ねば、その時間中に細胞内に十分な水が再吸収されたことになる。このことを調べるために、シラカバの枝 (長さ 10 cm,

第 6 表 凍結状態における細胞内への水の再吸収の速さ

	-10°C におく時間*					-5°C におく時間*					
	0	10秒	30秒	1分	3分	10分	0	30秒	1分	3分	10分
枝の発芽率**	4/4	4/4	2/4	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4

\* -30°C で凍結した枝を -10°C または -5°C に冷やされたイソペンタン中に入れてからの時間

\*\* イソペンタンから液体窒素中に入れ、取り出してから 1 カ月間水挿後正常に発芽した枝の割合

直径 0.3 cm) を -5°C で凍結後、-30°C までゆっくり冷却し、そこに 16 時間おいた。-30°C で凍結している枝を -5°C または -10°C に冷やされたイソペンタンの槽中に入れ、それぞれ 30 秒、1、3 および 10 分間おいてから液体窒素中に入れた。第 6 表に示すように、-30°C から -10°C のイソペンタン中に入れてから 30 秒経過したものでは、4 本中 2 本が全く正常に発芽したが、あとの 2 本は発芽しなかった。-10°C のイソペンタン中に 1~10 分間おかれたのち、液体窒素中に入れたものはいずれも発芽の徴候さえ示さなかった。また -5°C のイソペンタン中に入れたものでは、30 秒間入れておいたものでも全く発芽しなかった。これらの実験事実から、-30°C で凍っている枝を -10°C に移したとき凍結状態においても、すくなくとも 30 秒以内に細胞内に水が再吸収されることが明らかである。もっと適当な材料でこの問題をさらに詳細に調べてみる予定である。

#### IV. 考 察

予備凍結後、液体窒素処理に耐えるためには植物の耐凍度が -30~-40°C では不十分で、約 -70°C の凍結に耐えることが必要である。著者が今迄使用してきた材料中には、-50~-60°C の温度で凍害を受ける材料はみあたらなかったもので、今のところこの正確な温度をきめることはむづかしい。しかしこの問題は重要であるので、さらに他の材料を用いて調べてみる予定である。現在のところでは、-70°C までの凍結に耐えるものは、液体窒素処理はもちろんそれ以低のどんな低温にも耐えられるものと考えられる。したがって、-70°C までの凍結に耐えるものでは、樹種間の耐凍性の大きさを通常の方法では判別できない。また札幌にある多くの樹種は、11 月下旬に -70°C の凍結に耐えるようになるので、それ以降は耐凍性の変動が調べられなくなる。しかし、-70°C 以低の凍結に耐えるものでも、効果的予備凍結温度をはかれば、樹種間の耐凍性の大きさやそれらの耐凍性の季節変動をすることができる<sup>5,6)</sup>。多くの研究者<sup>7-10)</sup>は -70°C まで予備凍結してからはじめて液体窒素中に入れているし、また液体窒素中に入れても生存しているから耐凍度はすでに最高値に達していると考えているが、液体窒素処理に耐えたからといって必ずしも耐凍度が最高値に達したとはいえない<sup>11)</sup>。このことはシラカバやヤナギの効果的予備凍結温度が、耐凍度に応じて -15°C から -70°C まで変化していることから明らかである。

効果的予備凍結温度をはかるときは、液体窒素処理後 -30°C の温度に 2 時間おいてから 0°C の部屋に取出して融解している。もしも予備凍結後、なお細胞内に凍りうる水があるていど残っておれば、液体窒素中への急速冷却中に細胞内にできた氷晶核が液体窒素から取出して

から  $-30^{\circ}\text{C}$  の温度におかれるあいだに、生長して害をあたえるものと考えられる。したがって効果的予備凍結温度は細胞内の凍りうる水が脱水される温度を示すものと解釈される。

カラマツは  $-30^{\circ}\text{C}$ 、トドマツは約  $-40^{\circ}\text{C}$ 、アカエゾマツは約  $-45^{\circ}\text{C}$  までの凍結に耐えるが、それ以下では害を受ける。このように、 $-30^{\circ}\text{C}$  以下の温度でも、 $-70^{\circ}\text{C}$  まで温度が低下するにつれて凍害を受ける樹種がある。このことは  $-30^{\circ}\text{C}$  以下の温度でも細胞外凍結によって脱水が進行していることを示しているものと考えられる<sup>9,10</sup>。最近、著者<sup>12</sup> がクワの皮層細胞を用いて明らかにしたように、 $-30^{\circ}\text{C}$  で予備凍結してから液体窒素中に入れ、その後、氷晶の生長速度がもっとも大きい  $-30^{\circ}\text{C}$  の温度に 10 分間または 60 分間おくと生存率が著しく低下することを見出した。しかし  $-45^{\circ}\text{C}$  以下で予備凍結したものでは、 $-30^{\circ}\text{C}$  の温度に 1 時間おいても生存率はほとんど低下しなかった。細胞内の凍りうる水が、 $-30^{\circ}\text{C}$  以下のどの温度まで温度低下につれて減少してゆくか今後さらに詳細にしらべる予定である。いずれにしても耐凍度のたかいものほど、細胞内の凍りうる水がより高い温度で脱水されてしまうことは興味ある現象である。

## V. 摘 要

予備凍結後、液体窒素中に入れて植物を生存させるのに必要な予備凍結温度は植物の種類によって  $-15^{\circ}\text{C}$  から約  $-70^{\circ}\text{C}$  までことなっている。一般に耐凍性のたかいものほど効果的予備凍結温度はたかい。少なくとも、 $-70^{\circ}\text{C}$  までの凍結に耐えるものはそれ以下のどんな低温にも耐えうるが、 $-70^{\circ}\text{C}$  までの凍結に耐えないものは予備凍結後、液体窒素処理にも耐えない。

## 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  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Nature*, **185**, 393-394.
- 4) 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.
- 5) 酒井 昭 1963 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. 低温科学, 生物篇, **21**, 41-46.
- 6) Sakai, A. 1965 Survival of plant tissue at super-low temperatures. III. Relation between effective prefreezing temperature and degree of frost hardiness. *Plant Physiol.*, **40**, 882-887.
- 7) Parker, J. 1959 Seasonal variations in sugars of conifers with some observation on cold resistance. *Forest. Sci.*, **5**, 56-63.
- 8) Parker, J. 1960 Survival of woody plants at extremely low temperature. *Nature*, **187**, 1133-1134.
- 9) Туманов, И. И. и Красавцев, О. А. 1959 Закаливание северных древесных растений отрицательными температурами. *Физиология Растений*, **6**, 654-667.
- 10) Туманов, И. И., Красавцев, О. А. и Хвалин, Н. Н. 1959 Повышение морозостойкости березы и черной омородины до  $-253^{\circ}$  путем закаливания. *Доклады Академии Наук*, **127**, 1301-1303.
- 11) Siminovitsh, D., Gfeller, F. and Rheaume, B. 1967 The multiple character of the biochemical mechanism of freezing resistance of plant cells. *In Cellular Injury and Resistance in Freezing*.

izing Organisms (E. Asahina, *ed.*), Inst. Low Temp. Sci., Sapporo, 93-117.

- 12) 酒井 昭・吉田静夫 1967 超低温における植物組織の生存. VI. 生存率におよぼす冷却および加温速度の影響. 低温科学, 生物篇, **25**, 9-19.

### Summary

To clarify the mechanism of survival of plant tissues at super-low temperatures, the effective temperature for maintaining viability at super-low temperature were investigated using various woody plants in winter.

It was confirmed that plants surviving freezing at temperatures of approximately  $-70^{\circ}\text{C}$ , can withstand immersion in liquid nitrogen following prefreezing, and at temperatures below  $-70^{\circ}\text{C}$  or thereabouts the intensity of cold itself has no further effect on these extremely hardy plants, if it is not of a long duration.

The effective prefreezing temperature differed considerably in different species in a temperature range from  $-15$  to about  $-70^{\circ}\text{C}$ , according to the degree of frost hardiness. In every experiments, it was observed that the greater the frost hardiness, the higher the effective prefreezing temperature.