Shizuo YOSHIDA and Akira SAKAI 1967 The Effect of Thawing Rate on Frost Damage in Plant I. —The Damage Caused by Rapid Thawing— *Low Temperature Science, Ser. B, 25.* (With English Summary p. 79)

植物の凍害におよぼす融解速度の影響 I*

急速融解の害

吉田静夫・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

凍結後，急速に融解することは，植物にとって有害である。急速融解による害の度合は，植物の耐凍性の大きさによってかなりことなる。耐凍性の小さい植物や，たとえ，耐凍性の大きな植物でも，早春から晩春にかけて耐凍性が低下している時期には急速融解の害を受け易くなる[1]。しかし耐凍性の大きい冬の木の枝の皮層細胞では，凍結状態で −70°C まで，または −30°C から液体窒素中に入れたものを，40°C の水中に入れて急速融解しても害を受けない[2,3]。

融解速度が植物におよぼす影響として，(A) 凍結温度から植物組織氷点までの加温速度，(B) 組織氷点付近における加温速度，(C) 組織氷点以高の温度範囲における加温速度の少なくとも3つの要因が考えられる。これらの要因についてくわしく解析したデーターは今のところない。

本論文は，これらの要因を解析するために，晩春すでに耐凍性がかなり低下したツゲやイヌツゲの葉を用いて行なった実験結果の報告である。

II. 材料と方法

実験材料として，ツゲ (*Buxus microphylla* Sieb. et Zucc.) とハイイヌツゲ (*Irex crenata* Thumb.) の葉を用いた。いずれも5月9日に採取し，ただちに実験に供した。個体差を最小にするため，同一系列の実験には，同一株の同一方位にある均一な枝，あるいは葉を採取して実験に用いた。

ツゲの葉は −5°C，16時間の凍結に耐えたが，−10°C で3時間の凍結に耐えなかった。イヌツゲの葉では −5°C，4時間の凍結が限界であった。凍結はすべて低温室内の −5°C に保たれた恒温箱の中で行ない，あらかじめ葉の付いた枝の切口を少量の水でぬらし，30分後に人工的に植氷を行なって，肉眼で凍結を確認した上で，いろいろな実験を行なった。

融解条件として，凍結温度よりも高い温度に保たれた食塩と氷の混合液中に入れた後，20°C の温水中に入れて急速にとかすか，0°C の空中にとり出してゆっくり融解させた。なお，

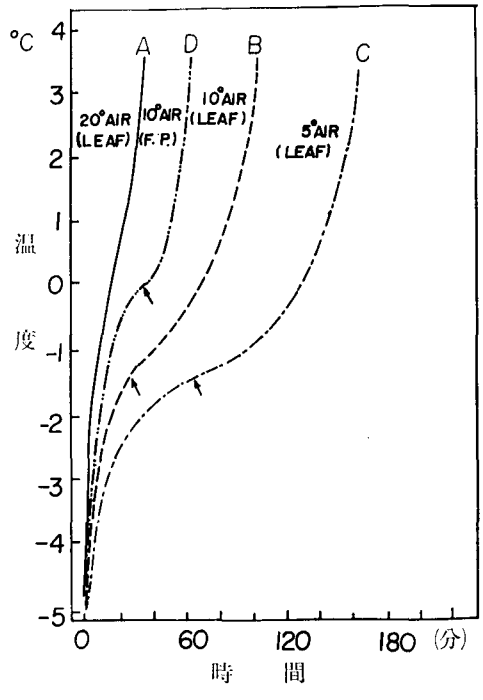
* 北海道大学低温科学研究所業績　第850号

直接 0, 10, および 20°C の各温度の空中にとり出して融解させたものを対照とした。

急速融解に対する凍害防禦物質の効果を調べるばあいには，葉柄の部分から切り取った葉を，いろいろの濃度の平衡塩溶液，蔗糖およびグルコースの各水溶液中に入れ，真空ポンプで減圧して強制的に葉の細胞間隙にこれらの溶液を入れた。その後，−5°C で凍結し，20°C の温水中に入れて急速に融解させた。溶液が細胞間隙に入ったことは，葉の色の変化から確認できた。

害を判定するばあいは，枝のまま処理したばあいには，そのまま水挿し，葉だけを処理したばあいには，シャーレーの底に湿った濾紙をしいてその上に葉を並べて，いずれも処理後 10 日間室温においた。害の度合は，葉柄，葉脈，葉身の害，枝のまま実験したときには，落葉の有無をも考慮に入れて，0 から 4 までの 5 段階にわけて表わした。0 は無害で，1 は葉柄の基部，2 は葉柄の基部および葉脈の一部，3 は葉柄，葉脈および葉身の半分，4 は葉全体が害されていることを表わす。なお，害の度合は，10 枚以上の葉について調べ，それらの平均値で表わした。

葉の氷点は，葉から搾汁液をとって氷点降下法で求めた。そのために，表面をきれいに拭きとった葉を室温から直接液体窒素中に投入し，融解後 1 時間たってから搾汁液をとった。ついで搾汁液を内径 4 mm，長さ 4 cm のガラス管の先端の球状部分に入れ，0.1 mm の銅—コンスタンタン熱電対をこの球状部分のほぼ中心に入れて，約 −2.5°C のフリーザーの中で凍結させた。先端に小さな氷晶をつけたガラス毛細管で過冷却を破り，リバンドして一定温度に達したところをその氷点とみなした。搾汁液の氷点は，ツゲの葉は −1.57°C，イヌツゲは −1.31°C であった。



第 1 図 イヌツゲの葉の融解曲線

イヌツゲの葉の中央部に，0.1 mm の銅−コンスタンタン熱電対を挿入して，−5°C で凍結後，いろいろな温度の空気中で融解した。A, B, C はそれぞれ，20°C の空中，10°C の空中および 5°C の空中で融解したばあいの融解曲線を示す。D は，イヌツゲの葉と同型，同大に切りぬいた濾紙を湿らせて凍結後，10°C の空中で融解したばあいの融解曲線を示す。矢印は，水の氷点，あるいは，葉の搾汁液の氷点 (−1.3°C) を示す

III. 結 果

1. 融解曲線について

−5°C で凍結したイヌツゲの葉を，5, 10 および 20°C の空中で融解させたときの融解曲線を第 1 図に示す。5 および 10°C の空中で融解させたばあい，−2.5°C 付近から曲線の傾斜はゆるくなり，組織の搾汁液の氷点である −1.3°C 前後において一種の転移点が現われる。イヌツゲの葉と同型同大に切りぬいた濾紙片を水で湿らせて −5°C で凍結したのち，

10°C の空中で融解させると，その融解曲線は 0°C において明瞭な転移点を持つ。20°C の空中で融解されると，ほとんど直線的となり，転移点は明らかでない。これらのことから，組織の搾汁液の氷点近くにおいて，細胞外に生じた氷の大部分が融解するものと推察される。

2. 融解速度と被害

−5°C で 3 時間凍結後，いろいろな条件で融解させ，被害の程度を調べた。ツゲの葉の実験結果を第 1 表に，イヌツゲの葉の実験結果を第 2 表にそれぞれ示した。ツゲの葉も，イヌツゲの葉も，10°C 以低の空中でとかしたばあいには，ほとんど無害であるが，20°C の空中でとかすときは，−5°C から直接 5°C の水で融解したばあいと同程度の害を受ける。ツゲの葉は，−5°C で凍結後，0°C の水で融解しても軽い害が現われるし，1°C の水で融解すると，5°C あるいは 20°C の水で融解したときと同程度の害を受ける。一般に，融解速度の大きいほど被害も大きい。

第 1 表　融解速度と被害程度（ツゲの葉）

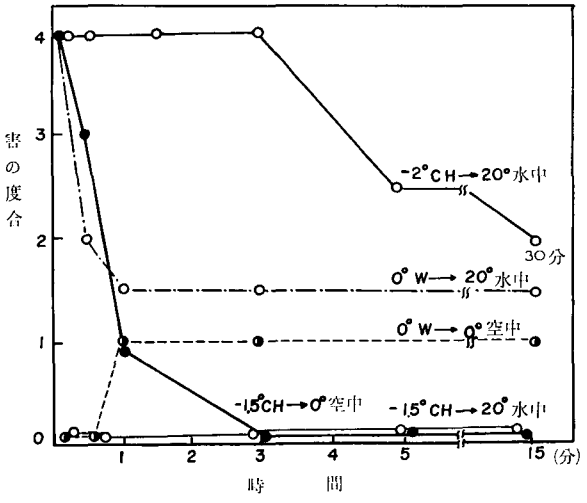
融解条件						
0°C空中	10°C空中	20°C空中	0°C水	1°C水	5°C水	20°C水
0*	1	3	1	3	3	4

−5°C で 3 時間凍結後いろいろな融解速度で融解した
* 数字は被害の程度をあらわし，数字のますことは被害のますことを意味する。0 は無害，1 は葉柄基部，2 は葉柄基部と葉脈の一部，3 は葉柄，葉脈のほか葉身の半分，4 は葉全体が害されていることを示す

第 2 表　融解速度と被害程度（イヌツゲの葉）

融解条件			
0°C 空中	10°C 空中	20°C 空中	20°C 水
0*	1	2	4

実験方法その他は第 1 表に同じ



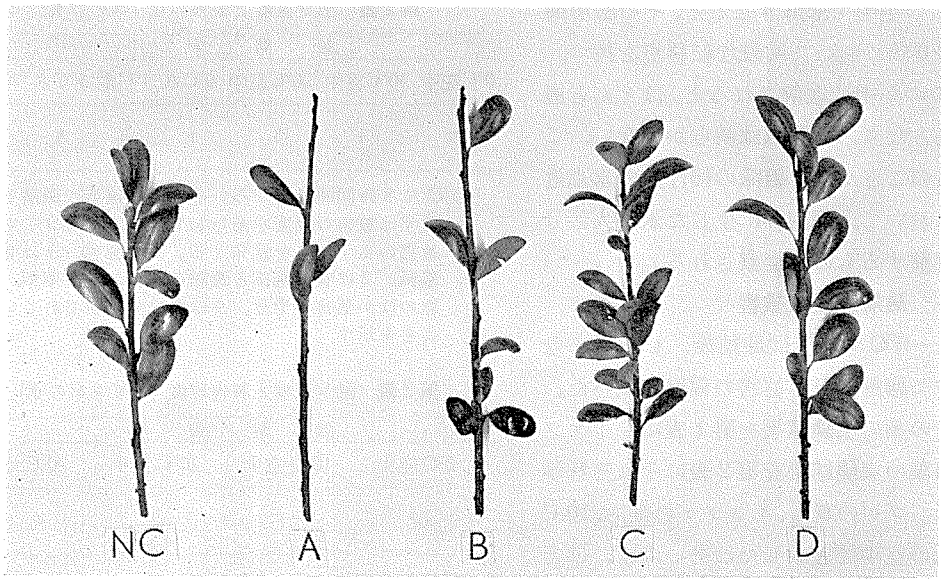
第 2 図　葉の搾汁液の氷点の温度に保つ時間とその後の急速加温との関係 (1)

ツゲの葉を −5°C で 3 時間凍結後，0°C の水，−1.5°C および −2.0°C の食塩と氷の混合液にそれぞれ一定時間入れてから，20°C の温水中，または，0°C の空中で融解した。−1.5°CH，−2°CH はそれぞれ −1.5°C および −2°C の食塩と氷の混合液を示す。被害程度は数字であらわし，数のますことは被害のますことを意味する

3. 組織氷点におかれる時間とその後の急速加温

融解速度に関係しているいろいろの要因を解析するために，凍結している組織をできるだけ速く組織氷点付近まで加温し，氷点付近の温度に一定時間おいてから，一方は急速に加温し，他方はゆっくり加温する実験を行なった。

そのために 0°C 以低の一定温度に保たれた食塩と氷の混合液，もしくは 0°C の水中に −5°C で凍結した枝（枝 1 本あたり 15 枚の葉が付いている）を入れ，一定時間後急速に 20°C の温水中に入れて急速融解させた。対照は，0°C の空中でゆっくり融解させた。−5°C から組織氷点に保たれた食塩と氷の混合液に入れると，約 4 秒



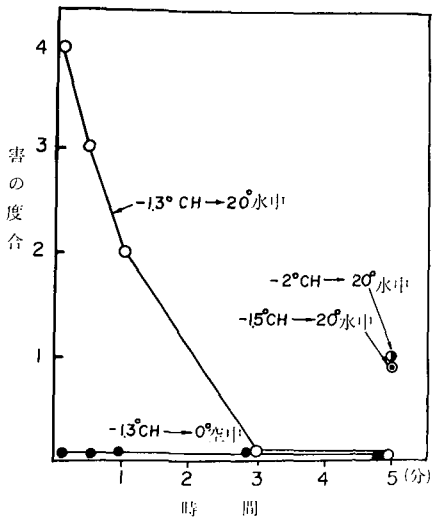
第3図 葉の搾汁液の氷点の温度にいろいろの時間保ち，その後急速に加温した葉の被害
材料： ツゲの葉。NC は対照，A, B, C, D は −1.5°C の食塩と氷の混合液に，それぞれ，30秒，1分，3分および15分間入れてから20°C の温水中で急速加温したばあいの被害を示す

以内に組織氷点に達する。intact な状態では，1時間以内に食塩溶液が葉の内部に入ることはない。

第2図に示すように，ツゲの葉の組織氷点である −1.5°C の食塩と氷の混合液に1分間入れてから急速に加温すると，害はいちじるしく軽減する。なお，3分間入れたばあいは，急速加温による害はまったく認められない（第3図）。このことは，組織氷点までの急速加温それ自体は有害でなく，害のていどは，組織氷点に保たれる時間と，その後の加温条件によってきまることを示している。組織氷点よりも 0.5°C 低い −2°C の食塩と氷の混合液に入れたばあい，ここに3分間入れても害は軽減されないが，5分間以上入れるとその後急速に加温しても害は小さくなる。−5°C で凍結している葉を 0°C の水に急速に入れて，約1分後に 20°C の温水で急速加温するばあいには，直接 20°C の温水に入れる場合と比較して，害はいちじるしく軽減するが，1分以上長く入れても，害はそれ以上軽減しない。一方，0°C の水に一定時間入れて，0°C の空中でゆっくり加温するときは，0°C の水に入れる時間が 30 秒以内ではまったく無害であるが，1分以上長く入れておくと 0°C の空中でゆっくり加温しても軽い害が認められる。その後，さらに 0°C の水中に入れておいても害はまさない。このことは，30 秒以上 0°C の水に入れておいて，始めて害があらわれることを意味している。なお第4図にイヌツゲの結果を示す。イヌツゲのばあいも，ツゲのばあいとほぼ同じ傾向を示している。

4. 細胞間隙に入れた媒液の耐凍性と急速融解におよぼす影響

細胞間隙に入れられた媒液の耐凍性におよぼす影響を調べるために，いろいろな濃度の平衡塩溶液，蔗糖溶液およびグルコース溶液を減圧下で葉の細胞間隙に強制的に入れた。その



第4図　葉の搾汁液の氷点の温度に保つ時間とその後の急速加温との関係 (2)
材料：イヌツゲの葉，加温条件：20°Cの水中
−1.3°CH，−1.5°CH はそれぞれ，−1.3°C および −1.5°C の温度を有する食塩と氷との混合液を示す。被害の程度は数字で示し，数のますことは被害のますことを意味する

第3表　細胞間隙に入れた媒液の耐凍性におよぼす影響

凍結温度 (°C)	無処理	グルコース (M) 0.2	0.6	1.0	平衡塩溶液*(M) 0.1	0.3	0.5	蔗糖 1.0 M
− 5	0**	0	0	0	0	0	4	0
−10	4	2〜3	2	0	4	4	4	0
−15	4	4	4	4	4	4	4	4

材料はツゲの葉を用い，各温度で3時間凍結後 0°C の空中で融解した
*　食塩濃度で表わした
**　数字は被害のていどを表わし，数字のますことは被害のますことを意味する。0は無害，1は葉柄基部，2は葉柄基部と葉脈の一部，3は葉柄，葉脈のほか葉身の半分，4は葉全体が害されていることを示す

後，−5，−10 および −15°C の各温度で3時間凍結して，これらの媒液の耐凍性におよぼす影響を調べた。第3表にその結果を示す。

無処理の葉は −5°C での凍結にしか耐えられないが，1.0 M のグルコースあるいは 1.0 M の蔗糖溶液を細胞間隙に入れた葉は −10°C の凍結にも耐える。0.6 M のグルコース溶液でも，わずかながら凍害防禦効果がある。ツゲの葉の浸透濃度は約 0.8 M であるから，低張溶液でも凍害に対する防禦効果を有していることになる。平衡塩溶液を細胞間隙に入れても，凍害に対する防禦効果は認められない。0.5 M の平衡塩溶液は，それ自身 intact な葉に対して有害に作用する。しかし，1.0 M のグルコース溶液と蔗糖溶液を細胞間隙に入れた葉を，濾紙をしいたシャーレーの中に入れて，水を補給しながら室温で10日間放置しておいたが害作用は認められない。

つぎに，いろいろな濃度の蔗糖溶液と平衡塩溶液を細胞間隙に入れて，−5°C および −10°C で3時間凍結後，20°C の温水中に入れて急速に融解させた。そのときの結果を第4表に示す。

第4表　細胞間隙に入れた媒液の急速融解におよぼす影響

凍結温度と融解条件	蔗糖 (M) 0.1	0.5	1.0	平衡塩溶液*(M) 0.05	0.25
− 5°→20°C 水	4**	0	0	4	3
−10°→20°C 水	—	2	1	—	—

材料はツゲの葉を用い，−5°C および −10°C で3時間凍結後 20°C の温水中で急速融解した
*　平衡塩溶液の濃度は食塩の濃度で表わした
**　被害のていどを表わす

0.5 M 以上の蔗糖溶液で処理した葉は，−5°C から 20°C の温水中に入れて急速融解しても害を受けない。−10°C から 20°C の温水中に入れて急速融解するばあいでも，1.0 M の濃度で処理された葉の被害はわずかである。

しかし，平衡塩溶液の急速融解の害に対する防禦効果はきわめて小さい。なお，急速融解の害に対する蔗糖溶液の防禦効果は高張溶液である必要はない。

5. 常温または −5°C の凍結状態で乾燥してから急速に吸水，または，融解した場合

常温で，シリカゲルの入っているデシケーターの中に，乾燥を一様にするため，先端と基部を切り取ったツゲの葉を一定時間入れて，一方は減圧で急速に吸水させ，他方は湿った濾紙をしいたシャーレーの中において24時間ゆっくり水を吸水させた。その結果を第5表に示す。

含水率が25.7%のとき，急速に吸水させると害は大きく，ゆっくり吸水させるときは害はきわめて小さい。10%以下の含水率になるまで脱水されるときは，乾燥されるだけで害をうける。

つぎに，−5°C の凍結状態で，シリカゲルの入っているデシケーターに入れて，含水率が56.1%から39.6%になるまで乾燥させるばあいは，その後急速に20°C の温水中に入れても害は小さい（第6表）。

第5表 常温で乾燥したのち急速に吸水させるときの害

含水率* (%)	被害の度合**	
	ゆっくり吸水	急速に吸水
56.4	—	—
31.7	0	1
25.7	1	4
5.1	4	4

材料：ツゲの葉
* デシケーターに入れて一定時間後の含水率を生重量あたりで表わした
** 被害の度合の表わし方は第1表に同じ

第6表 −5°C で凍結乾燥後，急速に融解したときの害

融解条件	含水率 (%)	害の度合
対照*	56.1	4***
20°C の温水	39.6**	2
0°C の空中	39.6**	0

材料：ツゲの葉
* 乾燥しないで −5°C から直接 20°C の温水に入れたもの
** −5°C で24時間凍結乾燥したのちの含水率
*** 害の度合の表わし方は第1表と同じ

IV. 考　　察

植物の急速融解の害は，細胞外凍結によって脱水された細胞が，細胞に接してその外側にできている氷の急速な融解に伴う急速な吸水のために起ると考えられている[4−6]。細胞が凍結で害されていないときは，細胞間隙にできる氷は，溶質を含まないが[7]，氷の状態および細胞液の蒸気圧の影響をうけるので，必ずしも0°C でとけない。

また原形質膜は水の出入に対して制限的に働くから，凍結状態で温度が上昇するばあい，細胞内への再吸水は必ずしも温度上昇に伴わない。

Scholander 等[8]は，ユスリカの幼虫について，凍り得る水の量を調べた結果，少なくとも，−15°C までの温度範囲では，温度の上昇過程ではかっても，下降過程ではかっても，凍り得る水の量は同じであることから，凍結状態での水の脱水および再吸水は，ゆっくり冷却または加温するときはまったく可逆的に移行すると述べている。したがって，凍結した組織を非常にゆっくり加温させたばあいは，細胞間隙の氷は細胞内への吸水を伴いながら融解する。しかし，急速に加温された場合には，細胞間隙の氷の融解と細胞内の再吸水とは時間的に大きくずれ，しかも，細胞内への再吸水の速度は大きくなる。第1図に示したように，植物組織を融解すると，組織搾汁液の氷点近くで一種の転移点が現われる。これは，細胞間隙の氷の大部分がこの

転移点付近で融解するためと考えられる。

これらのことから，急速に融解したときの害は，多量の氷が融ける組織氷点付近を急速に通過するとき起るもので，組織氷点以低の温度範囲を急速に通過することは有害でない。Tumanov 等[9,10]も，真冬のシラカバの枝を用いて急速融解に関する実験を行っているが，−5°C よりも低い温度範囲を急速に加温しても害がないと述べている。彼等は枝の組織氷点を測定していないが，皮層組織の氷点は約 −3°C 位と推定される。

葉の組織氷点の温度に保たれた食塩と氷の混合液に，−5°C で凍結した葉を入れると，葉の温度は 4 秒以内にその温度に達する。こうした葉を 0°C の空中でゆっくり融かすと害を受けないことから，ある凍結温度から組織氷点温度までの急速加温そのものは有害でないことがわかる。また，3 分以上組織氷点の温度に保たれれば，それ以後急速に加温しても害がない。このことから，組織氷点の温度に約 3 分おかれればあるていど再吸水が進むので，その後の急速加温によって害を受けなくなると考えられる。組織氷点よりも低い温度範囲でも，温度上昇とともに再吸水が進むと考えられるが，ツゲの葉ではその組織氷点よりも 0.5°C 低い −2°C の温度の食塩と氷の混合液に 30 分入れておいてから，20°C の温水に入れても可成り大きな害を受けた。したがって，組織氷点以低の温度範囲における再吸水の度合は小さいものと考えられる。

Levitt[5]は，ムラサキキャベツの葉柄の切片をいろいろな温度で凍結後各温度から 2°C の水中で急速に融解し，一方はそのまま水に入れておき，他方は高張な塩化カルシウム溶液に移したそのばあい，塩化カルシウム溶液に移した方が生存率は高かった。このことから，彼は，植物が凍結融解後におかれる条件がその後の害に影響すると結論している。しかし，組織氷点の温度におかれる時間が十分長ければ，その組織または切片が融解までに害を受けていなければ，融解後の条件は生存率にほとんど影響をおよぼさないものと考えられる。

外液に凍害防禦物質を加えて切片を凍結すると，耐凍性が高まるだけでなく，急速融解による害からも防禦される。酒井[6]の実験では，水を媒液として凍結するばあいには，−10°C の凍結にしか耐えないキャベツの細胞を 0.8 M グルコース溶液中で凍結させると，−30°C で予備凍結後液体窒素中に入れ，つづいて 30°C の温水中に入れて急速に融かしても大部分の細胞は生きていた。

常緑樹の葉を用いた本実験でも，ほぼ同じ結果を得た。細胞間隙に入った糖の急速融解の害を防ぐ機構は，細胞に接して外側にある濃縮された糖溶液の層のため，細胞が急速に再吸水されないためなのか，糖分子が直接原形質表層を害から防禦するためなのかわからない。

室温で乾燥した葉に，水を急速に吸収させると大きな害を受けるが，−5°C である程度凍結乾燥した葉を急速に融解しても害は小さい。凍結状態で乾燥すれば，細胞間隙の氷の量は減少し，急速に融解しても，細胞内にもどり得る水の量は制限される。Tumanov 等[9,10]は，冬の木の枝を凍結乾燥して，含水量が 25% 以下になると −60°C から直接 20°C の水銀中で急速融解しても害を受けないと述べている。

本実験では，耐凍性の低い材料を扱ったが，今後，耐凍性の高い材料についても調べる予定である。また，細胞外凍結によって，細胞の外側に生ずる氷の量が，温度の下降および上昇

とともにどう変るかということも今後に残された課題であると思う。

V. 摘 要

植物を急速融解したばあいの害の機構を明らかにするため，ツゲとイヌツゲの葉を用いて一連の実験を行なった。

1) 組織氷点の温度までの急速加温は有害でない。

2) 急速融解の害は，組織氷点付近の温度範囲を通過する速度が大きいためおこるものと考えられる。組織氷点の温度に3分以上保たれた植物は，その後の急速加温によって害を受けない。

3) 0.5 M 以上の濃度の糖溶液を葉の細胞間隙に入れて凍結させると，耐凍性がたかまるし，急速融解による害からも防禦される。

4) 凍結状態で乾燥した葉を急速に融解したときは，害作用はすくない。

以上のことから，急速融解の害は脱水状態の細胞に組織氷点付近の温度で多量の水が急速に細胞内に再吸収されることによって起るものと考えられる。

文 献

1) 酒井昭・吉田静夫・大塚宏二 1967 トドマツの霜害に関する研究. (1). 霜害に及ぼす融解速度の影響, 日林誌, **49**, 9-16.

2) 酒井 昭 1966 超低温における植物組織の生存. IV. 急速冷却, 急速加温した細胞の生存の機構. 低温科学, 生物篇, **24**, 1-13.

3) 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.

4) Iljin, W. S. 1933 Über den Kältetod der Pflanzen und seine Ursachen. *Protoplasma*, **20**, 105-124.

5) Levitt, J. 1957 The moment of frost injury. *Protoplasma*, **48**, 289-302.

6) 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.

7) 照本 勲 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.

8) Scholander, P. F., Flagg, W., Hock, R. J. and Irving, L. 1953 Studies on the physiology of frozen plants and animals in the Arctic. J. Cell. Comp. Physiol., **42**, Suppl. **1**, 1-56.

9) Туманов И. И. и Красавцев, О. А. 1962 Влияние быстроты оттаивания на выживание витрифицированных клеток и закаленных растений. Физиология Растений, **9**, 595-606.

10) Туманов, И. И. и Красавцев, О. А. 1962 Изучение механизма отмирания растений при быстром их оттаивании. Физиология Растений, **9**, 718-729.

Summary

To clarify the mechanism of the damage caused by rapid thawing, some experiments were made using the leaves of *Buxus microphylla* and *Irex crenata*.

The frozen leaves at−5°C were rapidly rewarmed by immersion in freezing mixtures kept at the temperatures of freezing points of their leaf tissues. After having been kept there for various lengths of time, the leaves were rapidly thawed by immersion in water at 20°C or slowly in air at 0°C. The degree of damage caused by immersion into water at 20°C decreased with the length of time at which the freezing points of their leaf tissues were kept. The leaves kept longer than 3 minutes at their freezing points could survive a subsequent rapid rewarming in water at 20°C. When the leaves were rewarmed in air at 0°C after removal from freezing mixtures kept at their freezing points, they suffered no damage, irrespective of the length of time at which their freezing points were kept.

The leaves in which sugar solutions were infiltrated into their intercellular spaces showed a considerable increase in their frost hardiness and were protected from damage caused by rapid thawing.

These results seem to indicate that rapid rewarming from a freezing temperature to the freezing points of leaf tissues, and the rapid thawing after maintenance at their freezing points for some length of time have hardly any harmful effect on the leaves.

It may be considered, therefore, that the damage of rapid thawing is caused by the rapid flow into the cell interior of thawed water in intercellular spaces at a temperature range around the freezing point.