



Title	トドマツの耐凍性物質
Author(s)	武藤, 憲由; MUTO, Kazuyoshi
Citation	北海道大學農學部 演習林研究報告, 30(1), 1-32
Issue Date	1973-07
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/20913
Type	departmental bulletin paper
File Information	30(1)_P1-32.pdf



トドマツの耐凍性物質^{*,**}

武藤 憲 由^{***}

Frost Hardening Substances of Saghalien Fir^{*,**}

By

Kazuyoshi MUTO^{***}

目 次

緒 言	1
実験材料および方法	2
実験結果	6
考 察	21
結 論	27
引用文献	27
Summary	28

緒 言

植物の耐凍性に関与する物質として、古から糖がとりあげられ、このほか水溶性蛋白^{17,18)}, SH^{6,16)}, 有機リン酸⁸⁾ が報告され、また、耐凍性の増加および減少の過程で、核酸⁷⁾ が量的にいちじるしく変動すると報告されている。LEVITT⁵⁾ は SH \rightleftharpoons SS 説で植物の耐凍性増加の機構を説明しようとしているが、この仮説が妥当かどうかについては、今のところ何ともいえない。植物の耐凍性と糖との関係を重要視する研究者は今なお多いが¹²⁾、最近では蛋白質にかなりの関心がそそがれ、その関連で核酸がとりあげられている¹⁹⁾。

これまでの研究では、自然条件のもとで、あるいは低温処理ないし開芽促進処理などをおこなない、耐凍性の増加ないし減少にともなう平行的な量的変動を示す植物体内の物質を調べ当該物質を耐凍性に関与する物質と結論する例が多かった。しかしながら、この種の実験では

* この研究のかなりの部分は昭和46年度および47年度の文部省科学研究費によっておこなった。
This work has been fairly supported by grants from the Ministry of Education in 1971 and 1972.

** 植物体内に存在し、植物の耐凍性を高める物質を耐凍性物質とよぶことにする。
The term, frost hardening substances means those kinds of substances which exist in plants and make them frost hardy.

*** 北海道大学農学部林学科 造林学教室
Lab. of Silviculture, Dept. of Forestry, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.

植物の耐凍性と当該物質とが、互いに無関係で平行的に変動するものか、密接な因果関係にあるものかについては、必ずしも明確ではない。このことを確かめるため、酒井¹²⁾はクチナシ (*Gardenia jasminoides* ELLIS var. *grandiflora* NAKAI) の葉柄を糖液にさして、葉の細胞に人工的に糖を入れることをこころみた。クチナシの葉の耐凍性は、葉のなかに入った糖の量に応じて増加したから、糖が耐凍性に直接関与すると結論した。しかし、生育期間中や未成熟の状態では、細胞中の糖濃度を人工的にいくら高めても耐凍性はほとんど増加しない。

KOHN ら¹⁾はキャベツ (*Brassica oleracea* L. var. *Badger* MARKET) を照明下で低温処理すると耐凍性も浸透濃度も増加するが、ひきつづき暗黒状態で -3°C にさらすと、浸透濃度は高まらないが、耐凍性はさらにいちじるしく増加することを見ている。また、ジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) を低温処理すると糖はいちじるしく増加するが、凍結にたえるようにならない。マリモ²⁰⁾ (*Aegagropila Sauteri* (NEES) KÜTZ.) は糖をほとんど含んでいないが、室温においても1年中約 -20°C の凍結にたえる。このように耐凍性と糖との関係にはいくつかの例外がある。

いろいろな物質を植物にあたえて、その凍害防御効果を調べた研究^{4,12,13,14,15)}もある。実験には、植物体内に多量に存在し、その耐凍性に関与すると考えられる物質も用いられている。しかし、ただたんに、細胞中に入りやすく、低分子で溶解度が大きく、このため細胞の浸透濃度を高める可能性があるとの理由で選ばれた物質が数多い。KURAISHI ら³⁾はエンドウ (*Pisum sativum* L.) に Benzyladenine を噴霧して耐凍性を高めた。なお、このような Cytokinin 類の効果はエンドウの場合には寒い季節に実験した場合に限られる。

植物体内からとりだした物質を、おなじ種の植物にあたえて、その耐凍性を時期をとわず自由に高めることができれば、耐凍性と抽出物質との密接な因果関係を、これまでよりは明確にできるはずである。トドマツ (*Abies sachalinensis* MASTERS) の若い葉の1枚1枚を用いることによって、あたえる抽出物質の量はごくわずかですみ、また、抽出物質の耐凍性におよぼす効果を簡単に判定できる方法が見つかったので、いくつかの実験をおこなった。

実験材料および方法

トドマツの枝葉は北海道大学苫小牧地方演習林の造林地で採集した。樹齢15~45年生の各造林地の多くの造林木から、1本当たり少量づつ採集した。死んだ組織の含まれる割合をできるだけ少なくしたいとの配慮から、採集部位は当年生枝の先端5cmを限度とした。

枝葉の採集時期は1月中旬がおもで、年によっては1月中旬と下旬の2回におこなった。

厳冬季に採集した枝葉と比較するために、生育期間中にもトドマツの枝葉を採集した。

耐凍性物質の精製

耐凍性物質の精製の方法はおおむね Fig. 1 に示したとおりである。

粉碎した枝葉が多量のときは濾過が困難だから、まずメタノールで抽出し、ついで70%

メタノールで2度抽出する方法をとった。70%メタノールで抽出、濾過した濾液は減圧、35°~40°Cで固いアメ状になるまで濃縮した。濃縮の過程で沈殿してくる樹脂等は2度ほど濾過してとりのぞいた。抽出に用いた枝葉の生重量の半量に相当するピリジン・ブタノール・水 (3:4:7 容積比) の混合液を濃縮物に加え振った。静置すると液は徐々に上下2層に分離した。

メタノールに可溶の物質は、濾紙粉末 (200~300 mesh, 東洋濾紙製) をつめたカラムを用い、70%メタノールを流して溶出させ、トドマツの若い葉を用いた後述の方法で試験して耐凍性増進効果のある分画をもとめ、この分画をさらにイソプロパノール・メタノール・水 (4:1:2 容積比) で流して溶出し、トドマツの若い葉の耐凍性を高める分画をもとめた。しかし、あつかう量が少ない場合には、これらの溶媒の場合にもつぎに述べる上昇法によって、有効な分画

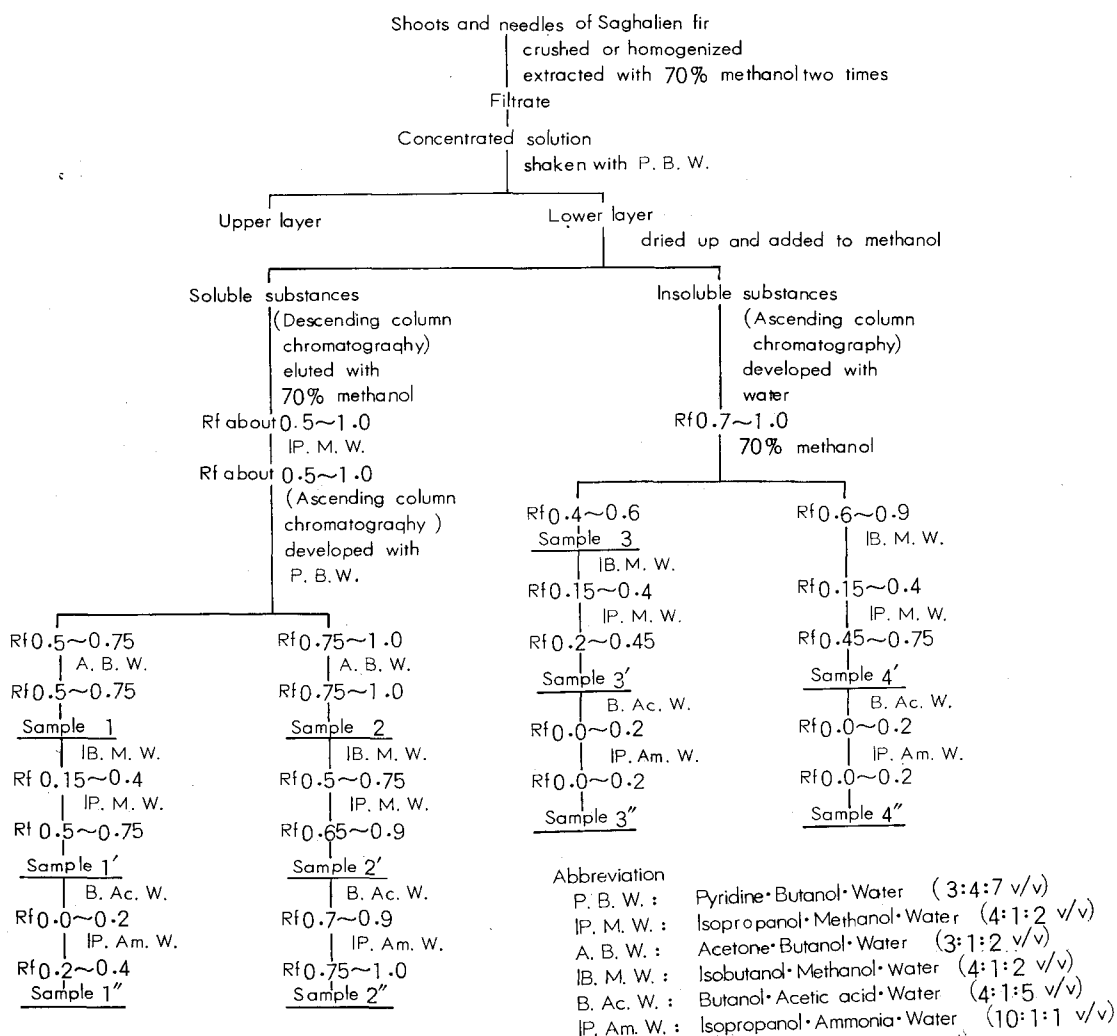


Fig. 1. The purification of frost hardening substances.

をとりだした。なお原点の下に位置する試料の部分は原点にふくめてとりだした。

用いたガラス管は長さ 25 cm, 内径 4.5 cm のものがおもで、時に内径 2.5 cm のものも使用した。ガラス管に前記の濾紙粉末をつめ、溶媒中に立たせる側から約 3 cm のところに、溶質をしみこませ、乾燥した濾紙粉末を 6~7 mm の厚さにつめた。さらに濾紙粉末をつめ、濾紙でおおった。この管を溶媒中に立て、クロマトグラフィ用箱の中で、Fig. 1 に示した溶媒を用いて約 18 cm 展開した。耐凍性増進効果のある分画をとりだし、この分画をさらに別の溶媒で上記の方法によって展開して精製をつづけた。

このようにしてえた試料のうち試料 1 と 2 は 70% メタノール、試料 3 と 4 は水とのかして -20°C 、1971 年からは -35°C の低温で貯蔵し、必要に応じてとりだして実験に用いた。

耐凍性増進効果の判定

あたえた物質が耐凍性を高めることができるかどうかは、トドマツ苗木の開いてまもない芽からとった若い葉を用いてたしかめた。

秋に鉢植えし、野外においたトドマツ苗木は、12 月下旬に温室に入れると、自然日長下でも、約 2 週間で開芽し、伸長をはじめ。苗畑で養成した 3 年生以上のトドマツ苗木の頂芽や輪生芽では、芽の基部、先端に着生する葉をのぞいても、1 個の芽から 1 回の凍結実験に十分な数の 100 枚前後の葉がえられる。

冬季には、適当な時期に毎回約 5 鉢の鉢植え苗木をガラス張りのコイトロン内、1970 年からは温室に入れて開芽を促進した。耐凍性を高める物質の Rf 値は少なくとも 6 個の芽からとった葉を用い、凍結実験を 6 回おこなって決定した。1 回の凍結実験には 1 個の芽からとった葉だけを用いた。芽はできるだけ 3 本以上の苗木からとって必要数あつめるようにつとめた。

貯蔵しておいた耐凍性増進効果のある各試料の適当量 (枝葉 30~50 g から抽出した量) を 40×40 cm の濾紙 (東洋濾紙 No. 51) に带状に下端から 4 cm のところにピペットでしみこませそれぞれの溶媒で約 20 cm 展開した。1 枚の濾紙を用いた時にはこれを 10 等分、時に 11 等分した。原点から下にしみこんだ部分は 0.0~0.1 あるいは 0.0~0.05 の分画にふくめて切りとった。各濾紙片を内径 8.5 cm のそれぞれのペトリシャーレ内に敷き、所定量の 8~10% 蔗糖液 (水溶液) でしめらせた。数枚の濾紙、あるいはカラムを用い展開した場合には抽出し、所定量を 8~10% 蔗糖液にとかし、ペトリシャーレ内に敷いた濾紙にあたえた。

濾紙上に、トドマツの若い葉を、気孔帯のある側を上にしてならべた。1 個のペトリシャ

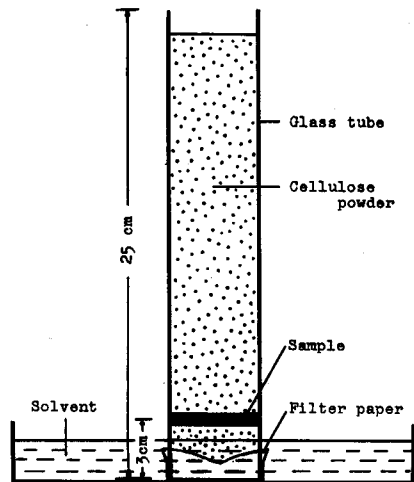


Fig. 2. The apparatus of ascending column chromatography.



Fig. 3. Saghalien fir needles in Petri-dishes.

The needles are placed like those in a Petri-dish at the right lower corner before exposing to low temperature.

ーレには、8~12枚の葉を1組として、6組までならべた。1度だけ8組ならべた。これらのペトリシャーレを、普通室内の窓ぎわにおいて室温にさらした。直射日光にあてないように注意した。朝と夕方に脱塩水をあたえて、ペトリシャーレ内の水分を調節した。

低温にさらす前に、1個の芽からとった各ペトリシャーレ内の葉を、別に用意した1個のペトリシャーレ内の水でしめらせた濾紙上にならべた。出来るだけ同じ条件で低温にさらすためにそれぞれの葉が互にふれあうようにならべ5~10個の組をつくり、それぞれの組には、各ペトリシャーレの葉が同数ふくまれるようにした。ふたをとって低温にさらした。なお濾紙の上に氷片をのせ過冷却をふせいだ。

凍結させた葉を室内に移し、融解させたのち、葉の脱色状態を顕微鏡で観察

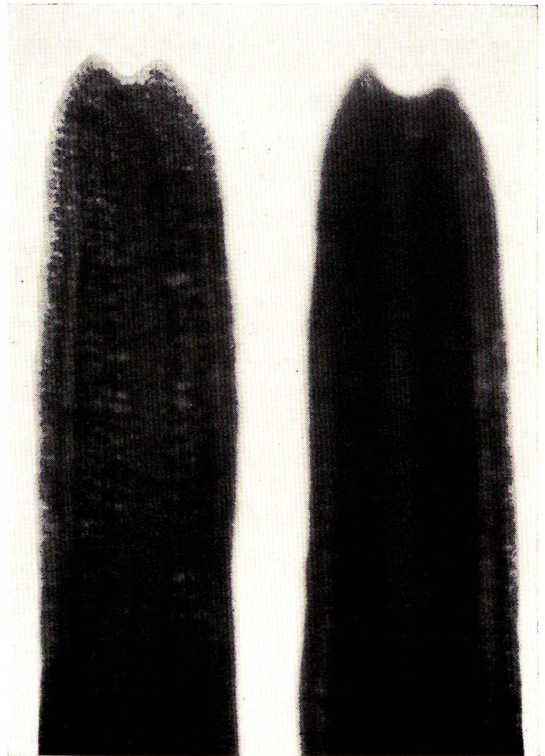


Fig. 4. The decolored status of Saghalien fir needles.

Left; wholly decolored needle
Right; non decolored one

した。脱色状態を、脱色なし、1部分脱色、大部分脱色、全体脱色の4段階に分けた。1部分脱色は脱色した部分のごくわずかなもので、葉の基部だけが脱色するものが多く、葉の先端、中肋ぞいの柔細胞が部分的に脱色するものもある。1部分脱色と全体脱色の間の脱色状態のものはすべて大部分脱色とした。脱色した部分の少ない葉ほど耐凍性が高まったものとみなした。

トドマツの若い葉は一般に -5°C 、35分間の凍結で凍死する。これより低い温度で、あるいはより長い時間凍結させた葉は脱色状態を観察するとともに、必要に応じて、これらの葉を低濃度の蔗糖液でしめらせた濾紙上にならべ、葉が変色しないか、膨圧をたもちつづけるか生長をおこなうかなど、短い場合でも1週間は観察をつづけ、凍害の有無を判定した。

他方貯蔵しておいた試料の70%メタノール溶液、あるいは水溶液を減圧、 $35^{\circ}\sim 40^{\circ}\text{C}$ で乾固し、実験結果の項で示す割合で水にとかして、内径10cmの素焼鉢にそだてたトドマツ苗木の地上部にガラス製の小型噴霧器で噴霧して、その耐凍性を高めることができるかどうかを調べた。毎回1鉢当たり約1.3ml、2日に1回、計5回の噴霧が標準である。また、1日に2~3度、水がしたたりおちない程度に、苗木に脱塩水を毎日噴霧した。鉢植えのまま低温にさらしたこともある。また、各試料を噴霧した鉢の苗木を、できるだけおなじ条件で低温にさらすために内径20×28cm、深さ5cmの木箱に斜植して実験したこともある。

低温にさらす前に、苗木に十分に水を噴霧し、所定の低温にたつする直前にも水を噴霧した。噴霧した水が凍結したことを確認した。

凍害の判定は、低温にさらしてから1週間以上たったのちにおこった。

実験結果

生重量で7gのトドマツの枝葉から70%メタノールで抽出し、この抽出物をピリジン・ブタノール・水で処理した上層部、下層部から得られた耐凍性物質をそれぞれ8%蔗糖液3mlにとかして1969年1月30日にトドマツ苗木の開いてまもない芽からとった若い葉にあたえた。なおピリジン・ブタノール・水で処理して得られた上層部は、これをできるだけ濃縮、抽出に用いた枝葉量とほぼ等量の水を加えて、生じた沈殿を濾過してとりのぞき、濾液を乾固し、8%蔗糖液にとかして使用した。

2個の芽からとった2組の葉を1個のペトリシャーレにならべ、低温にさらした。結果はTable 1である。

上層部、下層部の物質とも、トドマツの若い葉の耐凍性を高める。これらの物質をわずか1日ないし2日間しかあたえなかったこの実験では、どの凍結実験の結果をみても、上層部の物質が若い葉の耐凍性をより高めている。

生重量で7gのトドマツの枝葉から抽出したピリジン・ブタノール・水の上層部のアセトン可溶物質、不溶物質をそれぞれ8%蔗糖液3mlにとかして、1969年1月31日にトドマツの若い葉にあたえた。葉を凍結させてえた結果はTable 2である。

アセトン可溶物質, 不溶物質はともにトドマツの若い葉の耐凍性を高める作用がある。

トドマツの枝葉, 生重量で10gから抽出したピリジン・ブタノール・水の下層部のメタノール可溶物質, 不溶物質をそれぞれ10% 蔗糖液2.5mlにとかして, 1969年2月8日にトドマ

Table 1. Effects of substances of upper and lower layer shaken with P. B. W. on frost hardness (Exposed at -5°C for 30 min.)

Supplied for	1 days													
	Cont. Upper Lower			Cont. Upper Lower			Cont. Upper Lower			Cont. Upper Lower				
Decolored, Non	6			5			4		1		5		3	
Partly	3		1	1		1	2		1		4		4	
Mostly	3	3	10		3	6	10		5		9	5	3	5
Wholly	9		1		9	1		12		1	1	7		

Supplied for	1 days						2 days							
	Cont. Upper Lower		Cont. Upper Lower		Cont. Upper Lower		Cont. Upper Lower		Cont. Upper Lower		Cont. Upper Lower			
Decolored, Non							1		2		1		1	
Partly							3				5			
Mostly	10		4		4		1	4		4		1	6	8
Wholly	12	2	8	12	8	11	10		2		4	11	3	

Table 2. Effects of substances soluble and insoluble in acetone on frost hardness (Exposed at -5°C for 30 min.)

Supplied for	1 day												
	Cont. Sol. Insol.			Cont. Sol. Insol.			Cont. Sol. Insol.			Cont. Sol. Insol.			
Decolored, Non			1	1							3	3	
Partly			3	3			3	2			5	4	
Mostly	6	8	8		2	9	10		6	4	5		
Wholly	6				10				6				

Supplied for	2 days														
	Cont. Sol. Insol.			Cont. Sol. Insol.			Cont. Sol. Insol.			Cont. Sol. Insol.					
Decolored, Non					1			1	8	8		2		4	
Partly	1				3	1			3		2	7		4	
Mostly	2		5			7	8	7		1	2	4	3	3	
Wholly	12	9	7	12	1	3	4				8		1		

Table 3. Effects of substances soluble and insoluble in methanol on frost hardness (Exposed at -5°C for 30 min.)

Supplied for	1 day												
	Substances			Cont. Sol. Insol.			Cont. Sol. Insol.			Cont. Sol. Insol.			
Decolored, Non		3			4			6	2		1	10	4
Partly		1			2			1			3		5
Mostly	2	2	4	3	2	6	6	2	4	6			1
Wholly	8	4	6	7	2	4	4	1	4				

Supplied for	2 days												
	Substances			Cont. Sol. Insol.			Cont. Sol. Insol.			Cont. Sol. Insol.			
Decolored, Non		2			2	1	2	10	5		10		
Partly		2			2		3		3				4
Mostly	2	6	7	7	6	9	5		2	10			6
Wholly	8		3	3									

ツの若い葉にあたえた。葉を凍結させてえた結果は Table 3 である。

メタノール可溶物質、不溶物質はともにトドマツの若い葉の耐凍性を高めるが、不溶物質の作用は、この物質をわずか1日ないし2日間、葉にあたえただけでは、あまり強くない。

生重量で30gのトドマツの枝葉から70%メタノールで抽出した物質をピリジン・ブタノール・水の混合液で処理して得た上層部のアセトン可溶物質と不溶物質、および下層部のメタノール可溶物質をそれぞれ8%蔗糖液3mlにとかして、1969年3月15日にトドマツの若い葉にあたえた。葉をならべたペトリシャーレを電気冷蔵庫内においた。比較のために8%蔗糖液だけをあたえた葉をならべたペトリシャーレの一つは室内において対照とした。

なお、上層部アセトン可溶物質と不溶物質は、濾紙粉末をつめたカラムを用い、70%メタノールで、下層部メタノール可溶物質は70%メタノール、ついで水を流して溶出させ、耐凍性を高める分画を集め使用した。

葉を凍結させてえた結果は Table 4-1, 4-2 である。

メタノール可溶物質をあたえた葉以外の葉も Table 4-2 に示す凍結実験をおこなったが、いずれも12枚の葉全部が全体脱色であった。ただし例外として、室内においた対照の12枚の葉のうち1枚が過冷却したためか、 -7°C の凍結で脱色が見られなかった。すなわち害を全くうけなかった。

蔗糖だけあたえて $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ の電気冷蔵庫内においた対照の葉は室内においたものより、いくらか凍結にたいする抵抗性をますようである。このことが一般的な傾向であるかどうかは、差がでた、 -5°C 、40分間の凍結実験はただ1回だけしかおこなっていないから、なんともいえ

Table 4-1. Effects of substances soluble in methanol and substances soluble and insoluble in acetone on frost hardness*
(Supplied with these substances for 7 days and exposed at -5°C for 40 min.)

Decolored	Cont. put in room	Cont.	Soluble in methanol	in acetone	
				Soluble	Insoluble
Non			12		
Partly					5
Mostly		3		9	7
Wholly	12	9		3	

Table 4-2. Effects of substances soluble in methanol on frost hardness*

Supplied for	8 days	9 days	9 days	13 days	16 days
Exposed at	-5°C for 50 min.	-5°C for 60 min.	-5°C for 60 min.	-7°C^{**} for 35 min.	-8°C^{**} for 35 min.
Decolored, Non	12		7	1	
Partly			2	1	1
Mostly		12	2	8	10
Wholly			1	2	1

** Exposed at -5°C for 15 min. and at -7° or -8°C for 35 min.

ない。

アセトン可溶物質、不溶物質をあたえた葉は -5°C 、40 分間の凍結には部分的にたえられ
るが、この実験では -5°C 、50 分間の凍結にはたえられなかった。なお、アセトン可溶物質を
あたえた葉の基部は 1 週間後にはこの物質によって害をうけ死んだ。

メタノール可溶物質をあたえた葉は、日数がたつにしたがって耐凍性をますます増加し、
16 日後には -8°C 、35 分間の凍結に部分的にたえるようになる。また、この物質をあたえてか
ら 9 日目以後の凍結実験の結果では、大部分脱色では 1 枚の葉の中でもっとも耐凍性が弱い葉
の基部だけが脱色をまぬかれ、1 部分脱色では、ついで耐凍性が弱い葉の先端だけが脱色する
葉が多い。

アセトン可溶物質、不溶物質、メタノール可溶物質を添加した濾紙には、これらをあたえ
てから 2 週間目には、かなりのカビが発生し葉にも付着した。しかしこのため葉が枯死するこ
とがなかったので実験に用いた。カビの発生によって葉にあたえた物質がどのように変質した
かについてはわからない。

トドマツの枝葉、生重量でそれぞれ 30 g から抽出した物質をピリジン・ブタノール・水の

* これらの表は北方林業 245 号 (1969) にのせた。

混合液で処理して得た下層部のメタノール可溶物質を、それぞれ10%蔗糖液2.5mlにとかして、3個のペトリシャーレにならべたトドマツの若い葉に1969年4月13日にあたえた。電気冷蔵庫においた2個のペトリシャーレの1個には、メタノール可溶物質を水にとかしてフラスコに入れ、このフラスコを沸騰水につけ、この水溶液を7分間沸騰させて、乾固し、これを10%蔗糖液2.5mlにとかしてあたえた。葉を凍結させてえた結果はTable 5である。

Table 5. Effects of substances soluble in methanol on frost hardness*

Supplied for	Exposed at	Decolored	Cont. put in room	Substances soluble in methanol		
				put in room	put in refrigerator	boiled, put in refrigerator
4 days	-5°C for 40 min.	Non	12	9	12	12
		Partly		3		
		Mostly				
		Wholly				
5 days	-5°C for 50 min.	Non	12	10	12	12
		Partly		2		
		Mostly				
		Wholly				
6 days	-5°C for 60 min.	Non	12	12	12	12
		Partly				
		Mostly				
		Wholly				
9 days	-7°C** for 35 min.	Non	12	9	12	12
		Partly		3		
		Mostly				
		Wholly				
11 days	-8°C** for 35 min.	Non	12	4		
		Partly		2		
		Mostly		4		
		Wholly		2		
15 days	-10°C*** for 35 min.	Non	12		11	2
		Partly			1	3
		Mostly				6
		Wholly				1
16 days	-10°C*** for 35 min.	Non			10	4
		Partly			1	2
		Mostly			1	4
		Wholly				2

** Exposed at -5°C for 15 min. and at -7° or -8°C for 35 min.

*** Exposed at -5°C for 13 min., at -5°~-10°C for 2 min. and at -10°C for 35 min.

* この表の1部は文献9にのせた。

メタノール可溶物質を室内および電気冷蔵庫内であたえられたトドマツの若い葉は、5日後には -5°C 、50分間、6日後には -5°C 、60分間、9日後には -7°C 、35分間の凍結にたえるようになる。

メタノール可溶物質を室内であたえると、1週間目にはカビが発生し、9日目には濾紙上にひろがった。このため1組のトドマツの葉は菌害をうけ実験に用いられなかった。蔗糖液だけあたえたものにはカビは発生しない。冷蔵庫内であたえるとカビの発生はおくれる。また、メタノール可溶物質を高濃度であたえたこの実験では、トドマツの若い葉の伸長は強く抑制された。葉の基部は害をうけたが、とくに室内であたえた場合にいちじるしかった。

電気冷蔵庫においた葉の1部は15日および16日後には -10°C 、35分の凍結にたえた。 -10°C にさらした葉を低濃度の蔗糖液でしめらせた濾紙上にならべ、1週間観察した。物質をあたえてから15日後、4月28日に -10°C にさらした葉のうち、沸騰処理をしたメタノール可溶物質をあたえた葉では7枚、沸騰処理をしないものでは3枚が、5月5日でも緑色で膨圧をたもち、また葉の先端が腹面、すなわち気孔帯のある側にそりはじめた。4月29日に -10°C にさらした葉では、沸騰しないものをあたえた葉のうち5枚が伸長した。5月5日には葉にカビが附着していたから、死んだ葉が凍結によるのか、菌害によるのか明らかでない。

1969年5月21日に、北海道大学農学部演習林実験苗畑に植栽した約13年生のトドマツから、さかんに伸長している当年生枝を採集し、1月に採集した枝葉と同様に処理して、ピリジン・ブタノール・水の上層部のアセトン可溶物質と不溶物質、下層部のメタノール可溶物質と不溶物質に分けた。枝葉生重量で5月に採集した60g、1月の30gからとりだしたそれぞれの物質をそれぞれ10%蔗糖液2.5mlにとかして、5月22日に苗畑の開芽のおそいトドマツ苗木の芽からとった若い葉にあたえた。葉を凍結させてえた結果はTable 6である。

春および冬に採集した枝葉からとりだしたアセトン可溶物質、不溶物質とも、トドマツの若い葉の耐凍性を高めることができるが、その作用は不溶物質のほうが強い。春の半量の枝葉からとりだしたこれらの物質を、同じ量の蔗糖液にとかしてあたえたのにもかかわらず、耐凍性を高める作用は冬の枝葉からとりだしたものがいくらか強い。

冬の枝葉からとりだしたメタノール可溶物質の作用は、この2倍量の春の枝葉からとりだしたものにほぼ匹敵するが、メタノール不溶物質の場合は、春のものにくらべていちじるしくおとる。

ピリジン・ブタノール・水の下層部の物質にはカビが繁殖しやすく、とくにメタノール不溶物質にいちじるしい。冬の枝葉からとりだしたメタノール不溶物質をあたえた濾紙には3日後にカビが発生し、春の枝葉からのそれには4日後に発生した。

春および冬の枝葉からとりだしたアセトン可溶物質、メタノール可溶物質と不溶物質をこの実験のように高濃度であたえると、トドマツの若い葉の基部を害する。ただし、冬の枝葉からのメタノール不溶物質による害作用はそれほど強くなかった。また、アセトン可溶物質と不

Table 6. Effects of substances which were extracted from shoots and needles collected in spring and in winter on frost hardness

Date of collecting shoots and needles			Cont.	May 21st.				January			
Shaken with P.B.W.				Upper layer		Lower layer		Upper layer		Lower layer	
Substances				in acetone		in methanol		in acetone		in methanol	
			Sol.	Insol.	Sol.	Insol.	Sol.	Insol.	Sol.	Insol.	
Supplied for 2 days	Exposed at -5°C for 35 min.	Decoloring, Non	10	2		10 10		5		10 3	
		Partly		4				3		3	
		Mostly		6 4				7 2		4	
		Wholly		4				3			
3 days	-5°C for 40 min.	Non	10			10 3				10	
		Partly		1		2				7	
		Mostly		2		5		7		3	
		Wholly		9 8				10 3			
3 days	-5°C for 50 min.	Non				10				10	
4 days	-5°C for 54 min.	Non	10			8					
		Partly				2					
		Mostly									
		Wholly		10 10				10 10		10	
5 days	-5°C for 40 min.	Non	10								
		Partly									
		Mostly				6		2 10			
		Wholly		10 4				8			
6 days	-5°C for 40 min.	Non	10 10	1				1 2			
		Partly		1 3				3 9 5			
		Mostly		4 3 9 7				10 6 1 3			
		Wholly		6 5 1							
6 days	-5°C for 60 min.	Non				10 7				8	
		Partly									
		Mostly				3				2	
		Wholly								10	

溶物質の葉の伸長を抑制する作用は、メタノール可溶物質と不溶物質にくらべるといじめるしく弱い。

1971年8月29日に、北海道大学苫小牧地方演習林の林齢22年のトドマツ造林木から当年生枝を採集し、1月に採集した枝葉と同様に処理して、アセトン可溶物質と不溶物質をとりだした。生重量で8月に採集した30gおよび60g、1月に採集した30gの枝葉からとりだしたそれぞれの物質をそれぞれ10%蔗糖液2.5mlにとかして、1972年1月17日にあたえた。葉

を凍結させてえた結果は Table 7 である。

この実験では、トドマツの若い葉の耐凍性におよぼす効果は、8月の枝葉とこの半量の冬の枝葉からとりだしたそれぞれの物質ではほとんどおなじであった。また、8月の枝葉 60 g からとりだしたアセトン可溶物質と、30 g からとりだしたアセトン不溶物質の作用もほぼおなじである。

ピリジン・ブタノール・水の上層部の物質は、長期間これをあたえても、これまでの実験では、トドマツの若い葉の耐凍性を -5°C 、50 分間の凍結にたえるまで高めることができなかつた。この実験では、アセトン不溶物質を 16 日間あたえたトドマツの若い葉は -5°C 、60 分間の凍結に 10 枚中 4 枚が完全にたえ、アセトン可溶物質をあたえた葉も部分的にたえている。

Table 7. Effects of substances soluble and insoluble in acetone which were extracted from shoots and needles of 30 or 60 g collected in late summer and in winter on frost hardness

Date of collecting shoots and needles			Cont.	August 29th				January	
Substances				Soluble		Insoluble		Soluble	Insoluble
Supplied for	Exposed at	Decoloring		30 g	60 g	30 g	60 g	30 g	30 g
5 days	-5°C for 40 min.	Non				2	5		4
		Partly			1	2	1		1
		Mostly	4	8	5	5	4	6	5
		Wholly	6	2	4	1		4	
7 days	-5°C for 40 min.	Non			1	1	3	1	1
		Partly			1		7		1
		Mostly	2	2	5	5		6	8
		Wholly	8	8	3	4		3	
12 days	-5°C for 50 min.	Non							
		Partly							
		Mostly			1	2	7	1	6
		Wholly	10	10	9	8	3	9	4
14 days	-5°C for 50 min.	Non					1		1
		Partly							1
		Mostly			2	2	5	2	3
		Wholly	10	10	8	8	4	8	5
15 days	-5°C for 60 min.	Non					2		1
		Partly					2		2
		Mostly				3	5		6
		Wholly	10	10	10	7	1	10	1
16 days	-5°C for 60 min.	Non					4		4
		Partly				1	3		5
		Mostly			8	7	2	7	1
		Wholly	10	10	2	2		3	

Table 8-1. Effects of substances soluble and insoluble in methanol which were extracted from shoots and needles of 30 or 60 g collected in late summer and in winter on frost hardness

Date of collecting shoots and needles			Cont.	August 29th				January	
Substances				Soluble 30 g	60 g	Insoluble 30 g	60 g	Soluble 30 g*	Insoluble 30 g
Supplied for 5 days	Exposed at -5°C for 40 min.	Decolor- ed, Non	7 3	10	10	3	4	10	4
		Partly				2	3		3
		Mostly Wholly				5	3		3
7 days	-5°C for 60 min.	Non	10	4	8			8	
		Partly		4	1			2	
		Mostly		2	1				10
		Wholly				10	10		
10 days	-5°C for 60 min.	Non	10	8	9	1		10	
		Partly		1	1				
		Mostly		1		3	2		3
		Wholly				6	8		7

Table 8-2. Effects of substances soluble in methanol on frost hardness

Suppli- ed for	Exposed at	Decolor- ed	August 30 g	60 g	Jan. 30 g*
14 days	-7°C** for 45 min.	Non		10	10
		Partly		8	
		Mostly		2	
		Wholly			
18 days	-10°C*** for 35 min.	Non		10	10
		Partly		6	
		Mostly		4	
		Wholly			
19 days	-20°C**** for 35 min.	Non			2
		Partly			1
		Mostly	1	8	7
		Wholly	9	2	

Table 8-3. Effects of substances insoluble in methanol on frost hardness

Suppli- ed for	Exposed at	Decolor- ed	August 30 g	60 g	Jan. 30 g
14 days	-5°C for 60 min.	Non			
		Partly			
		Mostly			
		Wholly	10	10	10
17 days	-5°C for 60 min.	Non			
		Partly			
		Mostly	3	3	10
		Wholly	7	7	
18 days	-5°C for 60 min.	Non	6	9	8
		Partly	4	1	2
		Mostly			
		Wholly			

** Exposed at -5°C for 15 min. and at -7°C for 45 min.

*** Exposed at -5°C for 10 min., at -5~-10°C for 5 min. and at -10°C for 35 min.

**** Exposed at -7°C for 15 min., at -7~-20°C for 13 min. and at -20°C for 35 min.

* 1月の枝葉からとりだしたメタノール可溶物質の結果は文献11にのせた。

生重量で8月に採集した30gおよび60g、1月に採集した30gの枝葉からFig. 1に示す方法でとりだしたメタノール可溶物質と不溶物質をそれぞれ10%蔗糖液2.5mlにとかして、1972年1月15日にあたえた。葉をならべたペトリシャーレを1月25日まで電気冷蔵庫に入れ後室内においた。当該物質をとかした液を2度とりかえ、そのたびに葉を有機水銀剤で殺菌した。葉を凍結させてえた結果はTable 8-1, 8-2, 8-3である。

メタノール可溶物質の耐凍性を高める作用は、1月の枝葉30gからとりだしたものと、8月の枝葉60gからとりだしたものでは、ほとんど差がない。これらの物質をあたえられたトドマツの若い葉は18日後には、 -10°C の凍結に完全にたえる。葉の脱色状態の観察では、19日後には大部分ないし全部の葉が -20°C の凍結に少なくとも部分的にたえることがわかる。 -20°C の低温にさらしたこれら2組の葉を、3~4%の蔗糖液でしめらせた濾紙上にならべて観察した。葉長を測定しなかったので、伸長したという明らかな証拠をあげることはできないが、観察を中止した3月25日、すなわち -20°C にさらしてから50日後にも、それぞれの10枚の葉は緑色で膨圧をたもち、死んだ徴候はまったく認めることができなかった。

8月の枝葉30gからとりだしたメタノール可溶物質をあたえても、18日後には、トドマツの若い葉の半数以上が -10°C の凍結に部分的にたえる。 -20°C の低温にさらした後の観察はこの葉ではおこなわなかった。

メタノール不溶物質をあたえた結果はまちまちで、8月と1月の枝葉からとりだした当該物質の作用をくらべることはむずかしい。これらの物質をあたえられたトドマツの若い葉の大部分は、18日後には -5°C 、60分間の凍結に少しも害をうけることなく、たえられるようになった。

ピリジン・ブタノール・水で処理して得た下層部の物質は上層部の物質より耐凍性を高める作用が強く、また、下層部のメタノール可溶物質は不溶物質よりも、その作用が強い。8月と1月に採集した枝葉からとりだしたメタノール可溶物質をFig. 1に示す順序で同じように精製して、試料1と試料2をえた。生重量で8月の枝葉50gおよび100g、1月の枝葉50gからとりだし精製したこれらの物質をそれぞれ10%蔗糖液2.5mlにとかして、1972年1月21日にあたえた。葉を凍結させてえた結果はTable 9である。

1月の枝葉から精製した試料1の耐凍性を高める作用は、この倍量の8月の枝葉からのそれに匹敵するか、やや強いようである。この物質をあたえられたトドマツの若い葉は、12日後には -5°C 、60分間の凍結に完全にたえ、13日後には -7°C 、35分間の凍結に部分的にたえるようになる。

1月の枝葉50gから精製した試料2の耐凍性を高める作用は、8月の枝葉50gと100gからのそれぞれの作用とくらべると、50gから精製したものの作用にちかいようである。

1月に採集したトドマツの枝葉、生重量で80gから抽出、精製した試料1、試料2、試料3をそれぞれ10%蔗糖液5mlにとかして、1970年5月21日に各試料ごとに2個のペトリシ

ャーレにならべられたトドマツ、エゾマツ、アメリカトガサワラの若い葉にあたえた。なお、この実験で用いた試料3は70%メタノールで展開、Rf 0.4~0.65の分画をとりだしたものである。トドマツとエゾマツの葉は苗畑で養成している4年生苗木からとった。アメリカトガサワラの葉は苗畑にうえられた約15年生の植栽木からとった。葉を凍結させてえた結果はTable 10である。

Table 9. Effects of sample 1 and 2 which were extracted and purified from shoots and needles of 50 or 100 g collected in late summer and in winter on frost hardness

Date of collecting shoots and needles			Cont.	August 29th				January		
Sample				Sample 1 50 g 100 g	Sample 2 50 g 100 g	Sample 1 50 g	Sample 2 50 g			
Supplied for 8 days	Exposed at -5°C for 40 min.	Decolored,		8		1		8	1	
		Non		1		1	1	1		
		Partly		2	8	2	5	8	1	5
		Mostly		8	1		5			3
10 days	-5°C for 40 min.	Non		9				9		
		Partly			1		1			
		Mostly		10	8		5	8		5
		Wholly			2		5	2		5
10 days	-5°C for 50 min.	Non		10				9		
		Partly		5	9		4	6		4
		Mostly		5	1		6	4	1	6
		Wholly								
11 days	-5°C for 60 min.	Non		1				7	1	
		Partly			2		1			
		Mostly		10	8	7	4	10	2	2
		Wholly				2	5		1	7
12 days	-5°C for 60 min.	Non		8				10	2	
		Partly					2			
		Mostly		10	5			8		3
		Wholly			5		10			5
13 days	-5°C for 60 min.	Non				1				
		Partly					3			
		Mostly		10			1	6		1
		Wholly					9			9
13 days	-7°C* for 35 min.	Non						1		
		Partly					1			
		Mostly					5		7	
		Wholly			10	4			2	

* Exposed at -5°C for 13 min. and at -7°C for 35 min.

Table 10. Frost hardness of young needles of each tree species supplied with each sample*

Supplied for	Exposed at	Decolored	<i>Abies sachalinensis</i>			<i>Pseudotsuga taxifolia</i>			<i>Picea jezoensis</i>						
			Cont.	Sample		Cont.	Sample		Cont.	Sample					
				1	2	3		1	2	3		1	2	3	
4 days	-5°C for 40 min.	Non		2				1		1		2	10	6	4
		Partly						1						3	4
		Mostly		8	5	6		4	3			2		1	2
		Wholly	10		5	4	10	4	7	9	6				
5 days	-5°C for 40 min.**	Non		6				10	1			10	1	6	
		Partly												2	4
		Mostly		4	3	3			1	2		2		5	
		Wholly	10		7	7	10		8	8	8	8		2	
6 days	-5°C for 50 min.***	Non			1			7				10	1	1	
		Partly												3	
		Mostly		7	1	2		2	1			1		4	6
		Wholly	10	3	8	8	10	1	9	10	9		5		
7 days	-5°C for 50 min.****	Non			1					1			4		
		Partly		4				3				3		2	
		Mostly		6	4	4		4		1		3	6	4	
		Wholly	10		5	6	10	3	10	8	10		4	4	

** The young needles of *Picea jezoensis* were exposed at -5°C for 50 min.

*** The young needles of *Picea jezoensis* were exposed at -5°C for 60 min.

**** The young needles of *Abies sachalinensis* and *Pseudotsuga taxifolia* supplied with sample 1 were exposed at -5°C for 60 min.

The young needles of *Picea jezoensis* were exposed at -5°C for 15 min. and at -7°C for 40 min.

耐凍性を高める作用がもっとも強いのは試料1である。試料1を7日間あたえられたトドマツの葉は -5°C, 60分間の凍結に10枚中10枚が部分的にたえ、アメリカトガサワラの葉は10枚中7枚が部分的にたえる。エゾマツの場合には -7°C, 40分間の凍結にも4枚の葉は全く害をうけず、残り6枚の葉も部分的にたえる。試料2, 試料3もエゾマツの若い葉の耐凍性を高める作用は強い。しかし、アメリカトガサワラの場合には、試料2, 試料3の耐凍性を高める作用はごくわずかで、-5°C, 40分間の凍結で対照と差がでる程度であり、若い葉の耐凍性を -5°C, 50分間の凍結にたえるまで高めることはできなかった。また、開芽季の葉の耐凍性は樹種によってことなり、エゾマツの若い葉はトドマツのそれより耐凍性は高い。

苗畑の苗木あるいは植栽木から葉をとったためか、これらの試料をあたえてから4日後にはカビが発生し、7日後には濾紙上にひろがった。普通カビの発生しない、蔗糖だけをあたえた対照にもカビがいくらか発生した。これらの試料をあたえると、エゾマツの葉がその基部に

* この表の1部は文献10にのせた。

もっとも強く害をうけ、また、トドマツの葉の場合とことなり、試料2の害作用がもっとも強かった。これらの試料による葉の基部の害は、3樹種のうちではトドマツがもっとも少なかった。

トドマツの枝葉、生重量で100gから抽出、精製した各試料をそれぞれ10%蔗糖液5mlにとかして、1971年6月19日に各試料ごとに2個のペトリシャーレにならべられた下記のモミ属の各樹種の葉にあたえた。アオモリトドマツ、シラベ、ウラジロモミの葉は、苗畑にうえられた約15年生の植栽木の開芽のおそい木から採集した。トドマツの葉は、冬の乾燥害のために、開芽のとくにおくれた接木した木から採集した。葉を凍結させてえた結果はTable 11である。

4回の凍結実験の結果はかなりばらついているが、耐凍性を高める作用は、トドマツ以外のモミ属の3樹種にたいしても試料1'がもっとも強く、また、この実験では試料2'と試料4'の作用はほぼおなじ強さである。ただし多くの実験結果から判断すると、トドマツの若い葉の耐凍性を高める作用は試料4'が試料2'より強いようである。前掲のTable 10に示した他属の樹種にあたえた場合とことなり、同属のモミ属の樹種には、各試料の耐凍性を高める作用はトドマツにあたえた場合とほぼ同様の傾向が認められる。

この実験では、蔗糖だけをあたえた対照の葉にも、 -5°C 、40分間の凍結に完全あるいは

Table 11. Frost hardiness of young needles of each fir species supplied with each sample

Supplied for	Exposed at	Decolored	<i>Abies sachalinensis</i>				<i>Abies Mariesii</i>				<i>Abies Veitchii</i>				<i>Abies homolepis</i>													
			Cont.	Sample 1'	Sample 2'	Sample 3'	Sample 4'	Cont.	Sample 1'	Sample 2'	Sample 3'	Sample 4'	Cont.	Sample 1'	Sample 2'	Sample 3'	Sample 4'	Cont.	Sample 1'	Sample 2'	Sample 3'	Sample 4'						
5 days	-5°C for 40 min.	Non	1	8	4	2	5	1	9	7	3	3	2	1														
		Partly	1	1	2	3	4	2	1	3	2	2	1	1														
		Mostly	6	1	2	4	1	3		5	5	1	6	4	2	1	1	5	4	4	1							
		Wholly	2		1	1	4					9	1	6	6	9	9	4	6	6	9							
5 days	-5°C for 40 min.	Non		3	4	1	3	1	1				2	4	2					2								
		Partly	1	7	2	3	2		1	1	1		1							1	2							
		Mostly	7		4	4	4	1	6	6	3	7	2	6	8	5	7		9	5	8	5						
		Wholly	2			2	1	8	2	3	6	3	6	1	3	3	10		1	2	4							
6 days	-5°C for 40 min.	Non	1	6	10	8	9	1	10	8	3	8	6	6	1	6					2	3	2					
		Partly	3	1		1	1		1	2				4	2	3	3					2	2	1	1			
		Mostly	5	2		1	3	1	5	2	2	2	5	1					1	6	5	5	6					
		Wholly	1					6				8		1					9				4	1				
6 days*	-5°C for 50 min.	Non		3	2					3		3	1	2									1					
		Partly		7	3	1		1		1		4	3	2	4					1	1		5					
		Mostly	1		4	7		6	8	2	7		3	5	3	2					9	5	4	3				
		Wholly	9		1	10	2	10		2	8	2	10		2	4	2	10				4	6	1				

* 試料を6日間給与、 -5°C に50分さらした結果は文献11にのせた。

部分的にたえる葉がみられた。これらモミ属の4樹種の開芽してまもない芽からとった若い葉の耐凍性は、高緯度地方あるいは高海拔地を郷土とする樹種ほど強い傾向がみられた。

試料1, 試料2, 試料3をトドマツ1年生苗木に噴霧して, 苗木の耐凍性を高めることができるかどうかを調べた。なお, 試料3は Fig. 1 で示した試料3を, 濾紙粉末をつめたカラムを用い, イソブタノール・メタノール・水 (4:1:2 容積比) で展開し, Rf 0.15~0.4 の分画をとりだして用いた。

各試料ともトドマツの枝葉, 生重量で15gから抽出, 精製した量を, 水1mlの割合でとがして噴霧した。噴霧量は毎回, 内径10cmの素焼鉢当たり約1.3mlである。1970年6月3日からはじめて6月11日まで1日おきに計5回噴霧した。また, これらの試料の吸収を促進できるかもしれないと考えて, 毎日, 1日に2~3回, 葉から水がしたたりおちない程度に水を噴霧して, 葉をぬらした。対照の苗木にも水を噴霧した。

苗木を鉢植えのまま恒温恒湿室に入れた。低温にさらす前と所定の低温にたつする直前に苗木に水を噴霧して苗木を過冷却させないよう注意した。恒温恒湿室の温度を約15分間で -5°C まで下げ, 所定の時間 -5°C に苗木をさらした後, 約5分間で 0°C まで温度をあげ鉢を室外にだした。結果は Table 12 である。

試料1, 試料2, 試料3を噴霧した苗木は, -5°C , 30分間ではほとんど凍害をうけない。 -5°C に35分間さらした6月12日の結果では, 各試料をあたえた苗木と対照の苗木の凍害のちがいは少ない。6月13日の結果では試料2, 6月14日の結果では試料3をあたえた苗木の凍害は多いが, 全体としては, これらの試料をあたえると, 苗木の凍害は少なくなるというよい。

トドマツの枝葉, 生重量で20gから抽出, 精製した各試料を水1mlの割合でとがして, 鉢植えのトドマツ1年生苗木に噴霧した。苗木は内径10cmの各素焼鉢当たり12~13本である。

Table 12. Frost damage of seedlings exposed to low temperature*

Exposed at	Date exposed	No. of seedlings	Cont.	Sample 1	Sample 2	Sample 3
-5°C for 30 min.	June 12th	used injured	12 5	11 1	12 —	11 —
	June 13th	used injured	12 3	13 —	13 —	12 —
-5°C for 35 min.	June 12th	used injured	12 9	13 8	13 6	13 7
	June 13th	used injured	13 8	13 2	11 9	13 2
	June 14th	used injured	13 7	13 —	13 1	11 8

* この表は文献10にのせた。

1972年6月5日からはじめて6月13日まで1日おきに計5回のほか6月17日と19日にも噴霧した。噴霧量は毎回、各鉢当たり約1.3 mlである。

低温にさらす1~2日前に各鉢の苗木を内径20×28 cm、深さ5 cmの木箱にうつし、斜植した。1個の木箱当たり、対照および各試料をあたえた苗木をそれぞれ12本ずつ、計60本を移植した。各列ごとに対照、各試料をあたえた苗木を2本ずつ計10本とし、6列にならべた。それぞれの列では、おなじ処理をした苗木をはなしてならべ、それぞれの列のおなじ処理をした苗木を結ぶ線は、木箱の辺にたいしてななめの位置をとるように移植した。斜植した苗木が垂直になるよう木箱をかたむけて低温にさらし、それぞれの苗木ができるだけ均等に冷たい風をうけるようにした。

低温にさらした時の処置、その他はTable 12の実験に用いた方法とおなじである。

Table 13には凍害をうけた苗木の本数だけをのせたが、低温にさらした苗木は、対照、各試料をあたえた苗木、毎回それぞれ12本ずつである。

試料1'と試料4'をあたえた苗木の凍害は対照にくらべていちじるしく少ない。また、-5°Cに30分間、35分間、40分間さらした時の凍害本数のあらわれかたから、試料1'と試料

Table 13. Frost damage of seedlings exposed to low temperature

Exposed at -5°C	Date exposed	Cont.	Sample 1'	Sample 2'	Sample 3'	Sample 4'
		No. of seedlings injured				
30 min.	June 21st	5	2	1	3	1
30 min.	June 21st	3	—	1	3	1
35 min.	June 22nd	5	1	4	3	1
40 min.	June 23rd	6	—	3	1	1

Table 14. Rf values of each sample that makes the young needles of Saghalien fir frost hardy**

Solvent	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
70% methanol	0.6~0.7	0.7~0.8	0.4~0.5	0.7~0.8
Water	0.8~0.9	0.8~0.9	0.8~0.9*	about 0.9
IP. M. W. 4:1:2 v/v	0.6*~0.7	0.7~0.8	0.2~0.3	0.5~0.6*
P. B. W. 3:4:7 v/v	about 0.5	0.8~0.9	0.4~0.5	0.4*~0.5
A. B. W. 3:1:2 v/v	0.5~0.6*	0.8~0.9*	0.4~0.5	about 0.4
IB. M. W. 4:1:2 v/v	0.1~0.2*	0.5~0.6*	0.1~0.2*	0.1~0.2*
B. Ac. W. 4:1:5 v/v	0.0~0.1*	0.7~0.8	0.0~0.1*	0.0~0.1*
IP. Am. W. 10:1:1 v/v	0.2~0.3	0.8~0.9	about 0.05	about 0.05

* Young needles become more efficiently frost hardy on marked side.

** この表は文献11にのせた。

4'の苗木の耐凍性を高める作用はかなり強いと考えてよい。たまたま凍害を受けた苗木はなんらかの理由で、これらの試料を十分に吸収できなかったか、あるいは苗木体内で比較的速くこれらの試料がこわされた苗木にかぎられると考えられるからである。試料2'と試料3'をあたえた苗木の凍害は試料1'と試料4'をあたえた場合に比べてかなり多いが、それでも対照にくらべると約半分である。

濾紙を用い、各種の溶媒で展開し、トドマツの若い葉の耐凍性を高めるRf値を調べた結果はTable 14である。

40×40 cmの濾紙1~3枚に試料を帯状にしみこませた。用いた試料の量は多くの場合、枝葉生重量で50 gから抽出、精製した量に相当する。展開は室内でおこなった。これをそれぞれ10%蔗糖液2.5 mlにとかしてあたえた。試料として試料1', 2', 3', 4'を用いたが、展開溶媒としてブタノール・酢酸・水とイソプロパノール・アンモニア・水を用いた実験では、試料1'', 2'', 3'', 4''を使用した。

各試料をそれぞれの溶媒で展開したときに、若い葉の耐凍性を高めるRf値が、0.1きざみの2つの連続したRf値帯にあらわれることがある。この2つのRf値帯の作用がほぼ等しい場合には、再度展開をおこない濾紙をRf値で0.05だけづらして切りきざみ、実験をくりかえして耐凍性を高めるRf値を決定した。この2つのRf値帯の作用にいくらか差があるときには、耐凍性を高めるRf値は、強い作用をもつRf値帯の中でも、これより弱い作用をもつRf値帯側にかたよっているものとした。

考 察

植物の耐凍性に関与する物質として、これまでにいろいろな物質がとりあげられた。これらの物質は、自然条件下あるいは人工処理のもとで、植物の耐凍性の増加ないし減少にともなって、平行的に量的変動を示すという理由でとりあげられたものが多い。しかし、植物の耐凍性と物質との密接な因果関係をより明らかに示すためには、植物体からとりだした物質を、おなじ種の植物にあたえて、その耐凍性を時期をとわず、自由に高められることが必要である。こんなわけで、厳冬季に採集したトドマツの枝葉からとりだした物質を、トドマツの若い葉、生育期間中のトドマツの苗木にあたえて、その耐凍性を人為的に高めることができるかどうかを調べたのである。

また、おなじ属のアオモリトドマツ、シラベ、ウラジロモミ、属をことにするエゾマツ、アメリカトガサワラに対する作用も調べた。これらの樹種の1個の芽からは、1回の凍結実験に必要な数の葉がえられ、また、葉はいずれも扁平なので、凍結させたのちの凍害の有無を葉の脱色状態を観察することで比較的簡単に判定できる。このことも、これらの樹種の葉を実験に用いた理由の1つである。

トドマツの枝葉をできるだけ1月中旬に採集するようにした。おそくとも採集を1月中に

おわるようにした。トドマツの自然条件のもとでの耐凍性²⁾は2月中旬には低下の傾向をみせはじめ、この冬芽はこの時期には -35°C 、8時間の凍結にたえられなくなるからである。

トドマツの耐凍性物質をこの実験のように生物学的方法で追跡する場合には、用いる物質の量が少なくてすむほど、また、あたえた物質の効果をできるだけ簡単な方法で、短時間に判定できるほど好都合である。開いてまもない芽からとったトドマツの若い葉はこの条件に合致した。

苗畑で養成した3年生以上のトドマツ苗木の頂芽や輪生芽からは、形や長さのことなる芽の基部、先端に着生する葉をのぞいても、1個の芽から1回の凍結実験に十分な数の100枚前後の葉がえられる。輪生芽の腹面と脊面に着生する葉では、葉の長さにくらかのちがいがあがるが、実験に用いる数が少なくてすむときは、腹面に着生する葉だけを用いれば、ほとんどおなじ長さの葉がえられる。実験にはできるだけ長さ10 mm前後、幅1 mm未満の葉をもちいるようつとめた。これらの葉は蔗糖液でしめらせた濾紙上におくと伸長するし、また、数カ月生きつづける。

葉を凍結させるまえに、それぞれの物質をあたえた葉を1個のペトリシャーレにうつし、実験材料および方法の項で述べたごとく、できるだけ等しい条件で低温にさらすように葉をならべたし、また、1回の凍結実験には1個の芽からとった葉だけを用いたから、凍害の有無ないし多少は、あたえた物質の作用だけによって決定されたと考えてよく、また、微細な耐凍性のちがいも検出できる。トドマツの扁平な若い葉はそのままの形で顕微鏡下で葉の脱色状態を観察できる。凍結の結果、脱色したトドマツの若い葉、脱色した部分は3~4日たつと白茶けて、凍死したことが明らかになるから、低温にさらした後、すぐに葉の脱色を観察するだけで凍害の有無を推測できる。

蔗糖だけあたえた葉の凍死の限界温度、限界時間は、温度をかなり正確に調整できる田葉井製作所製恒温恒湿室を用いた実験では -5°C 、35分間である。この温度、時間の凍結で脱色のみとめられなかった葉、また葉の部分はいつまでも脱色しない。しかし、これより低い温度あるいは長い時間の凍結の場合には、脱色のみとめられなかった葉でも、1昼夜経過後、顕微鏡をとらしてみた葉の色調は、凍結前、凍結融解直後のそれとことなり、脱色した葉と似た色あい呈する葉があらわれる。しかし、凍結融解直後の顕微鏡観察で脱色していなかった葉は蔗糖液でしめらせた濾紙上にならべておくと、肉眼的には長い場合には50日間の観察期間中緑色で、膨圧をたもち、また、1週間目くらいから生長したと判定できる葉もあらわれる。こんなわけで、時々確かめているが、 -8°C までの凍結温度、60分間までの凍結時間の場合には、凍結融解直後の脱色の如何で凍害の有無を判定している。 -10°C 以下の低温で凍結した場合には、葉の脱色と凍死とは正確には一致しない。

秋に鉢植えし、野外においたトドマツ苗木は、12月下旬に温室に入れると、自然日長下でも、約2週間で開芽する。この時期に温室に入れた苗木のなかには、早く再び芽を作るものも

あるが、実験に適当な長さの葉がえられる程度にだけは、芽は伸長する。1月に入れた苗木の芽はいずれも正常に伸長する。温室内の日長を長くする操作はおこなわなかった。

ペトリシャーレに入れて室内におかれた葉は、日によってことなる長さの日長をうけたがこのことによって、実験になんらかの影響があったとは考えられない。

厳冬季のトドマツ造林木の枝葉から70%メタノールで抽出してとりだし、ピリジン・ブタノール・水で処理して得た上層部のアセトン可溶物質と不溶物質はTable 7に示す実験では、トドマツの若い葉の耐凍性を -5°C 、60分間の凍結に部分的に、1部は完全にたえるまで高めることができたが、その作用は下層部のメタノール可溶物質と不溶物質、とくに可溶物質にくらべるといちじるしく弱い。しかし、Table 1の実験結果から明らかなごとく、ピリジン・ブタノール・水の上層部の物質は低濃度で1日ないし2日の短期間あたえた場合には、下層部の物質よりも、若い葉の脱色をかなり少なくする。また、上層部のアセトン可溶物質の耐凍性を高める作用は、Table 2の実験のごとく、低濃度で短期間あたえた場合には、アセトン不溶物質とおなじか、むしろ強い。しかし、高濃度で長い期間にわたってあたえ、それぞれの日時に凍結実験をおこなったTable 6、Table 7の結果では、アセトン不溶物質の作用はいずれも可溶物質のそれよりかなり強く、わずかに2日間の給与の場合にも明らかな差がみられる。これらの結果をあわせ考えると、上層部のアセトン可溶物質は低濃度でも速効的な作用をもつが、これをあたえた時間の経過とともに葉の耐凍性が増加するという現象はあまりない。この物質が若い葉の中に大量に入りづらいのか、また、こわされやすいため蓄積されることが少ないのか、この物質のもつ耐凍性増進効果に限度があるのかなどについてはわからない。

Table 4、Table 5、Table 6、Table 8その他で明らかなごとく、ピリジン・ブタノール・水の下層部のメタノール可溶物質は、これをあたえた時間の経過とともに、若い葉の耐凍性をますます増加させる。トドマツの若い葉の耐凍性は、葉の基部がもっとも弱く、ついで葉の先端、中肋ぞいの細胞が弱い。しかし、メタノール可溶物質をあたえると、まず葉の基部の耐凍性ももっとも高まり、徐々に葉の先端におよぶ。メタノール不溶物質をあたえた場合にもこの傾向がみられる。メタノール可溶物質は、葉中での動きはおそいが、順次多量に蓄積され、効果を発揮するものと考えられる。また、トドマツの若い葉は、葉の表皮をとうしてよりは、葉の基部の傷口からこれらの物質をより多く吸収するものと考えてよい。

ピリジン・ブタノール・水の下層部のメタノール可溶物質を、できるだけカビの繁殖を抑制するよう処置して19日間あたえると、トドマツの若い葉の耐凍性を -20°C 、35分間の凍結に十分たえられるまで高めることができる。凍結融解直後の脱色状態の観察では、大部分の葉が1部分脱色ないし大部分脱色であったが、これらのそれぞれ10枚の葉を蔗糖液でしめらせた濾紙上にならべて、50日間観察をつづけたが、いずれの葉も凍死した徴候はまったく認められなかった。酒井はクチナシの葉に人工的に糖を入れて、その耐凍性を -20°C の凍結にたえるまで高めることができた¹²⁾。しかし、生長中の枝や未成熟の枝には人工的に糖を増加させて

も、耐凍性がほとんど高まらないことから、生物が凍結にたえるようになるためには、ある種の原形質構造の確立が不可欠であると述べている¹⁴⁾。この実験に用いたのは、開いてまもない芽からとった、さかんに伸長をつづける葉である。このような葉であっても、耐凍性物質をあたえさえすれば、いつでも自由にその耐凍性をいちじるしく高めることができることを、この実験の結果は明らかに物語っている。

トドマツの枝葉からとりだした物質を、あまり精製しないであたえた場合には、かならずカビが発生、繁殖した。このためこれらの物質を1週間以上にわたってあたえるときには、普通、葉をならべたペトリシャーレを電気冷蔵庫内においた。物質の精製をつづける過程で、カビは主として葉の耐凍性を高める分画に発生、繁殖した。精製した試料でもカビが発生することがあり、とくに試料3、試料4には発生しやすい。カビが発生することによって若い葉にあたえた試料がどのように変質するかについては調べていない。

葉を蔗糖液でしめらせた濾紙上にならべたのは、室内の窓ぎわにおいた場合でも光が弱く炭酸同化作用が十分ではないから、葉は呼吸の基質として糖を必要とすると考えたからである。10%蔗糖液をあたえただけでは若い葉の耐凍性を高めることはできないが、トドマツの枝葉からとりだした物質と糖の間には相乗作用があるかもしれない。このことを確かめるため、二、三の簡単な実験をこころみたが失敗した。炭酸同化作用に必要な明るい場所に、葉をならべたペトリシャーレをおくと、シャーレ内の水分の調節がむずかしかったからである。冬に採集した枝葉、生重量で30gからとりだしたピリジン・ブタノール・水の下層部のメタノール可溶物質を10%蔗糖液2.5mlにとかすと、液の濃度はいちじるしく高い。この液の場合とほとんど同様に若い葉の伸長を抑制する30%蔗糖液をあたえて実験した。30%蔗糖液だけをあたえた場合は、葉の伸長を強く抑制するが、葉の基部に害をあたえることはない。1969年5月29日にあたえて、5月30日から6月2日までの間に6回の凍結実験をおこなった。ピリジン・ブタノール・水の上層部のアセトン不溶物質、下層部のメタノール可溶物質と不溶物質をあたえた葉は、6月1日と6月2日には -5°C 、50分間の凍結に部分的にたえたが、30%蔗糖液をあたえた葉は10%蔗糖液をあたえた対照のものと同様、いずれも10枚中10枚が完全に凍死した。5月30日の -5°C 、35分間の凍結では10枚中6枚が完全に凍死し、5月30日、31日、6月1日の -5°C 、40分間の凍結では、10枚全部あるいは10枚中9枚が完全に凍死し、10%蔗糖液をあたえた対照のものと同様、この実験の結果から、少なくとも蔗糖だけでは、その濃度の如何にかかわらず、若い葉の耐凍性を高めることができないことは明らかである。

なお、試料1、試料2、試料3のあいだに相乗効果があるかどうかについても実験した。20gの枝葉からとりだした各試料を2試料ずつ組合せ、また40gの枝葉からとりだした各試料を単独に10%蔗糖液2.5mlにとかして、それぞれ3組ずつのトドマツとエゾマツの若い葉に1970年5月10日にあたえた。蔗糖液だけあたえた対照1個を加え、用いたペトリシャーレは計7個である。葉を凍結して調べたが、これらの試料のあいだには相乗効果は認められなかった。

1月に採集したトドマツの枝葉からとりだした物質と5月および8月のそれからとりだした物質の耐凍性を高める作用を比較した結果を Table 6, Table 7, Table 8 にのせた。

ピリジン・ブタノール・水の上層部のアセトン可溶物質と不溶物質の作用は春の枝葉では、春の半量の冬の枝葉からのものより、いくらか弱い。8月の枝葉では、この半量の1月の枝葉からのものと、ほとんどおなじである。これらの物質が5月から8月にかけて、枝葉中でなんら質的に変化しなかったと仮定すれば、生の枝葉中のこれらの物質の量は5月から8月にかけていくらか増加したことになる。下層部のメタノール不溶物質については結果がまちまちだから比較しづらい。5月および8月の枝葉からとりだしたメタノール可溶物質の作用はこの半量の1月の枝葉からとりだしたものと、ほとんどおなじである。質的な変化がないと仮定すると、5月と8月の生の枝葉にふくまれるメタノール可溶物質の量には差がないことになる。Table 9には8月と1月の枝葉からとりだしたピリジン・ブタノール・水の下層部のメタノール可溶物質をおなじ方法で、かなり精製して葉にあたえ実験した結果をのせた。葉の凍結実験の結果から推定すると、8月から1月にかけての枝葉中の試料2の絶対量の増加はそれほどでもない。若い葉の耐凍性を高める作用のもっとも強い試料1では、かなり精製したにもかかわらず、粗製のメタノール可溶物質を用いた場合と同様に、その作用はこの倍量の8月の枝葉からのそれとほとんどおなじである。この結果から、耐凍性物質は耐凍性のもっとも強い厳冬季の枝葉にも、耐凍性の弱い生育期間中の枝葉にも、質的におなじかたちで存在していると考えられる。

トドマツ1年生苗木は Table 12, 13 に示すごとく、 -5°C で、春には30~35分間の凍結で凍害をうけはじめだが、初秋におこなった別の実験⁹⁾では75分間を必要とした。このような春から初秋にかけての耐凍性の高まりは耐凍性物質が苗木体内において質的あるいは量的に変化しなくても、含水率の低下にともなうこれら物質の細胞内濃度の高まりで説明できよう。また、厳冬季のトドマツがきびしい低温にたえる現実にてらして、枝葉中の耐凍性物質の絶対量の増加の度合いが少なすぎるとも考えられそうである。しかしながら、厳冬季には細胞内の多くの不溶性物質が可溶性に変わっており、これらが細胞内の自由水をとらえれば、実質的には耐凍性物質の細胞内濃度は高まるであろう。また、樹体内の物質の急激な質的あるいは量的変化をとまなうことなしに、樹木が危険な環境条件に対応できれば、樹木の生命、生活にとって好都合であるとも考えられる。

トドマツの枝葉からとりだした耐凍性物質を他属の樹種の若い葉にあたえても、その耐凍性を高めることができる。エゾマツやアメリカトガサワラにたいしても、試料1の作用がもっとも強い。試料2と試料3は、トドマツの若い葉よりは、エゾマツのそれにあたえた場合に、より強く耐凍性を高める。これらの物質を7日間あたえただけで、エゾマツの若い葉は -7°C 、40分間の凍結に部分的にたえるようになるが、トドマツの若い葉は -5°C 、50分間の凍結に部分的にたえるにすぎない。しかし、試料2と試料3はアメリカトガサワラの若い葉の耐凍性を高める作用はいちじるしく弱い。

トドマツの枝葉からとりだした耐凍性物質は試料1をのぞくと、他属の樹種の若い葉にたいしてトドマツの場合とことなつた働きを示す。しかし、同属の樹種の若い葉には、Table 11で示すごとく、それぞれの耐凍性物質の耐凍性を高める作用の強弱の順位は、トドマツの場合とほとんどおなじである。

10% 蔗糖液だけをあたえた対照の葉にも、樹種によって、その耐凍性にちがいが認められた。トドマツよりは高海拔地、高緯度地方まで天然分布するエゾマツの開芽季の葉の耐凍性はトドマツのそれより明らかに強い。トドマツの若い葉は、冬期間に気象害をうけたために、とくに開芽のおくれた接木木から採集したから、このことが実験結果に影響しているかもしれないが、とにかく一番北に分布するトドマツの開芽季の葉の耐凍性は、モミ属の4樹種中でもっとも高い。本州中部の高山では、実験に用いた3樹種中でウラジロモミがもっとも低位に分布し、アオモリトドマツはもっとも高位に分布する。開芽季の葉の耐凍性は、高海拔地に分布する樹種ほど高い傾向がみられる。開芽季の葉のこの程度の耐凍性のちがいが、生態的見地からどの程度の意義をもつかについてはわからない。しかしながら、高海拔地、高緯度地方に分布する樹種ほど、開芽季においても、わずかではあるが耐凍性が高いという事実には興味をそそられる。

苗木はあたえられた耐凍性物質を葉や枝の表面からしか吸収できないし、また、切りはなされた1枚の葉とちがって、完全な1個体としてさかんに生活活動を営んでいるから、体内に入った耐凍性物質はこわされやすいかもしれない。とにかく、苗木の場合には、葉を用いた場合のように、自由にその耐凍性をいちじるしく高めることはできなかった。実験結果の項で述べたように、苗木を木箱に移植し、各組の苗木ができるだけ均等に冷たい風をうけるよう工夫しておこなつた Table 13 に示す実験では、これまでより苗木の耐凍性を高める作用を明らかにすることができた。とくに試料1'と試料4'は苗木の耐凍性をかなり高めたと考えてよい。水だけを噴霧した対照の苗木は、凍結時間が長くなるほど凍害をうける苗木が多くなるが、試料1'と試料4'をあたえた苗木では、凍害をうけた苗木の絶対数がいちじるしく少なく、また、凍結時間を長くしても凍害本数はふえない。このことから、たまたま凍害をうけた苗木は、これらの試料を十分吸収できなかったか、吸収しても体内に蓄積できなかった苗木にかざられると考えられる。

濾紙を用い種々の溶媒で展開し、トドマツの若い葉の耐凍性を高める Rf 値を調べた。東洋濾紙 No. 51 を用いてえた Rf 値は、200~300 mesh の濾紙粉末をつめたカラムでえた値よりいくらか低めになる傾向がみられる。

これらの試料がどの種の物質か知るために、ニンヒドリン、ニトロプルシッド、EHRlich 試薬、ジアゾ試薬、ベンジジン等を用いて試験したが、これらの試薬によって呈色される物質の Rf 値は各試料のそれぞれの展開溶媒ごとの、トドマツの若い葉の耐凍性を高める物質の Rf 値に常に一致するとは限らないので、呈色反応によって耐凍性を高める物質の所在を正確に判

定することはできなかった。

結 論

トドマツの枝葉からとりだした物質を、精製の各段階で、トドマツの若い葉、1年生苗木、各樹種の若い葉などにあたえて、耐凍性を高める作用を調べた。結論はつぎのとおりである。

1. トドマツの枝葉からとりだした物質は、トドマツ苗木の開いてまもない芽からとった若い葉の耐凍性を、 -20°C の凍結に少しも害なくたえるまで高めた。

2. 精製した各試料は生育期のトドマツ1年生苗木の耐凍性も高めた。

3. 生育期のトドマツの枝葉にも耐凍性物質は存在するが、その量は絶対量で厳冬季の枝葉のほぼ半量である。

4. 精製した各試料中では、試料1'がトドマツの若い葉の耐凍性をもっとも高めた。ついで試料4'の作用が強く、試料3'の作用は弱い。トドマツ1年生苗木にあたえた場合にも、同様の傾向がみられる。

5. 試料1はエゾマツの若い葉の耐凍性を短期間にいちじるしく高めた。試料2と試料3はエゾマツの若い葉の耐凍性を、トドマツの若い葉にあたえた場合より、より効果的に高めた。

6. アメリカトガサワラの若い葉の耐凍性は試料1によって高められたが、試料2と試料3の耐凍性を高める作用は弱かった。

7. トドマツの枝葉からとりだし、精製した各試料は、おなじモミ属のトドマツ以外の3樹種の若い葉の耐凍性を、トドマツの若い葉の場合とおなじ傾向で高めた。

8. 開芽してまもない葉の耐凍性は、高海拔地、高緯度地方に天然分布する樹種ほど高い傾向がみられた。すなわち、エゾマツの若い葉の耐凍性はトドマツのそれより高く、おなじモミ属のなかでは、トドマツがもっとも高く、ウラジロモミがもっとも低い。

9. 各試料を濾紙を用いて、いろいろな溶媒で展開し、トドマツの若い葉の耐凍性を高める物質のRf値を決定した。

理学博士半沢道郎教授にこの論文を御校閲していただき、数々の有益な御助言をいただいた。厚く感謝の意を表す。

引用文献

- 1) KOHN, H. and J. LEVITT: Frost hardiness studies on cabbage grown under controlled conditions. *Plant Physiol.*, **40**, 476-480, 1965.
- 2) 今田敬一・武藤憲由: 北海道主要造林樹種の凍害に関する研究 (III) 凍害発生の時期. 北大演習林研究報告, 19巻, 1号, 79-121, 1958.
- 3) KURAISHI, S., T. TEZUKA, T. USHIJIMA and T. TAZAKI: Effect of cytokinins on frost hardiness. *Plant and Cell Physiol.*, **7**, 705-706, 1966.
- 4) LEVITT, J.: Effects of artificial increases in sugar content on frost hardiness. *Plant Physiol.*, **34**, 401-402, 1959.
- 5) ————: The mechanism of hardening on the basis of the SH \rightleftharpoons SS hypothesis of freezing

- injury. Internat. Conf. on Low Temp. Sci., Conf. on Cryobiology, 51-56, 1967.
- 6) LEVITT, J., C. Y. SULLIVAN, NILS-OLOF JOHANSSON and R. M. PETTIT: Sulfhydryls—a new factor in frost resistance. I. Changes in SH content during frost hardening. *Plant Physiol.*, **36**, 611-616, 1961.
 - 7) LI, P. H. and C. J. WEISER: Metabolism of nucleic acids in one-year old apple twig during cold hardening and de-hardening. *Plant and Cell Physiol.*, **10**, 21-30, 1969.
 - 8) LI, P. H., C. J. WEISER and R. VAN HUUSTEE: The relation of cold resistance to the status of phosphorus and certain metabolites in red-osier dogwood (*Cornus stolonifera* MICHX.). *Plant and Cell Physiol.*, **7**, 475-484, 1966.
 - 9) 武藤憲由: 耐凍性物質による凍害防除. 日本林学会北海道支部講演集, 18号, 141-143, 1969.
 - 10) ———: 耐凍性物質による凍害防除(第2報). 日本林学会北海道支部講演集, 19号, 153-155, 1970.
 - 11) ———: トドマツの耐凍性物質. 第83回日本林学会大会講演集, 89-90, 1972.
 - 12) 酒井 昭: 木本類の耐凍性増大の過程 IX 一糖類の凍害に対する保護作用一. 低温科学, 生物篇, 18輯, 23-34, 1960.
 - 13) ———: 植物細胞の凍害の機構 I 一凍害に対する媒液の影響(1)一. 低温科学, 生物篇, 19輯, 1-16, 1961.
 - 14) ———: 植物の耐凍性. 化学と生物, 5巻, 73-79, 1967.
 - 15) 酒井 昭・吉田静夫: 各種化合物の植物細胞に対する凍害防御作用. 低温科学, 生物篇, 26輯, 13-21, 1968.
 - 16) SCHMUTZ, W., C. Y. SULLIVAN and J. LEVITT: Sulfhydryls—a new factor in frost resistance. II. Relation between sulfhydryls and relative resistance of fifteen wheat varieties. *Plant Physiol.*, **36**, 617-620, 1961.
 - 17) SIMINOVITCH, D. and D. R. BRIGGS: Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to frost hardiness. IV. Effects of ringing on translocation, protein synthesis and the development of hardiness. *Plant Physiol.*, **28**, 177-200, 1953.
 - 18) SIMINOVITCH, D. and A. P. J. CHATER: Biochemical processes in the living bark of the black locust tree in relation to frost hardiness and the seasonal cycle. in *The Physiology of Forest Trees*, 219-250, 1957. The Ronald Press Co., New York.
 - 19) SIMINOVITCH, D., F. GFELLER and B. RHEAUME: The multiple character of the biochemical mechanism of freezing resistance of plant cells. Internat. Conf. on Low Temp. Sci., Conf. on Cryobiology, 93-117, 1967.
 - 20) 照本 勲: マリモの凍害と乾燥害. 低温科学, 生物篇, 17輯, 1-7, 1959.

Summary

To clarify the close relationship between frost hardiness and certain substances in plants, it is necessary that these plants are supplied with substances extracted from the plants and are artificially made frost hardy regardless of season. The substances extracted from the shoots and needles of Saghalien fir (*A. sachalinensis* MASTERS) made the young needles and one-year old seedlings of this species frost hardy in the growing season.

The current shoots and needles of Saghalien fir were collected from 15- to 45-year old plantation trees mainly in the middle of January every year and also on May 21st, 1969 and on August 29th, 1971.

The method and process of the purification of frost hardening substances are shown in Fig. 1.

A filtrate was concentrated as much as possible under reduced pressure at 35~

40°C. The concentrated solution was added to P.B.W. solution equivalent to half the amount of the fresh weight of the shoots and needles used for extraction, and was then shaken. Substances soluble in methanol were eluted with 70% methanol by descending column chromatography and the fraction of Rf about 0.5~1.0, which made the young needles of Saghalien fir frost hardy, was obtained. This fraction was again chromatographed using IP.M.W. solution, and the active substances were further purified. The apparatus of ascending column chromatography is shown in Fig. 2. Mainly glass tubes of 4.5 cm in inside diameter and 25 cm long were used for ascending column chromatography. Cellulose powder of 200~300 mesh was used as an adsorbing agent. Cellulose powder soaked with a sample and dried was packed as a layer 6~7 mm thick about 3 cm inside from the edge of glass tube, which was put into solvent. The sample was developed with adequate solvent up to the height of about 18 cm in the chromatography cabinet. The extracted fraction effective on frost hardiness was developed again with another solvent.

whether or not the extracted substances had an effect on frost hardiness was investigated, using the young needles of Saghalien fir collected from buds soon after unfolding. About one hundred needles were obtained from one bud of a 3- or 4-year old seedling of Saghalien fir, excluding the needles of bud base and apex.

Potted seedlings were put into the plant growth chamber or green house at the times of necessity from the end of December. These seedlings unfolded their buds in about two weeks. Needles placed in each Petri-dish and supplied with each substance were gathered in a Petri-dish and placed on filter paper moistened with water before exposing to low temperature. A piece of ice was put on the filter paper to prevent the needles from super-cooling. The needles collected from one bud were used for one freezing experiment. The decolored status of needles was observed through the microscope immediately after thawing. Needles or portions of needles which were not decolored were green and kept turgor for a long time and some of them elongated in a week. However, decolored needles became brownish-gray and lost their turgor in 3 or 4 days. The frost damage to needles, therefore, can be determined by observing the decolored status of them immediately after thawing. The close relation between frost damage and decolored status is disturbed in the case of subjecting needles to low temperature below -10°C .

One-year old seedlings of Saghalien fir were sprayed with an aqueous solution of each sample and these seedlings, in porous pots or transplanted into wooden boxes, were frozen at -5°C for various lengths of time and frost damage was determined a week or more after the freezing experiment.

The upper layer shaken with P.B.W. solution was concentrated and added to water, and deposits were discarded. Substances soluble in water were used as substances of the upper layer. Substances of the upper and lower layers extracted from shoots and needles of 7 g fresh weight were dissolved in 3 ml of 8% sucrose solution, and each solution was applied to the young needles of Saghalien fir on January 30th, 1969. The results are shown in Table 1.

The substances of the upper layer were added to acetone and were then divided into two groups, soluble and insoluble in acetone. The substances extracted from shoots

and needles of 7 g fresh weight were dissolved in 3 ml of 8% sucrose solution respectively, and the solutions were applied to young needles on January 31st, 1969. The results are shown in Table 2.

Substances soluble and insoluble in methanol extracted from shoots and needles of 10 g fresh weight were dissolved in 2.5 ml of 10% sucrose solution respectively, and these solutions were applied to young needles on February 8th, 1969. The results are shown in Table 3.

Each of substances soluble and insoluble in acetone was eluted with 70% methanol by a column packed with cellulose powder, and fractions making young needles frost hardy were obtained. The substances soluble in methanol were eluted with 70% methanol and the fraction affecting frost hardiness was again chromatographed using water. These partially purified substances soluble and insoluble in acetone, and soluble in methanol extracted from shoots and needles of 30 g fresh weight, were dissolved in 3 ml of 8% sucrose solution respectively, and these solutions were applied to young needles on March 15th, 1969. The young needles in Petri-dishes were put in an electric refrigerator at 0~5°C, excluding one dish for control. The results are shown in Table 4-1 and 4-2.

Although the young needles were added to the solution of substances soluble and insoluble in acetone, and 8% sucrose solution alone for various lengths of time, they were unable to withstand freezing in low temperatures and for times shown in Table 4-2. The young needles of Saghalien fir became more and more frost hardy with time when they were treated with solution of substances soluble in methanol.

The substances soluble in methanol were extracted from each of shoots and needles of 30 g fresh weight. One of these substances was dissolved in water, and this solution was boiled for 7 minutes. These substances were dissolved in 2.5 ml of 10% sucrose solution respectively and these solutions were applied to young needles on April 13th, 1969. The results are shown in Table 5.

Some of the young needles were able to withstand an exposure of -10°C for 35 minutes without any injury.

Each of the substances extracted from shoots and needles of 60 g fresh weight collected in spring, and 30 g fresh weight collected in winter, was dissolved in 2.5 ml of 10% sucrose solution, and each solution was applied to young needles on May 22nd, 1969. The results are shown in Table 6.

The actions of substances soluble and insoluble in acetone extracted from late summer shoots and needles were compared with those from winter ones. Young needles were treated with the solution of each of these substances on January 17th, 1972. The results are shown in Table 7.

How much the substances soluble and insoluble in methanol extracted from shoots and needles collected in late summer and winter made young needles frost hardy was investigated. Each of these substances was dissolved in 2.5 ml of 10% sucrose solution and each solution was applied to young needles on January 15th, 1972. The young needles in Petri-dishes were put in an electric refrigerator for 10 days and then placed on a desk in a room. The solution of each of these substances was renewed twice. On such occasions, the young needles were sterilized with organic mercury. The results

are shown in Table 8-1, 8-2 and 8-3.

The young needles of two groups treated with the solutions of methanol soluble substances extracted from winter shoots and needles of 30 g and late summer ones of 60 g, and then exposed at -20°C , were placed on filter paper moistened with a sucrose solution of low concentration. These needles kept their green color and turgor, and no symptom of frost damage could be detected up to the end of observation; that is, for 50 days,

Each sample extracted from shoots and needles collected in late summer and winter, and purified by the method and process shown in Fig. 1, was dissolved in 2.5 ml of 10% sucrose solution, and each solution was applied to young needles on January 21st, 1972. The results are shown in Table 9.

Sample 1 obtained from winter shoots and needles of 50 g fresh weight seemed to be a little more effective on frost hardiness than that obtained from late summer ones of 100 g fresh weight.

Each sample obtained from winter shoots and needles of 80 g fresh weight was dissolved in 5 ml of 10% sucrose solution, and the solution was applied to the young needles of each tree species in two Petri-dishes per each sample on May 21st, 1970. The results are shown in Table 10.

Sample 1 was the most efficient in making the young needles of all the tree species frost hardy. Sample 2 and sample 3 were very effective on the frost hardiness of the young needles of *Picea jezoensis*, but only a little effective on those of *Pseudotsuga taxifolia*.

Each sample obtained from winter shoots and needles of Saghalien fir of 100 g fresh weight was dissolved in 5 ml of 10% sucrose solution, and the solution was applied to the young needles of the four kinds of fir species in two Petri-dishes per each sample on June 19th, 1971. The young needles of Saghalien fir were collected from grafting stocks which unfolded their buds very late because of desiccating injury during the winter season. The results are shown in Table 11.

Sample 1' was the most efficient in making the young needles of all the fir species frost hardy. Sample 3' was the least effective on frost hardiness among the four kinds of samples.

One-year old seedlings of Saghalien fir were sprayed with an aqueous solution of each sample. Sample 3 was developed with I.B.M.W. solution using a column packed with cellulose powder and the fraction of Rf 0.15~0.4 was extracted. This fraction was used as sample 3 in this experiment. Each sample obtained from shoots and needles equivalent to 15 g fresh weight was dissolved in water at the rate of 1 ml. Eleven to thirteen seedlings in a porous pot of 10 cm in inside diameter were sprayed with an aqueous solution of each sample of about 1.3 ml per pot every other day from June 3rd to 11th, 1970. They were sprayed five times in total. The seedlings were sprayed with water alone, to the extent of drops not falling from the needles, two or three times a day. The seedlings in porous pots were sprayed with cold water before exposure and also just before attaining the temperature of -5°C , in order to prevent them from super-cooling. The results are shown in Table 12.

Each sample obtained from shoots and needles equivalent to 20 g fresh weight was

dissolved in water at the rate of 1 mℓ. One-year old seedlings of Saghalien fir were sprayed with an aqueous solution of each sample of about 1.3 mℓ per pot every other day from June 5th to 13th, and also on June 17th and 19th, 1972. They were sprayed seven times in total. The seedlings in porous pots were transplanted into wooden boxes one or two days before exposure to low temperature. Each of twelve seedlings was used for one freezing experiment. Other treatments were similar to those mentioned above. The results are shown in Table 13.

Rf values of each sample effective on frost hardiness were determined using filter paper 40 cm square. The results are shown in Table 14.

Conclusion

1. The substances extracted from the shoots and needles of *A. sachalinensis* made the young needles of this species collected from buds soon after unfolding frost hardy to the extent of withstanding freezing at -20°C without any injury.

2. Each sample increased the frost hardiness of one-year old seedlings of *A. sachalinensis* in the growing season.

3. Frost hardening substances were contained in the shoots and needles of *A. sachalinensis* in the growing season. However, their absolute amount seemed to be about half of that in the winter.

4. Samples 1 and 1' were the most effective in making the young needles of *A. sachalinensis* frost hardy among the four kinds of samples, and Sample 4' was the next most effective to Samples 1 and 1'. Samples 3 and 3' were the least effective. Each sample increased the frost hardiness of one-year old seedlings in almost the same order as the young needles.

5. Sample 1 was the most effective in making the young needles of *Picea jezoensis* frost hardy for a short time. Sample 2 and Sample 3 increased the frost hardiness of the young needles of *P. jezoensis* more effectively than those of *A. sachalinensis*.

6. Sample 1 increased the frost hardiness of the young needles of *Pseudotsuga taxifolia*, but Sample 2 and Sample 3 were only slightly effective.

7. The differences of effects of each sample on frost hardiness were not significant among the four kinds of fir species.

8. The frost hardiness of young needles soon after unfolding seemed to be greater in the tree species that were distributed naturally in higher altitudes or latitudes.

9. The Rf values of each sample that made young needles frost hardy were determined using filter paper 40 cm square.