

カンキツ類の寒害 (第4報)

温州ミカン枝葉の凍結に関する細胞学的観察

吉村不二男, 増田 治之, 加藤 紘一

(農学部 果樹園芸学研究室)

Studies on the cold injury of citrus trees. IV.

Cytological observation of the freezing on Satsuma orange trees.

by

Fujio YOSHIMURA, Haruyuki MASUDA and Kōichi KATŌ

(Laboratory of Fruit-production, Faculty of Agriculture)

Summary

Cytological observation of the freezing was done from December 25, 1964 to January 25, 1965 on Satsuma orange trees, which were kept in the green house. Sections of the stems and the leaves were frozen by keeping a few small pieces of dry ice on deck glass. The temperature on deck glass in sight-field of microscope lowered from (2 to 4)°C to -(8 to 18)°C for 3 to 7 minutes after the treatment begun. In xylem and pith of stem many cells turned dark color all at once, being likely to die, as shown in Figure 1. Parenchyma cells without chloroplasts inner part of cortex were plasmolysing (Figure 2 and 3). In parenchyma cells with chloroplasts outer part of cortex the chloroplasts were slightly vibrating and the border of a protoplasm was to be thick and bright, namely, the cells were likely to be plasmolysing (Figure 4). And chloroplasts in leaf cells lumped together in a foot ball and then cell wall increased in thickness, turned to be uneven and silverly white. These tendencies were more conspicuous in spongy parenchyma than in palisade parenchyma (Figure 5). From these results it is said that on citrus trees being freezing at low air temperature under natural conditions the intercellular freezing occurs in general.

And in the sense that the degree of frost hardiness is determined by a value of dehydration resistance; osmotic concentration of cell sap, the microscopic observation of treated sections with sucrose solution was done on December 20, 1964 on stems and leaves of Satsuma orange trees, which were cultured in the field. As shown in Table 1, cells of stem bark were more easy to plasmolyse than leaf cells. The plasmolysis occurred more easily on stems grown in summer than on those in spring and autumn. But among leaves developed in spring, summer and autumn the plasmolysis occurred similarly. And as compared with epidermal cells of midrib of leaf, parenchyma cells inner part of midrib were extremely easy to plasmolyse (Figure 7).

緒言

自然状態における気温の低下にならって温度を下げ、温州ミカンを低温に遭遇させると、葉はしだいに上方に巻いて、いちよう症状を呈し、凍結斑が現われる。この際、枝葉でみられる凍結が細

胞外で起こっているかどうかを明らかにするために、枝葉の組織切片を顕微鏡下で凍結させ、その様子を観察した。また、同時に枝葉の各部位の細胞について、しよ糖液で原形質分離を起こさせ、その細胞液の浸透圧の高低と凍結の難易との関係を調査した。

実験 I. 凍結時にみられる原形質分離

実験材料および方法：1964年の春季からガラス室内においた鉢植えのカラタチ台温州ミカン幼樹（2年生）の夏枝で、比較的充実したものを同年12月25日から翌年1月25日にわたって採集し、実験に供した。これらの個体はすべて 0°C 以下の低温には一度も遭遇していないものである。すなわち、葉については中肋と葉身、枝については葉柄の附着部位を薄く切り取り、純水に浸して、水を十分に含ませた。デッキグラスの上にドライアイスの小片を載せて、切片を冷却し、凍結していく過程を観察した。なお、この際にカバーグラスとデッキグラスの間に指示熱電温度計の接点を装着して、検鏡部位の温度を測ったが、およそ3～7分では $-8\sim-18^{\circ}\text{C}$ となった。

実験結果および考察：

1. **茎の髓辺組織** ドライアイス进行載せてしばらくすると、髓辺組織では多数の細胞が瞬間的に黒変した。そのときの状態を示すと第1図のとおりで、温度は $-15\sim-18^{\circ}\text{C}$ であった。酒井氏が皮層よりも髓部で凍りやすく、多数の細胞が凍死して黒変するのをヤナギの茎で観察している⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾が、温州ミカンの茎においても髓辺細胞が凍りやすく、凍結によって黒変枯死したのである。

2. **茎および中肋の皮層柔組織** 内層にある葉緑素を含まない細胞が凍りやすいようであった。すなわち、ドライアイス进行載せてから5～7分にして、 $-8\sim-13^{\circ}\text{C}$ のときに、細胞の黒変がみられず、多数の細胞が原形質分離を起こしているのが観察された。その状態を示すと第2図および第3図のとおりである。表層にある葉緑粒を含む細胞では、ドライアイス进行載せると、ただちに葉緑粒が微振動をはじめ、脱水されているようで、やがてその動きが鈍くなった。原形質の縁が全般に肥厚して白く見え、収縮している感じで、一部で原形質分離をほぼ起こしていた。葉緑粒を含まない細胞に比べて一般に原形質分離を起こしにくい。その状況を示すと第4図のとおりである。温度が高くなると葉緑粒がふたたび活発に微振動して、常温に戻ったあとでも動き続けた。

3. **葉身細胞** ドライアイス进行載せて1～2分すると、小さな葉緑粒が輝きながら微振動した。同時に葉緑粒の縁が濃色となり、鮮明にみえた。 $-8\sim-18^{\circ}\text{C}$ になると、葉緑粒が細胞内で1か所に集まって、球形ないし長だ円形のかたまりとなり、微振動しなくなった。その際、細胞膜は少し肥厚して白くなり、原形質との間にでこぼこの陰影がみられた。その状態は第5図に示すとおりである。室温に戻ってからカバーグラスの間に注水しても、葉緑粒がかたまつたままであったが、遊離している葉緑粒が盛んに微振動していた。その後12～14時間して、かたまつている葉緑粒がほぐれて、細胞内に広がった。その切片に2モルのしよ糖液を注入したところ、葉緑粒がふたたびかたまつたが、その程度が軽微であった。なお、上記のような葉緑粒の動きはさく状組織よりも海綿状組織においてはなほだ顕著であった。

凍結に伴う原形質の変化をみるために染色できないうえに、ドライアイスによる不自然な冷却法のために、皮層柔組織のうちで、内層にある、葉緑粒を含まない細胞を除いて、他の部位にある細胞では原形質分離の状態が明確でなかった。しかし、微振動、静止および凝集などの細胞内葉緑粒の一連の行動や細胞膜と原形質との間の微妙な変化からみて、凍結に伴って細胞が脱水され、ほぼ原形質分離を起こしていると思われる。すなわち、カンキツが自然状態で凍っているときは細胞外凍結を起こしているといえる。なお、当実験では検鏡のたびに冷却温度が少しずつ違ったので、凍結の難易を比べることはできなかったが、枝の木部、中肋の髓辺組織にのみ黒変枯死した細

胞がみられたのは興味深いことであった。参考のために、 -15°C で24時間処理して、凍死した切り枝を低温恒温器から取り出して、ただちに検鏡したところ、表層柔組織の内層で葉緑粒を含まない細胞あるいは形成層周辺の小細胞が層となってい縮して、不整形となっていた。その状況は第6図のとおりである。それらは内層が凍りやすく、凍死しやすいことを示しており、細胞外凍結に伴う脱水によって死に至ったことは明らかである。

実験 II. 枝葉の部位による原形質分離の難易

第1報で述べたように枝葉が低温に遭遇すると、まず枝から凍りはじめて、葉柄、中肋をへて葉身の順に凍結する⁽⁷⁾。すなわち、これら部位の違いによって凍結に難易があるように思われる。実験 I では冷却速度が均一でなかったために、凍結の難易を比べたり、また、凍結点を測ることはできなかったが、カンキツ樹の凍結が細胞外凍結であることは明らかになった。このように凍結が細胞外で起こるものであれば、脱水抵抗の大きいものほど、すなわち、細胞液の浸透圧の高いものほど凍結しにくいということになる⁽⁹⁾。そこで、種々の濃度のしよ糖液で原形質分離を起こさせて、枝葉について浸透圧を比較調査した。

実験材料および方法：供試材料は本学カンキツ園の10年生温州ミカン樹から採集した。1964年12月20日に発生時期別に枝を切り取り、枝の葉柄の付着部位および葉の中肋のそれぞれ表層部の切片を作り、0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2および1.3モルのしよ糖液によって原形質分離を起こさせて、その細胞数を調べた。

実験結果および考察：原形質分離を起こしている細胞数を1視野当たりのパーセントで示すと第1表のとおりである。すなわち、発生がいずれの時期のものであっても、それぞれ葉よりも枝の方で原形質分離が早く起こり、中でも夏枝は最もその傾向が顕著であった。意外なことに、秋枝がかえって原形質分離を起こしにくかった。本学のカンキツ園で1963年1月16日には -8.7°C 、25日 -7.8°C 、26日 -8.2°C に下がった。その際に、10年生温州ミカン樹で夏枝の基部から凍りはじめ、凍結斑が夏枝の先の方に移行すると同時に春枝が凍り、その夏枝の全部が凍るところ、順次秋枝

第1表 温州ミカン枝葉の浸透圧——しよ糖液で原形質分離を起こしている細胞数、1視野当りのパーセント——。

Table 1. Fluctuation of osmotic concentration of cell sap on Satsuma orange trees on December 20, 1964; percentage of plasmolysed cells with sucrose solution per a sight-field of microscope.

| Growing cycle of tested stems and leaves | Spring | | Summer | | Autumn | |
|--|--------|--------|--------|-------|--------|-------|
| | Stem* | Leaf** | Stem | Leaf | Stem | Leaf |
| Molal solution of sucrose | | | | | | |
| M | % | % | % | % | % | % |
| 0.8 | 5 | 5*** | 5 | 5*** | 5 | 0 |
| 0.9 | 20 | 5*** | 30 | 5*** | 10 | 0 |
| 1.0 | 25 | 5*** | 30-40 | 5*** | 10-15 | 5*** |
| 1.1 | 30 | 15-20 | 30-40 | 10 | 15-20 | 10-15 |
| 1.2 | 30 | 15-20 | 30-40 | 10-15 | 20-30 | 10-15 |
| 1.3 | 40 | 20-30 | 40 | 20-30 | 30 | 20-30 |

* : Parenchyma cells outer part of stem bark around stem bud.

** : Epidermal cells of midrib of leaf.

*** : Cells inner part of midrib were very easy to plasmolyse.

が凍っていった。筆者は温州ミカンの3年生樹を人工的に凍らせて——(7.0~7.5)°C×4時間処理——、全く同様な傾向を確認した⁽⁹⁾。当実験で夏枝が原形質分離を最も起こしやすかったことと徴して、はなはだ興味深い。

なお、葉の中肋表皮細胞の切片を作る際に、同一部位で数度切り取ってみると、表層内部の細胞の方がしよ糖液で原形質分離を起こしやすい傾向がみられた。その状況は第7図のとおりである。第1表で0.8~1.0モルで少数の細胞が原形質分離を起こしたが、これは中肋の表層内部でみられたものであった。実験Iで表層柔組織のうちで、内層にある葉緑素を含まない細胞がきわめて凍りやすく、凍死しやすいことを示したが、当実験成績の原形質分離の遅速の傾向とよく一致した。

当実験結果で葉の浸透圧をみると、葉の発生時期による差がほとんどなかった。ところが、1963年1月の異常低温および人工的に凍らせた際⁽⁹⁾の観察によると、凍結斑は春葉や秋葉に比べて夏葉に早く現われた。この夏葉が早く凍る理由については、まだ十分に明らかではないが、一種の植氷現象^{(9)・(6)}ではなからうかと思われる。すなわち、夏枝がまず凍りはじめたので、それに近接した夏葉の葉柄で過冷却の程度が少くなり、容易に凍る。次いで、凍りやすい内層部を通して、中肋から葉脈と凍結が順次移行して、ついに葉身の基部に凍結斑が比較的早く現われ、秋葉よりも早く凍る結果となったのであろう。

摘 要

1. デッキグラスの上にドライアイス片を載せて、温州ミカン枝葉の組織切片を-(8~18)°Cで凍らせ、その凍結の過程を顕微鏡で観察した。茎の木部および中肋髓辺組織では多数の細胞が瞬間的に黒変枯死した。茎の皮層柔組織では細胞の黒変はみられなかったが、葉緑素を含まない内層細胞で明らかに原形質分離を起こしていた。外層部の葉緑粒を含む細胞では原形質分離が起こりにくい。原形質がやや収縮して、その縁が肥厚して白くみえた。また、凍りはじめると細胞内で葉緑粒が微振動して、やがて静止するが、温度が上昇するとふたたび微振動を起こした。葉身細胞では葉緑粒がかたまりとなって、細胞膜が白色に肥厚し、原形質との間にでこぼこの陰影がみられた。その傾向は海綿状組織において著しかった。以上のことからカンキツ樹が普通に凍っているときは細胞外凍結を起こしている。

2. 部位による凍結の難易を検鏡できなかつたが、しよ糖液で原形質分離を起こさせてみると、葉より枝の方が原形質分離を起こしやすく、ひいては、凍りやすいことが了解できた。なお、中肋では表層より内層の方が原形質分離を起こしやすく、春枝および秋枝に比べて夏枝が原形質分離を起こしやすかつた。葉ではその発生時期による相違があまりなかつた。

引 用 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 生物編. 14: 17~23.
2. ————. 1959. バラの耐凍性(第1報)種類間および系統間の耐凍性. 園学雑. 28: 310~316.
3. ————. 1961. 植物細胞凍害の機構 I 凍害に対する媒液の影響. 低温科学 生物編. 19: 1~17.
4. ————. 1964. 木本類の耐凍性増大過程 X 枝の耐凍性を効果的に高める温度. 低温科学 生物編. 22: 29~51.
5. 坂村 徹. 1952. 植物細胞浸透生理: 203~209.
6. 吉村不二男, 加藤絃一, 増田治之. 1965. カンキツ類の寒害(第6報) 低温遭遇に伴う温州ミカンの枝葉の細胞浸透圧ならびに体内成分の変化と耐凍性の増大との関係. 園学雑(投稿中).
7. ————, 大野芳信. 1962. カンキツ類の寒害(第1報) 数種の幼樹の耐凍性. 高知大 学術報告 自然科学 II. 11: 27~36.
8. ————, ————. 1962. カンキツ類の寒害(第2報) 温州ミカンと夏ミカンの抵抗性の比較. 高知大 学術報告 自然科学 II. 11: 37~41. (農及園. 38: 981~982.)
9. ————, ————, 川北高資, 松野克義. 1963. カンキツ類の寒害(第3報) 二, 三の凍結および融解処理と樹体の寒害発生との関係. 園学雑. 32: 149~156.

(昭和40年9月20日受理)

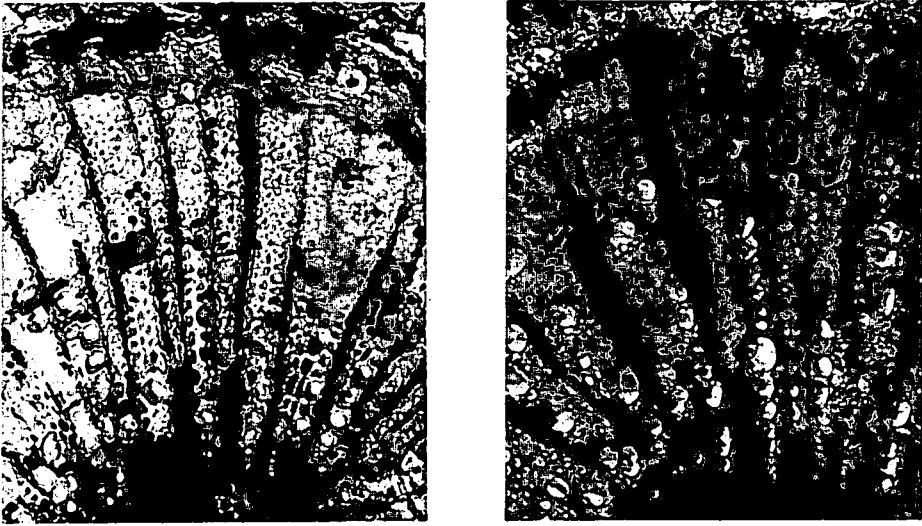


Figure 1. Xylem cells of stem were frozen easily. As shown in right picture, a great many cells turned dark color all at once, being likely to die, at $-(15 \text{ to } 18)^{\circ}\text{C}$, 3 to 5 minutes after the freezing treatment with dry ice begun. The left indicates before the treatment.

第1図 凍結に伴う木部の黒変，枯死。左図：凍結処理開始直前，右図：開始後3～5分， $-(15\sim18)^{\circ}\text{C}$ 。

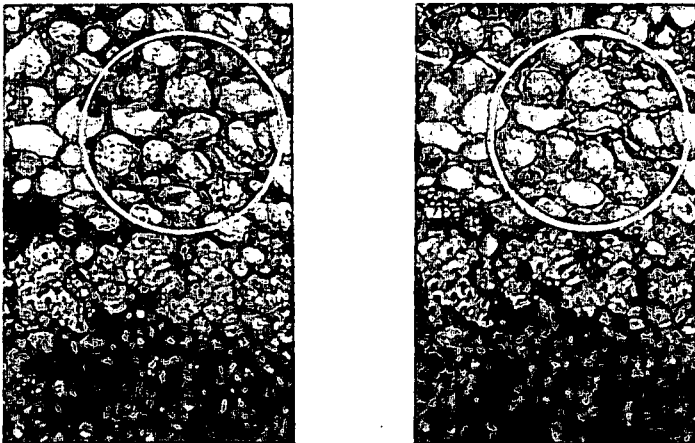


Figure 2. Plasmolysed parenchyma cells without chloroplasts inner part of cortex of stem by the freezing treatment. Left: 0 to 2 minutes after the freezing treatment begun. Right: At $-(8 \text{ to } 13)^{\circ}\text{C}$, 5 to 7 minutes after the treatment begun.

第2図 凍結に伴って原形質分離を起こしていく過程。皮層柔組織の内層部にある，葉緑粒を含まない細胞。左図：凍結処理開始後0～2分，右図：開始後5～7分， $-(8\sim13)^{\circ}\text{C}$ 。

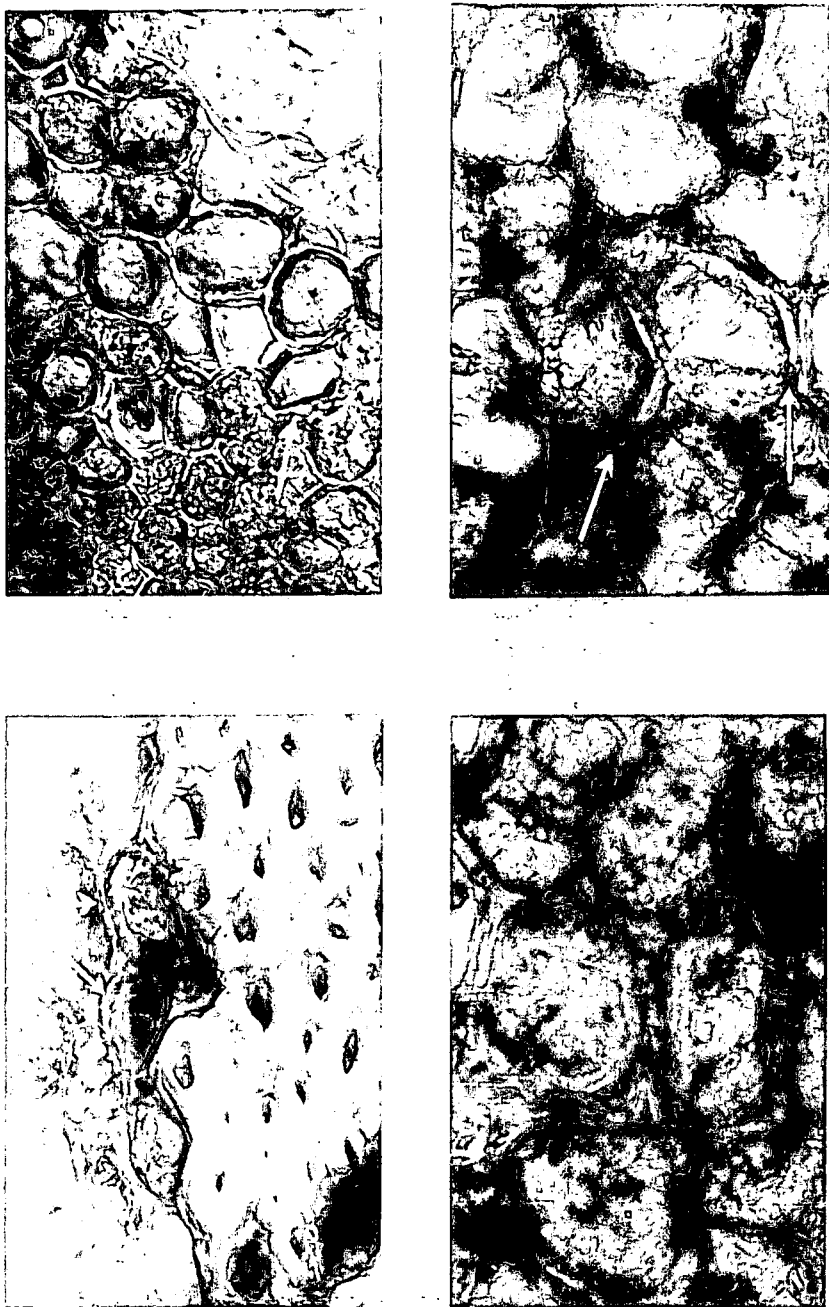


Figure 3. Plasmolysed parenchyma cells without chloroplast inner part of cortex at $- (8 \text{ to } 13)^{\circ}\text{C}$. 5 to 7 minutes after the freezing treatment begun.

第3図 凍結に伴なって原形質分離を起こした細胞。皮層柔組織で内層部にある，葉緑粒を含まない細胞。

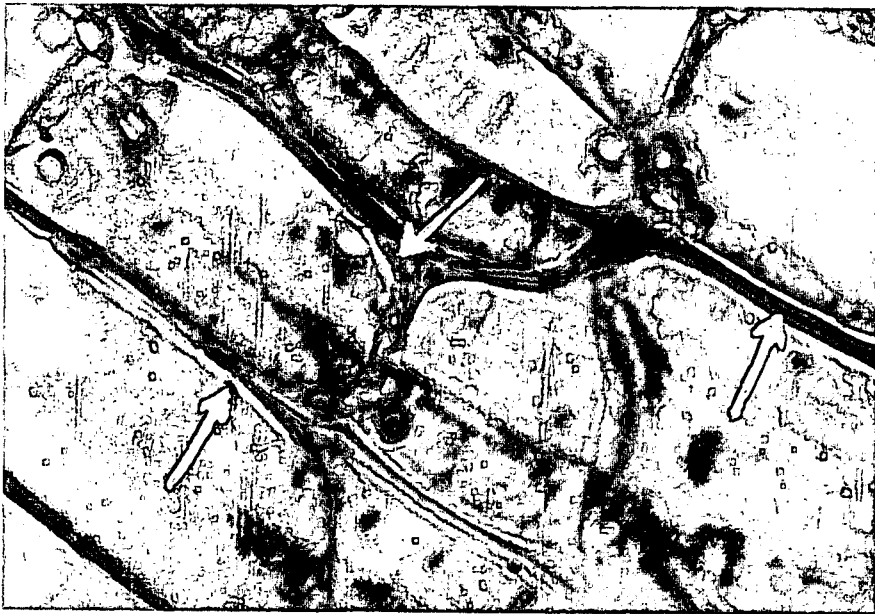


Figure 4. Parenchyma cells with chloroplasts outer part of cortex, being frozen with dry ice. Upper: Chloroplasts were shown to be slightly vibrating, 4 to 5 minutes after the freezing treatment begun. Under: The border of a protoplasm was to be thick and bright; the cells were likely to be plasmolysing, 7 to 8 minutes after the treatment begun.

第4図 凍結中の細胞。皮層柔組織で外層部にある，葉緑粒を含む細胞。下図では原形質分離をほぼおこなっている。

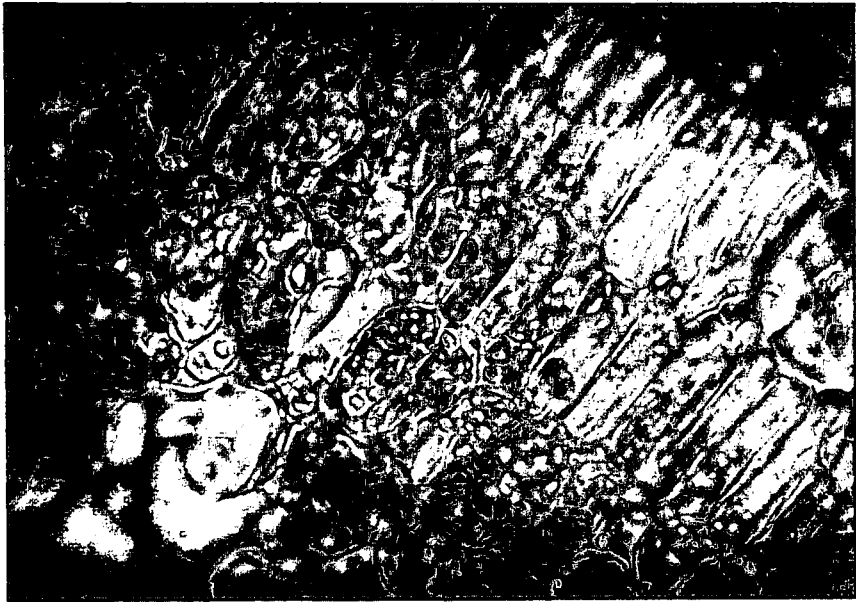


Figure 5. Palisade parenchyma cells (upper) and spongy parenchyma cells (under) of leaf, being frozen with dry ice. Chloroplasts lumped together in a foot ball, and several chloroplasts being free from the lumps were slightly vibrating. Cell walls increased in thickness, turned to be uneven and siverly white. The lumped chloroplasts were to be loose 12 to 14 hours after the temperature on deck glass increased over 0°C .

第5図 凍結中の葉の細胞。 上図：さく状組織，下図：海綿状組織。

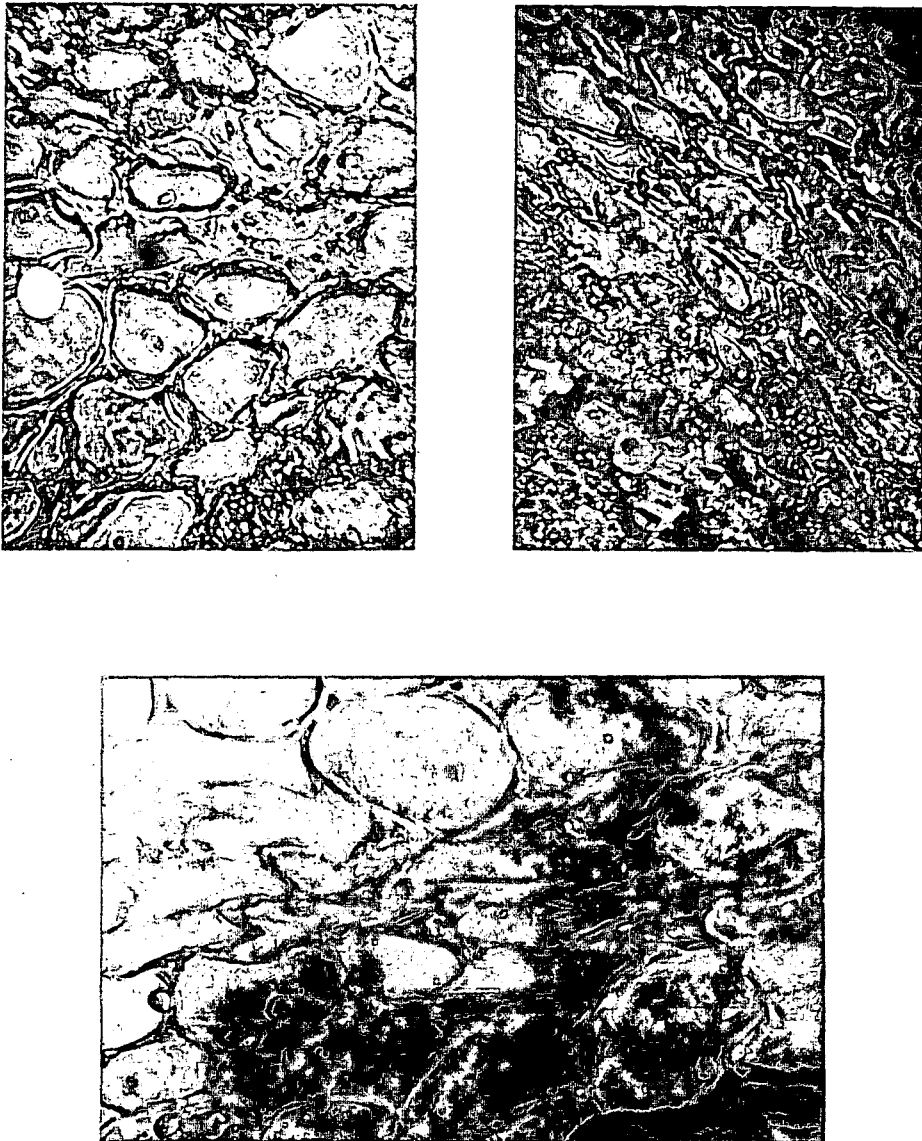


Figure 6. Cells without chloroplasts inner part of stem bark around stem bud, being held not their shape by freezing. Materials were obtained from twigs of Satsuma orange trees, which were treated at -15°C for 24 hours, and then were frozen to death in the refrigerator.

第6図 冷蔵庫で凍死させた ($-15^{\circ}\text{C} \times 24$ 時間) 切り枝の皮層柔組織の内層部で、
い縮して、形のくずれた細胞。

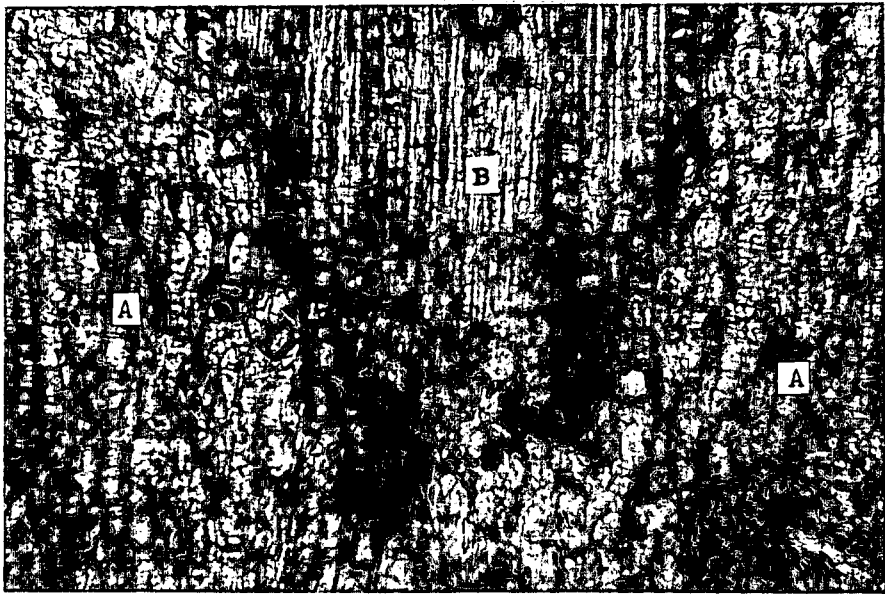
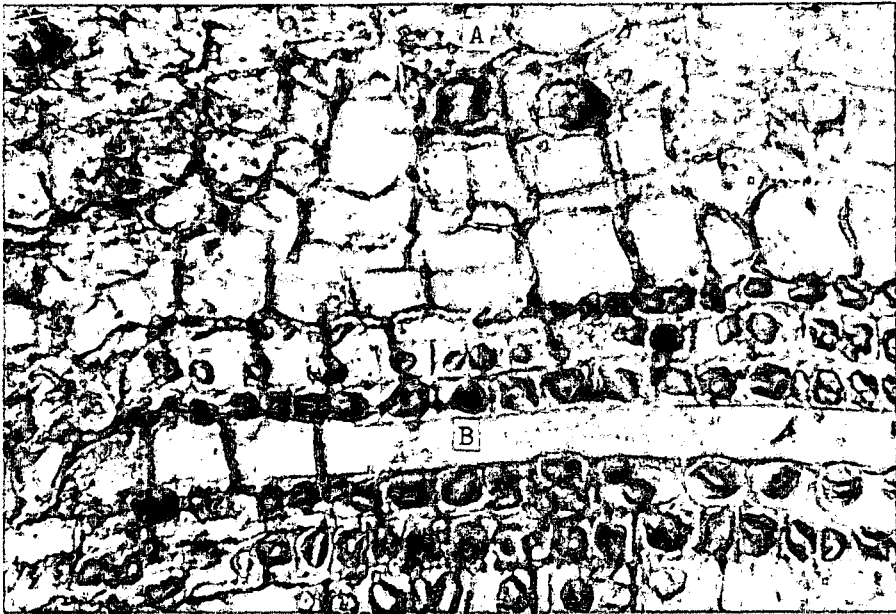


Figure 7. Plasmolysed cells of midrib of leaf with 1.1 to 1.2 molal solution of sucrose. As compared with epidermal cells (A), parenchyma cells inner part of midrib (B) were extremely easy to plasmolyse.

第7図 1.1~1.2Mのしよ糖液で原形質分離を起こした中肋細胞。(A)表皮細胞, (B)内層にある柔組織の細胞。”