

トドマツ耐凍性の人工凍結実験による検定法

栄花 茂・飯塚和也・丹藤 修

Shigeru EIGA, Kazuya IZUKA, Osamu TANDOH

A testing method the cold hardiness of Sacharin(*Abies sachalinensis*) by way of artificial freezing.

要旨：植物の耐凍性に関する研究は、1970年代からの実験手法の開発によって著しく進展した。従来、林木の耐凍実験は、材料の遺伝的な変異性と複雑な生理現象に影響されて、精度の高い実験結果が得られなかった。しかし、林木の凍結実験は、1) 材料の産地、林分、母樹、クローン及び個体(ラメート)等の系統管理されたものを用い、2) 統計処理(実験結果のデータ解析)できる材料の数量及び3) ハードニング法等の実験手法を実施すれば精度の高い結果が得られことが判明した。

- 1 はじめに
- 2 凍結の実験方法
 2. 1 凍結実験法
 2. 1. 1 実験材料の準備
 2. 1. 2 実験機器類
 2. 1. 3 人工凍結の方法
 2. 1. 4 凍結ハードニング法
 2. 1. 5 凍結後の材料融解法
 2. 1. 6 示差熱分析法
 2. 2 実験結果の数値化
 2. 2. 1 被害の判定
 2. 2. 2 判定値の数量化
- 3 トドマツ苗木の各器官の耐凍性変動に与える温度の影響
 3. 1 耐凍性増大に及ぼす温度の影響
 3. 2 耐凍性の保持に及ぼす温度と休眠の影響
- 4 モミ属、トウヒ属、マツ属耐凍性の季節変動とハードニング効果
 4. 1 トドマツ冬芽の耐凍性の季節変動とハードニング効果

4. 2 モミ属、トウヒ属、マツ属耐凍性の季節変動とハードニング効果

参考文献

1 はじめに

気象害抵抗性育種事業において、選出された抵抗性候補木は、つぎ木等の無性繁殖された苗木及び抵抗性個体（又は候補木）のクローン間で自然交雑された苗木を、選出地の気象環境に類似する地域に設定される試験林（気象害検定林、以後検定林と称する）に植栽し検定することになっている。このように設定された検定林において、植栽された苗が再び選抜時と同様な気象害を受けることは、検定地の環境条件及び苗木の生理条件等からして困難なことが多い。特に、微妙な環境の変化が影響する凍害や寒風害の検定は検定林等の自然環境での再現性に乏しく、特殊検定法である人為的な方法によって、野外検定の検定結果に補足を加えざるをえない。

特殊検定法は、実験条件と実験材料が充分であれば、野外検定の補足的な方法を脱して、本来的な検定法として確立された検定法となりうる。特殊検定法を成功させる実験条件は、第一の要点として、多数の均一な材料を数度の繰り返しで実験することで正確な結果が得られる。第二の要点は、実験材料の植物としての生理的な均一条件において、凍結温度や処理時間等の実験条件を決定することである。この様な実験材料の生理的な条件は、気象等の外的な環境条件に大きく影響されることが知られていることから、実験材料の耐凍度も実験前におおよその推定は可能である。凍結実験を効率よく能率的に行うには、実験材料のおおよその耐凍温度の範囲を事前に推定する事が大切であり、実験成功の重要な条件であると言える。

本論は、主としてトドマツ (*Abies sachalinensis*) を材料として耐凍性の人工凍結による検定を行うための実験手法を延べる。あわせて、このような実験の実施に関連の深いトドマツ等の苗木の耐凍性変動に与える温度の影響に関する研究結果についても述べる。

2 凍結の実験方法

気象害抵抗性個体の特殊検定法として行われた主要な方法は、人工凍結法、風洞実験法、自然寒風暴露法の3種がある。

人工凍結法は凍害抵抗性を検定するために実験材料の切り枝等を冷凍施設で凍らせる方法である。風洞実験法と自然寒風暴露法は寒風害抵抗性を検定をするために行うためであり、風洞実験法は風洞装置のターンテーブル上に置いた鉢植え等の実験材料に低温な風を吹き付ける方法である。自然寒風暴露法は野外において、冬季間常習的に北西の強風が吹きさらす場所に櫓を組立て、鉢植え等の実験材料が直接自然の風に暴露される方法である。これらのうちで寒風害抵抗性を検定する特殊検定方法は被害の再現性が不十分であることからあまり活用されなかった。

これら以外の特殊検定法は、スギでは穂木の自然脱水の強弱から寒風害抵抗性候補木についての乾燥・干害の

抵抗性検定が行われた。また、耐雪性抵抗性候補木の簡易検定法として、苗木の人工的な圧縮強度の測定による技術開発が行われた。

ここでは人工凍結法について、その実験に用いる材料の準備、実験装置、凍結実験の手順・方法及び被害判定とその数値化及び若干の研究成果について述べる。

2. 1 凍結実験法

2. 1. 1 実験材料の準備

凍結実験用の機器類は一般的に容積が少ないことから、実験に用いる材料は少量で小型化のものを用いる。しかし、林木育種の研究ではその特殊性から多量の材料を反復して使用することが必要であることから、凍結実験には成木や苗木からの切り枝である穂木を用いるのが良い。

凍結する材料のどの器官やどの組織を検定するかは、検定目的や樹種によって異なるので事前にそれぞれの樹種や器官のおおよその耐凍度（℃）を知っておくこと大切である。トドマツの穂木を用いる凍結実験においては冬芽、針葉及び枝（形成層）の耐凍性が検定出来る。しかし、トドマツの耐凍度は季節変化に伴い厳冬期の最高値に近づくにつれて器官間の耐凍度に著しい差が生じて、同一の実験用機器類での検定が困難となるので注意が必要である。実験に用いる穂木の長さは15cm程度あればマツ科植物では充分であるが、実験に供するまでの間の保存は荒穂の状態でも出来るだけ多数の枝をつけておいた方がよい。凍結実験に用いる成木や苗木からの切り枝である穂木は、実験に供するまで時間がある場合は採穂した時期の外気温の旬最低気温を目安にして一時貯蔵する。旬最低気温が5℃程度の時期に採取した穂木はスギでも0℃以下の凍結保存が出来る。しかし、長期間保存すると、休眠からあけた時期あるいは休眠が無い植物にあつては、この期間に耐凍性がハードニングされたりデハードニングされることがあるので注意がいる。

実験に用いる穂木は、トドマツの場合には当年枝が3本以上着生（冬芽数が9個以上あること）している2年生の枝を15cm程度に切り、約10cm×25cmの大きさのポリエチレン袋に5本の穂木を入れて空気を除きながら系統クローン名等を記載した名札をつけ密閉する。凍結実験中と融解時の乾燥を防ぐために2cc程度の水を注射器にて袋内に補給するか若干の氷片を入れることが必要である。この様な水分の補給は、融解後の被害判定に際して水差しを行わないマツ科等の樹種では、袋に材料を入れた状態で組織や器官を褐変させることから材料の乾燥には十分な注意が必要である。

ポリエチレン袋に入れる5本の穂木は、接ぎ木個体にあつては、1クローンについて5本のラメートから穂木を採取し、一つの袋に同一ラメートが入らないようにする。実生系統にあつては、1母樹、系統（産地内個体が混合）当たり10本～20本の個体から1本ずつ採穂し、1袋に10～20本の穂木を約20cm×30cm程度の大きさのポリエチレン袋に入れる。クローン苗木や実生苗木であっても同一ラメートや同一個体からは2本以上の穂木を採穂しないように材料の採取現場での作業時から注意が必要である。

凍結の実験材料の準備には、これらの他かに、例えば1mを越すような苗木の場合には、幹の切断面をワックス蠟を塗りつけ苗木全体をビニール等で覆い被せて脱水による傷害を少なくする処理をしてから、プレハブ低温室内で凍結させることもできる。また、育成箱や鉢に播種し、養成した苗木又は植え込みされた苗木を凍結する方法がヒノキやトドマツで試みられた。土壌凍結による根の凍害が発生しなければ実験目的によっては有効な方法

である。

2. 1. 2 実験機器類

使用する実験機器の種類は、実験目的による処理温度の設定数と実験材料の数によって容量、機能、精度等が異なる。大量に実験材料を供する場合は温度制御装置付きのプレハブ低温室（3.3～5.0m²程度の広さ）を必要とするが、設置場所や電気代から考慮すれば300～400m³の容量で横型の冷凍槽（庫）に±0.5～1.0℃程度の精度の温度制御装置を準備する。

冷凍槽の冷却温度の範囲は、実験目的、対象樹種や組織・器官によって異なるが、おおよそ5℃～-30℃と-10℃～-50℃の温度領域を実験できる槽を2基は必要である。さらに、可能であれば5℃～-40℃の低温槽があれば実験範囲が拡大し能率的である。槽の内部には材料の入っているポリエチレン袋を乗せる高さ15cm程度の棚を5～6段重ね、槽の横壁とは5cm以上の隙間をあげ、それぞれの棚の底は網を張り付けして冷気の流通をよくしておく。

実験機器内の気温と実験材料の樹体内温度は、銅・コンスタンタン（cc）熱電対線等を用いて槽内の2～3箇所で自動的に記録測定するものとし、そのために多チャンネルの測定端子を持つ温度記録計が必要である。熱電対線は0.25mm程度のものを実験前に100m単位で購入しておくことと便利である。これまでの樹木に関する凍結実験の報告では、実験材料の樹体内温度の測定を怠り、低温装置の温度制御に用いている測温センサーの観察をもって凍結温度とする報告を多く見かける。正確な実験は熱電対線等を樹体内に差し込み実験材料の組織・器官が確かに所定の処理温度に達したことを確認する必要がある。

2. 1. 3 人工凍結の方法

ポリエチレン袋に入れ終えた実験材料は外気温の旬最低気温が0℃前後（5～-5℃程度）であれば、0℃に2時間以上放置したあと、一般的な方法としては2時間に5℃の速度で冷却しながら所定の処理温度に16時間置く。所定の温度で凍結した材料は、2時間に5℃の速度で融解し、0℃に達したらならば0℃に16～24時間放置した後に室温に移す。この間の処理温度や処理後の温度経過は、槽内の材料の温度及び気温を自動測定し記録する。室温に移動する際、ポリエチレン袋内が乾燥しているならば注射器にて給水する。これらの方法は、樹木の凍結実験を行う一般的な手法の概要である。次ぎに詳細な実験方法を解説する。

凍結の処理温度は、3～5区の温度処理区を設定する。経験を積むと3処理区の温度設定で被害判定に必要な測定値がどれかの温度処理区から十分に正規分布する資料が得られる。例えば、ある時期の実験において、材料の耐凍度が約-15℃と推定される場合には、その前後に-10℃と-20℃の温度処理区を設定し、3処理とする。また、この場合に、凍結処理の経験がない場合、材料間の耐凍性変異が大きいと推測される場合あるいは同一材料であっても組織・器官あるいは産地・系統による耐凍度が著しく異なる場合等には-9℃、-12℃、-15℃、-18℃、-21℃の5処理とする方法が良い結果が得られる。さらに、厳冬期のトドマツ冬芽はハードニングされ、根室産が-45～-48℃に、羽幌産は-38～-40℃の低温に耐えること及びトドマツの組織や器官の耐凍度が著しく異なること等から凍結処理の温度を-35℃、-40℃、-45℃、-50℃、-70℃の5処理を必要とする。

表一 トドマツ苗木の耐凍性増大期におけるハードニング効果

採種月日	各組織の耐凍度 (°C)												
	芽				形成層				根				
	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)		
無処理	0° ₍₂₀₎	0° ₍₁₀₎	-3° ₍₁₀₎	-5° ₍₁₃₎	無処理	0° ₍₂₀₎	0° ₍₁₀₎	-3° ₍₁₀₎	-5° ₍₁₃₎	無処理	0° ₍₂₀₎	0° ₍₁₀₎	-5° ₍₂₀₎
26/IX	-5	-10	-10	-10	-10	-15	-5	-10	-15	-5	-5	-5	-5
7/X	-10	-15	-10	-10	-10	-15	-10	-10	-15	-10	-5	-10	-5
18/X	-10	-15	-20	-20	-15	-20	-20	-15	-20	-20	-5	-10	-10
28/X	-15	-	-	-	-20	-	-	-20	-	-	-5	-	-
10/XI	-15	-20	-20	-20	-20	-25	-30	-20	-25	-30	-5	-10	-10
25/XI	-25	-20	-25	-25	-30	-40	-50	-30	-40	-50	-10	-10	-10
8/XII	-25	-20	-	-30*	-30*	-30	-40	-	-70*	-70*	-15	-10	-15*
25/XII	-25	-20	-	-30*	-30*	-70	-50	-	-70*	-70*	-20	-10	-20*

実験材料は羽幌産5年生苗の切枝,*は12月8日と25日の処理のうち(C)と(D)は根のついた苗木のままハードニング処理。表中の略号は0°₍₂₀₎は0°Cに20日間ハードニングを表わす。0°₍₁₀₎+ -3°₍₁₀₎は0°Cに10日間処理後に-3°Cに10日間ハードニングを表わす。無処理の耐凍度は図-2の値である。耐凍度は苗木の組織が害なく16時間の凍結に耐える最低温度である

2. 1. 4 凍結ハードニング法

植物が自然環境において温度、日長等の影響によって耐凍性を獲得し、消失する過程は段階的であって、数回のステージを得て最高の耐凍度に達し、消失する。トドマツ等のマツ科の植物も、同様の過程をたどることが知られている。自然環境での植物の耐凍度は獲得し消失する過程においてその季節における最高値に達しているとは限らない。植物の潜在的な耐凍度は一般的にその季節の自然に獲得した耐凍度よりも高いが、厳冬期には耐凍度は最高値に達し安定し、潜在的な耐凍度を獲得していると考えられていた。その結果、例えば厳冬期のトドマツの耐凍度は産地間や母樹・クローン間において有意な差異がほとんどないと考え、これらの耐凍性の遺伝的な変異は耐凍性の獲得時期か消失時期に行うべきだとされた。しかし、あとで述べるハードニング法によって予備凍結を行うと、厳冬期においてもトドマツ冬芽の産地・母樹間において十分な耐凍性の変異が認められた。

ハードニング法は、前項の人工凍結法で述べた材料の入っているポリエチレン袋を、潜在的な耐凍性を最大限に発現させる方法として、材料の各組織の耐凍度の季節変化に応じて予備凍結の温度と処理期間の長さを変えて行う凍結法である。

表一はトドマツ苗木の各器官の耐凍性増大期におけるハードニング効果を知るために行った実験条件とその結果を示した。表中の「無処理」は、実験材料を収集後に直ちに所定の温度で凍結した各季節における自然環境下での耐凍度を示している、いわゆるノンハードニング法である。他方、表中の(A)～(D)はハードニング法によって凍結実験された各季節の耐凍度を示している。表中の(A)～(D)と無処理との差が耐凍性増大期におけるハードニング効果であるが、この実験は予備的なものであったので、ハードニング効果はあまり大きくはない。表中のハードニング処理のうち、(A) 0°₍₂₀₎は0°Cの温度に20日間処理した事を示す。(B)の0°₍₁₀₎+ -3°₍₁₀₎は0°Cの温度に10日間放置した後に-3°Cの温度にさらに10日間処理した事を示している。

表二はトドマツ精英樹クローンの冬芽の耐凍性の季節変動をするために、9月から5月迄の間に10回の人工凍結実験を行った結果であり、表三は、産地間の耐凍性変異を知るために行った凍結実験の方法である。凍結実験は、それぞれの季節において採穂した材料を直ちに凍結実験に供した場合をノンハードニング法と称し、穂

表-2 冬芽の耐凍性の季節変化についての凍結実験の方法
Hardening method and freezing temperature used to test seasonal changes in the cold hardiness of winter buds.

時 期 Season	ハードニング法 Hardening method	凍 結 温 度 Freezing temperature (°C)				
1978 25 Sep.	0°C・10 days*	-3	-5	-8	-10	-15
7 Oct.	0°C・10 days*	-3	-8	-13	-16	-15
18 Oct.	0°C・10 days*	-5	-8	-13	-16	-19
21 Nov.	0°C・10 days, 0°C→-10°C (1°C/day) **	-20	-25	-30	-35	
16 Dec.	0°C→-20°C (1°C/day), -20°C・20 days***	-33	-36	-39	-42	
25 Dec.	0°C→-25°C (1°C/day), -25°C・20 days	-36	-39	-42	-45	
1979 24 Feb.	0°C→-25°C (1°C/day), -25°C・20 days	-40	-43	-46		
13 Mar.	0°C→-15°C (1°C/day), -15°C・20 days	-34	-37	-40		
1978 24 Apr.	0°C・20 days	-10	-15	-20	-25	
11 May	0°C・20 days	-4	-8	-12	-16	

*: 0°Cで10日間ハードニング

Standing at 0°C for 10 days.

** : 0°Cで10日間放置後, 0°Cから-10°Cまで1日に1°Cの速度で冷却

After standing at 0°C for 10 days, cooled to -10°C at 1°C/day.

***: 0°Cから-20°Cまで1日に1°Cの速度で冷却したのち, -20°Cで20日間ハードニング

Then cooled from 0°C to -20°C at 1°C/day, standing at -20°C for 20 days.

表-3 産地間の耐凍性変異にもちいた材料と凍結実験の方法
Hardening method and freezing temperatures used to test provenance variation in the cold hardiness of plus trees and open-pollinated progenies.

材 料 Materials	時 期 Season	供試数 ⁽¹⁾ No. of materials	ハードニング法 ⁽²⁾ Hardening method	凍 結 温 度 Freezing temperature (°C)			
精英樹 クローン Plus trees	1972 18 Oct.	165c	0°C・10 days	-10	-15	-20	
	1978 20 Oct.	102	0°C・10 days	-10	-15	-20	
	13 Nov.	314	0°C・10 days, 0°C-15°C (1°C/day)	-18	-23	-28	-33
	1982 19 Feb.	452	0°C-30°C (1°C/day), -30°C 10 days, -35°C 10 days	-38	-43	-48	-53
	12 Mar.	311	0°C-15°C (1°C/day), -20°C 20 days	-30	-35	-40	-45
1979 13 Apr.	296	0°C・20 days, -5°C・10 days	-10	-15	-20	-25	
自然交雑 実生苗 Open- pollinated progenes	1981 27 Oct.	19p	0°C・10 days, 0°C-10°C (1°C/day)	-20	-25	-30	
	1979 20 Nov.	33	0°C-10°C (1°C/day), -10°C 10 days	-15	-20	-25	-30
	1980 17 Dec.	2	0°C-15°C (1°C/day), -15°C 10 days	-20	-25	-30	-35
	1981 20 Dec.	2	0°C-30°C (1°C/day), -30°C 10 days -35°C 10 days	-37	-40	-43	-46
	1979 19 Apr.	33	0°C・20 days	-10	-15	-20	-25
	1981 23 Apr.	24	0°C・20 days	-5	-10	-15	-20

(1) C: つぎ木クローン数 Number of clones

P: 産地数 Number of provenances

(2) 表-2を参照 See Table 2

木を予備凍結した場合のハードニング法とを区別して行った。

材料の耐凍度の低い獲得時期と消失時期のハードニング法は、材料を0℃の低温槽に10～20日間処理（表-2、-3では、0℃・10days、0℃・20daysと表示）した後に、所定の温度（例えば、表-2の9月25日には-3、-5、-8、-10、-15℃の5温度処理）で凍結実験を行う。材料の耐凍度が高まるにしたがい、0℃に放置する期間を短縮し、0℃以下の温度において段階的に温度低下を行う。例えば表-2の11月21日、表-3の11月13日と10月27日に採取した材料を0℃の低温槽に10日間処理（0℃・10days）し、その後に0℃から-10℃又は-15℃までを1日に1℃の速度で冷却（表-2、-3では、0℃→-10℃（1℃/day）又は0℃→-15℃（1℃/day）と表示）してから所定の温度で凍結実験を行った。12月～2月間のトドマツ冬芽の耐凍度は自然環境において-30～-35℃に耐えることが知られていることから、予備凍結の温度はさらに低い温度条件にする。表-2の1月24日に採取した材料は、0℃から-25℃までを1日に1℃の速度で冷却（0℃→-25℃（1℃/day））し、その後-25℃に20日間処理（-25℃・20days）し所定の温度で凍結実験を行った。表-3の1月19日に採取した材料は、0℃から-30℃までを1日に1℃の速度で冷却（0℃→-30℃（1℃/day））し、その後-30℃に10日間処理（-30℃・10days）し、さらに-35℃に10日間処理（-35℃・10days）してから所定の温度（-38、-43、-48、-53℃）で凍結実験を行った。

これら一連の実験結果の概要は後述するが、表-1のように段階的に温度を下げるハードニング法は耐凍性の増大期と消失期においては連続的に温度を低下させるハードニング法とは差がなくどちらの方法でもよいが、厳冬期には表-2、-3に示すように連続的に穏やかに温度を低下させるハードニング法のほうが潜在的な耐凍性を発現させるのに適し、ハードニング効果が大きいと思われる。

凍結のハードニング処理は植物体の栄養体や種子等の繁殖器官の貯蔵及び培養体等の長期保存等の前処理としても利用されている。これまで述べた方法は、トドマツ冬芽の耐凍性を高める方法として行ったが、この方法もさらに改良すべき条件も多数あり、実験機器類の開発も相まって、短期間に効果的なハードニング法が開発されることを期待する。

2. 1. 5 凍結後の材料融解法

実験材料の入っているポリエチレン袋を室温の常温下に放置するとトドマツ等の多くのマツ科の穂木については殺菌性が高いので、一ヶ月程度の放置でもって、凍結による傷害を受けた組織・器官は褐変し、健全な組織・器官は腐敗しない。材料の入っているポリエチレン袋は、温度処理毎に区分して水の若干（100cc程度）入っている大きなビニール袋（約45×50～60cm程度）に入れ、30～50日間放置する。この場合に肝心なことは、ビニール袋内の多数のポリエチレン袋が2日以上袋の内部で静置され、積み重ねられる事の無いように1日に1度はビニール袋内のポリエチレン袋を攪拌することである。

凍結し終えた穂木を袋から取り出し、水挿し等して被害判定をすることも³⁾等では実際に行われているが、資材や労力、場所も要するので、トドマツ等のマツ科ではその必要性があまり高くない。ただし、例えばバルサムモミやシベリヤモミ等は葉柄が乾燥に弱い樹種なのかビニール袋での放置管理を怠るとポリエチレン袋内部で脱葉しまうこともあって、葉の耐凍度のみを測定する場合には、あるいは腐敗し易い樹種にあっては、水挿しの方法が良い場合もある。

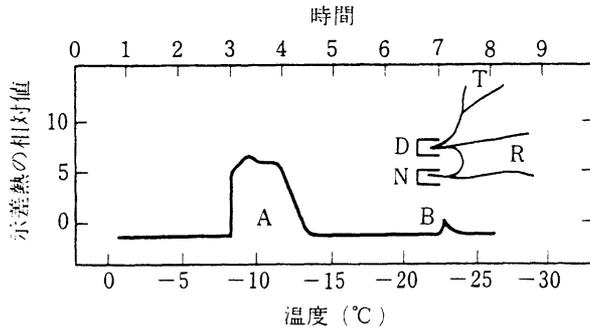


図-1 示差熱分析 (DTA)
 矢印は凍結開始、縦軸は示差熱の相対値を表す。R:二つの熱電対を直列に接続し、それらを乾燥材料 (D) と生材料 (N) に挿入。T: 温度測定用の熱電対。A, B: 凍結に伴う熱の放出 (酒井 1982)

2. 1. 6 示差熱分析法

これまで述べてきた凍結実験法は、実験材料の被害程度が所定の処理温度において統計処理できる程度の差異 (分散) の発生を期待して行うものである。よって、実験材料が何度で凍ったかは分からない。

これに対して、示差熱分析法 (differential thermal analysis, DTA) は実験材料が何度で凍るか、過冷却や器官外凍結現象を知るために用いられている。この方法は、図-1に示すように、直列に接続した銅・コンスタンタン熱電対線の

一方を材料に挿入し (図-1のN)、他方の熱電対線は乾燥し水分を含まない同じ大きさの材料に挿入して冷却する。この冷却中に液体 (水) から固体 (結晶) への相変化があれば、潜熱の放出が認められる。この場合に、材料に別の熱電対を挿入して測温していれば材料組織の凍結温度と凍結に伴う潜熱のおおよその相対値がわかる。

表-4 被害区分と被害指数
 Index number for freezing injury.

	被害症状 Symptom	被害指数 Index number
健全 Healthy		1
軽害 Slight injury	1部にかっ色の細胞 Partially dark brown	2
虫害 Medium injury	1部に生きた細胞 Partially living tissue	3
重害 Heavy injury	全体にかっ色をおびる Wholly dark brownish	4
枯死 Dead		5

2. 2 実験結果の数値化

2. 2. 1 被害の判定

先に述べたように、凍結実験法は、実験材料の被害程度が所定の処理温度において統計処理できる程度のバラツキの発生を期待して行うものである。被害程度は表-4に示すように、実験材料の組織や器官の被害症状を観察して被害指数を与える。

被害症状の観察は、凍結処理を終え、一ヶ月程度の放置された材料をポリエチレン袋から取り出し、カッター等で冬芽や形成層を切断し、肉眼又は実態顕微鏡下で観察し、褐変の程度や健全、枯死によって指数化する。

2. 2. 2 判定値の数量化

凍結実験の結果は、処理した穂木を表-4の被害区分にしたがい、クローン又は母樹のそれぞれの切り枝の被害指数 (x) から平均被害指数 FII (Freezing Injury-Index, $X = \sum x/n, n$ は切り枝の数で、クローンの n は 5 本、実

生である母樹では10~20本)を算出する。凍結実験は一般的に3~5区の処理温度区を設定するが、それぞれの処理区において被害程度が異なることから、用いた材料のクローン又は母樹の平均被害指数の総平均値が約3程度の処理温度区を抽出して、その温度処理のみの被害指数をその後の解析に用いる。この際に、生存割合を算出する場合は平均被害指数(X) 2.5以下のものを生存と認めた。

統計処理は、平均被害指数Xを \sqrt{X} 又は $\sqrt{X+0.5}$ に、百分率は $\text{Arcsin} \sqrt{\%+1}$ に変換してから行った。

3 トドマツ苗木の各器官の耐凍性変動に与える温度の影響

3.1 耐凍性増大に及ぼす温度の影響

トドマツ耐凍性に関する大規模な材料を扱う産地変異の研究や大量の気象害抵抗性個体の凍結実験を開始するに当たり、1971年の9月下旬から12月下旬までの自然条件下においてのトドマツ苗木の耐凍性の増大過程と気温・地温の変化を図-2に示した。用いた材料は羽幌産5年生苗の切り枝である。参考までに、羽幌産苗木のトドマツの耐凍性は北海道産トドマツの中で耐凍性の最も低い産地である。トドマツ苗木の器官の違いによる耐凍性の増大過程の結果の詳細内容は原著論文を参照されたい。

この苗木と同一のものを用いて、同時期のハードニング効果の季節による違いを知るために、表-1の上段の条件によってハードニングを行い、表-1の下段のような実験結果を得た。

さらに、トドマツ冬芽の耐凍性増大に及ぼす温度の影響を知るために、特にこの時期における詳細なハードニング効果を知るために鉢植への足寄産苗木トドマツを野外と温室の環境条件の異なる場所において実験した。その結果を図-3に総括して示した。10月中旬の平均気温は10℃前後であるが、15℃と12℃の温度のガラス室においた鉢植え苗木の冬芽の耐凍度は、その後に5℃しか高まらない。しかし、0℃の低温室と野外に置かれたものの耐凍性は逐次高まり、-25℃までの凍結に耐えるようになった。さらに、この苗木を-5℃に8日間処理すると-30℃の凍結に耐え、ハードニングの効果が認められた。

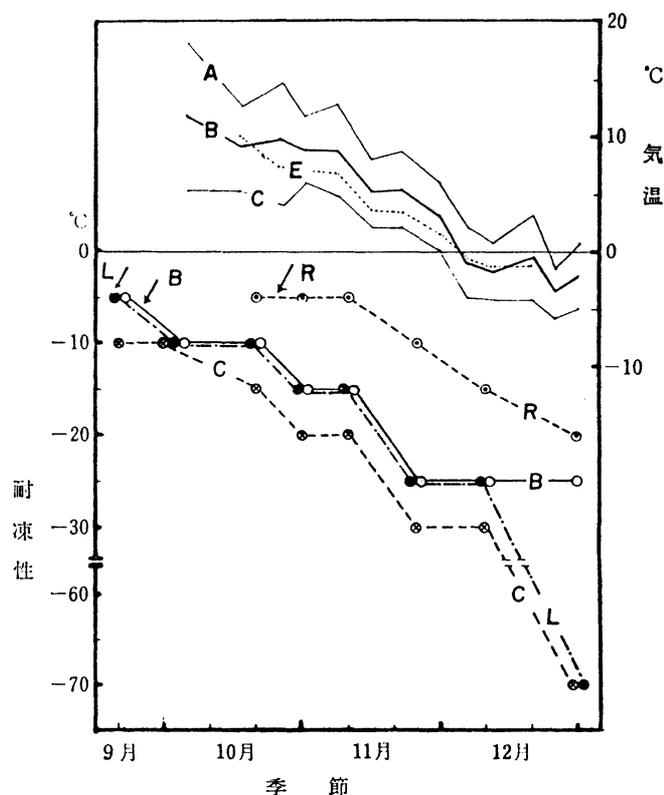


図-2 トドマツ組織の耐凍性の増大過程

材料は羽幌産5年生苗の切り枝、耐凍性は苗木の各組織が16時間の凍結に害なく耐える最低温度(°C)で表わした。図中の略号は次のとおり、A(最高気温の平均)、B(平均気温)、C(最低気温の平均)、E(地表面下5cmの地温の平均)を表わし、気温は札幌気象台、地温は北大低温科学研究所の苗畑の観測、苗木の各組織の略号はR(根)、B(芽)、L(葉)、C(皮部の形成層)を表わす

3. 2 耐凍性の保持に及ぼす温度と休眠の影響

次に、獲得された耐凍性の保持に及ぼす温度の影響について実験した。図-4には、苗木が雪に覆われないように自然日長の無加温ビニールハウスにおかれていたものを10月11日から2月6日までの間に、無加温ビニールハウス(図中のV)から異なる時期(図中のA~D)に17°C(最低10~最高24°C)の温室に移動したときの耐凍性の変動を示した。11月上~中旬に温室に移動した苗木は、移動した時の-15°Cの耐凍度を1月上旬まで保持し、冬芽の開芽の動きが全くないことから、休眠中の苗木はある限界を越えて耐凍性を低下させない機構が働いていると考えられる。しかし、無加温ビニールハウス(V)でトドマツ冬芽の耐凍性の著しく高まった苗木の12月初旬から17°Cの温室へ移動すると、これらの苗木の耐凍性は日増しに低下した。1月中旬から2月上旬の厳冬期のトドマツ冬芽は-30°Cに耐えるが、17°Cの温室に移動すると1日に1.5°C~2.1°Cの割合で低下し、著しくデ・ハードニング(図中のC,D)された。図-4中のA処理とB処理の時期の違いからトドマツ冬芽の休眠は、11月の下旬から12月上旬の時期に破れていることが認められる。厳冬期であっても、休眠の破れたトドマツ冬芽の耐凍性は17°Cの温室に置くと著しく低下したが、野外の自然環境では高い耐凍性を保持しているのは、外界の低い温度に保持されているからと考えられる。

育成箱に播き付けし、野外の自然状態で養苗したトドマツ苗木(9産地15林分の111母樹)を10月下旬から11月下旬の間に3回にわたり、温室(最低温度15°C以

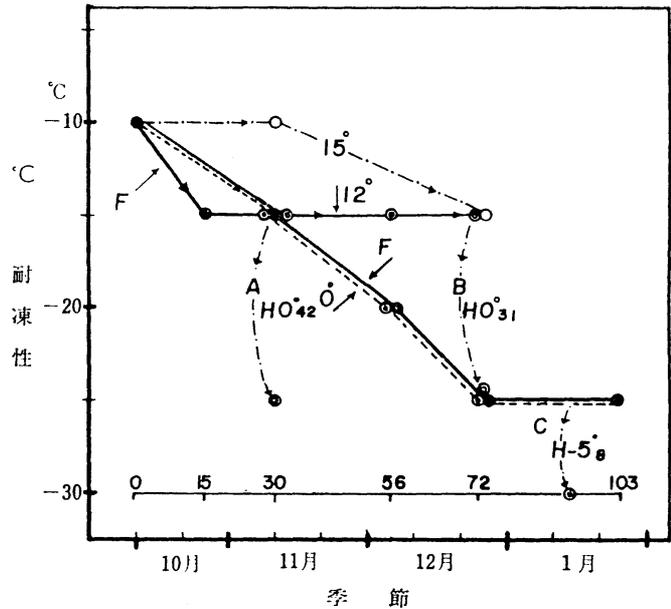


図-3 トドマツ冬芽の耐凍性増大におよぼす温度の影響
材料は野外におかれた足寄産鉢植苗木、温度処理の条件は15°Cガラス室,12°Cガラス室,0°C低温室,それに野外(F),なおHO₄₂は0°Cで42日間ハードニング(A),HO₃₁は31日間ハードニング(B),H-5₈は-5°Cに8日間ハードニング(C)されたことを示す

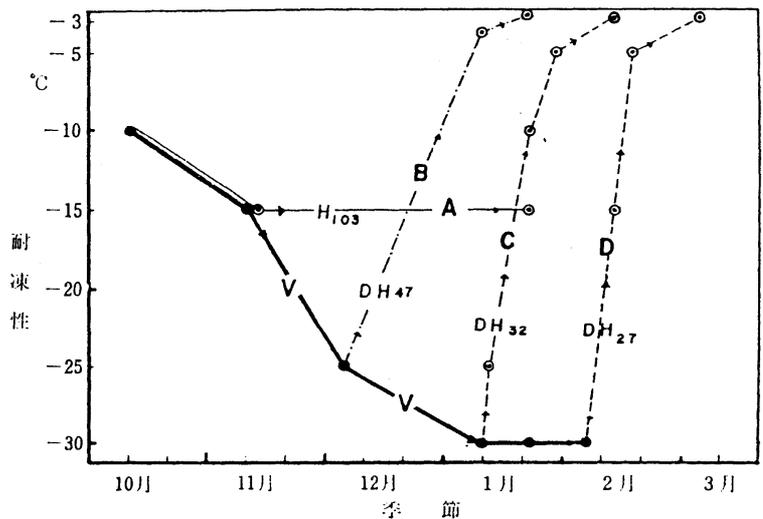


図-4 トドマツ冬芽の耐凍性の変動におよぼす温度の影響
無加温のビニールハウス(V)におかれたトドマツ鉢植5年生苗木を10月11日から2月6日までの異なる期間、17°C(最低10~最高24°C)の温室においた。その期間は103日(A),47日(B),32日(C),27日(D)である、DH47は17°Cの温室に47日間デ・ハードニングを示す。デ・ハードニングによる耐凍度の低下の割合は-5°Cに達するのにBは0.54°C/日、Cは1.50°C/日、Dは2.08°C/日である

上に管理)に移動して休眠時期と耐凍性を調べた。同じ苗木は自然状態で春まで放置し、5月中旬における自然開芽率を調べた。トドマツ冬芽の11月中旬において、温室に移動して開芽した割合と-25℃で凍結処理したときの凍害指数との関係を図-5に示した。図中に示されているように、トドマツ冬芽の11月中旬における開芽率と凍害指数との相関係数は著しく高く($r=0.7069^{**}$)、耐凍性の高い産地・林分の苗木冬芽は自発休眠が破れにくい傾向が認められた。なお、トドマツ冬芽の11月中旬における凍害指数と5月中旬の自然開芽率とは相関($r=0.2370$)がなかった。

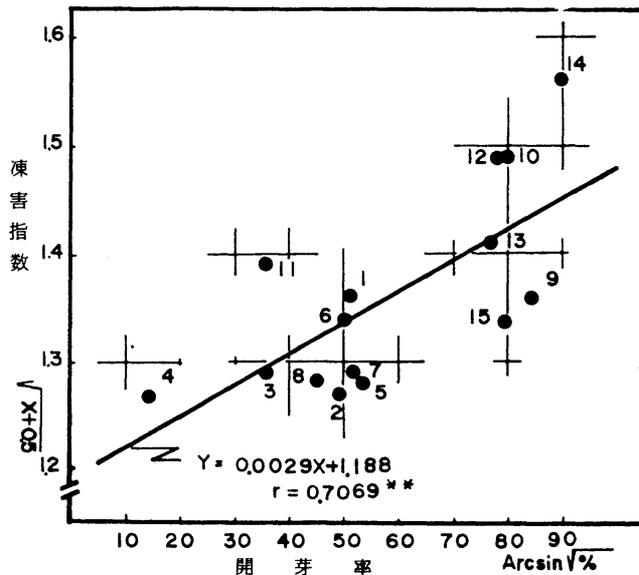


図-5 トドマツ苗木の11月中旬における凍害指数と開芽率

4 モミ属, トウヒ属, マツ属耐凍性の季節変動とハードニング効果

4.1 トドマツ冬芽の耐凍性の季節変動とハードニング効果

トドマツ精英樹クローンの当年枝の冬芽について、ハードニング法による耐凍度の季節変化を図-6に示した。

図中には、材料をクローン集植所から採取後、直ちに2時間に5℃の冷却速度で凍結した耐凍度(ノン・ハードニングによる凍結法)と材料を採取後に表-2に示した方法でハードニングしたのちの耐凍度を示した。

図-6のトドマツ冬芽の耐凍度の季節変化は、図-1に示したトドマツ組織の耐凍性増大期の冬芽とほぼ同じ過程をたどっており、平均旬最低気温の変化に追随している。トドマツ冬芽の耐凍性の獲得時期においてはノンハードニング処理の耐凍度と平均旬最低気温との温度間差は約10~15℃もあるが、耐凍性

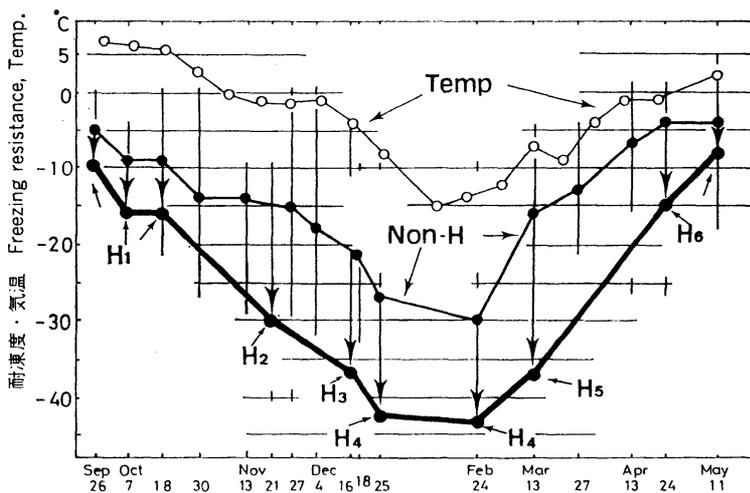


図-6 トドマツ冬芽の耐凍度と平均旬最低気温の季節変化
Seasonal changes in the cold hardiness of winter buds of Saghalin fir and decade minimum temperatures.

Note : Temp: 平均旬最低温度(江別) Mean decade minimum (Ebetsu).
Non-H: ノン・ハードニング Non-hardening.
H₁~H₆: ハードニング Hardening(see Table 5).
H₁: 0℃・10days. H₂: 0℃・10days, 0°to-10℃・1℃/days.
H₃: 0°to-20℃・1℃/days, -20℃・20days.
H₄: 0°to-25℃・1℃/days, -25℃・20days.
H₅: 0°to-15℃・1℃/days, -15℃・20days. H₆: 0℃・20days.

の消失時期には約5℃程度である。トドマツ冬芽のノンハードニングによる耐凍度とハードニングによる耐凍度の差は9月の下旬から10月下旬では5℃程度であるが、その後は10~15℃の間差があり、この現象が4月下旬まで続き、5月上旬になってその間差は約5℃程度となる。特に厳冬期のトドマツ冬芽の耐凍度はこれまでに約30℃程度とされていたが材料の産地系統によって異なるが、-38~-48℃程度であることが、これらハードニング法に用いることによって初めて確認された。

4. 2 モミ属, トウヒ属, マツ属耐凍性の季節変動とハードニング効果

表-5にはモミ属8種16産地についての耐凍性増大期における耐凍度と一部のハードニング効果を示した。凍結実験は表-1にしたがい行ったもので、ハードニング方法が完全でないためにハードニング効果は高くはない。このことは以下のトウヒ属とマツ属においても同様である。耐凍性の種間の違い、器官の違いが大きく、種内産地の違いはトドマツのみに認められたが、モミ属の耐凍性増大期のおおよその耐凍度が知られた。

表-6は、トウヒ属8種17産地についての耐凍性増大期における耐凍度と一部のハードニング効果を示した。耐凍性の種間の違い、器官の違いが大きく、さらに種内産地の違いは多くの樹種で認められ、トウヒ属の耐凍性増大期のおおよその耐凍度が知られた。

表-7は、マツ属8種13産地についての耐凍性増大期における耐凍度と一部のハードニング効果を示した。耐凍性の種間の違い、器官の違いが大きく、さらに種内産地の違いは天然分布の広いストロブーマツとヨーロッパアカマツにおいては大きな差異が認められ、マツ属の耐凍性増大期のおおよその耐凍度が知られた。

以上、述べてきたトドマツに関する人工凍結実験による耐凍性の検定法を用いた研究成果は、トドマツ耐凍性

表-5 モミ属の耐凍性増大過程とハードニング効果

樹種名	種子産地	9月下旬			10月下旬			11月下旬			12月下旬			2月下旬						
		B	L	C	B	L	C	B	L	C	B _H	L _H	C _H	B _H	L _H	C _H				
<i>Abies homolepis</i>	ウラシノモミ	長野県・諏訪	-5	-5	-10	-15	-10	-20	-15	-15	-20	-30	-30	-30	-30	-30	-60	-30	-50	-90
<i>A. homolepis</i>	ウラシノモミ	栃木県・日光				-15	-10	-20	-17	-17	-20	-30	-30	-30	-30	-30	-60	-30	-60	-90
<i>A. firma</i>	モミ	長野県・野尻	-5	-5	-10	-5	-10	-15	-10	-10	-17	-30	-25	-40				-30	-30	-30
<i>A. sahalinensis</i>	トドマツ	北海道・檜山	-5	-5	-10	-10	-5	-15	-15	-10	-20	-30	-40	-80				-30	-80	-90
<i>A. sahalinensis</i>	トドマツ	北海道・倶知安	-5	-5	-10	-10	-5	-15	-15	-10	-15	-30	-80	-80				-30	-50	-50
<i>A. sahalinensis</i>	トドマツ	北海道・佐呂間	-10	-5	-10	-10	-10	-15	-15	-10	-15	-30	-80	-80	-35	-90	-90	-30	-50	-50
<i>A. sahalinensis</i>	トドマツ	北海道・根室	-10	-10	-15	-15	-10	-15	-17	-15	-20	-30	-80	-90	-35	-90	-90	-30	-90	-90
<i>A. mariesii</i>	アオモリトドマツ	長野県・王滝				-10	-15	-15	-10	-15	-17	-30	-30	-50	-30	-60	-60			
<i>A. mariesii</i>	アオモリトドマツ	青森県・八甲田	-10	-10	-10	-15	-10	-15	-15	-10	-17	-30	-60	-60	-30	-70	-70			
<i>A. veitchii</i>	シラベ	山梨県・富士吉田				-15	-10	-15	-15	-15	-20	-30	-30	-60	-30	-70	-70	-30	-70	-70
<i>A. veitchii</i>	シラベ	長野県・諏訪	-10	-5	-10	-15	-10	-15	-15	-15	-20	-30	-30	-60	-30	-70	-70			
<i>A. alba</i>	ヨーロッパモミ	ドイツ	-5	-10	-15	-15	-15	-20	-15	-15	-20	-30	-40	-40						
<i>A. balsamea</i>	ハノキモミ	アメリカ, Wisconsin	-10	-10	-15	-20	-20	-25	-25	-30	-40	-40	-90	-90				-40	-90	-90
<i>A. balsamea</i>	ハノキモミ	カナダ, New Brunswick				-20	-20	-25	-25	-40	-50	-40	-90	-90				-40	-90	-90
<i>A. concolor</i>	ソノモミ	アメリカ, Washington	-10	-15	-15	-15	-15	-15				-30	-60	-60						
<i>A. concolor</i>	ソノモミ	アメリカ, Rocky Mt.				-20	-20	-25				-30	-60	-60						

注)

- 1) 耐凍度は16時間の所定の温度に被害なく耐えた最低温度(℃)で示した。
- 2) 樹木の器官名は、冬芽(B)、針葉(L)、形成層(C)の略記号で示し、ハードニング処理した場合はそれぞれ、BH、LH、CH、と表した。
- 3) ハードニング処理は、-5℃に10日間、-10℃に3日間処理後、-15℃、-20℃、-25℃に1日置いてから所定温度で凍結した。
- 4) 材料の採取と凍結実験は、1972年の9月下旬から1973年の2月下旬までに行った。

表-6 トウヒ属の耐凍性増大過程とハードニング効果

樹種名	種子産地	9月下旬			10月下旬			11月下旬			12月下旬			2月下旬						
		B	L	C	B	L	C	B	L	C	B _H	L _H	C _H	B _H	L _H	C _H				
<i>Picea glenii</i>	アエゾマツ	北海道・北見	-10	-5	-5	-15	-20	-25	-20	-40	-50	-40	-90	-90	-40	-90	-90	-40	-50	-70
<i>P. glenii</i>	アエゾマツ	北海道・一の橋	-5	-5	-5	-15	-20	-25	-20	-30	-40	-40	-70	-70	-40	-90	-90	-30	-50	-70
<i>P. glenii</i>	アエゾマツ	岩手県・早池峰山	-5	-5	-5	-15	-20	-15												
<i>P. jezoensis</i>	エゾマツ	北海道・遠軽	-5	-5	-5	-15	-20	-25	-20	-30	-40	-30	-50	-50	-30	-90	-90	-30	-50	-50
<i>P. jezoensis</i>	エゾマツ	北海道・焼尻	-5	-5	-5	-15	-20	-25	-20	-30	-30	-30	-50	-70	-30	-90	-90			
<i>P. jezoensis</i>	エゾマツ	北海道・下川	-5	-5	-5	-15	-20	-20	-15	-20	-30	-30	-70	-90	-30	-90	-90	-25	-50	-50
<i>P. j. hondoensis</i>	トウヒ	長野県・諏訪	-5	-5	-5	-15	-20	-20	-20	-30	-40	-30	-70	-70	-30	-50	-50	-30	-40	-40
<i>P. koyamaii</i>	ヤマガタトウヒ	長野県・諏訪	-5	-5	-5	-15	-15	-25	-20	-20	-40	-30	-30	-50	-30	-50	-50	-40	-50	-50
<i>P. abies</i>	ヨーロッパトウヒ	スウェーデン	-15	-10	-15	-15	-15	-30	-25	-30	-50	-40	-70	-70	-40	-90	-90	-30	-50	-70
<i>P. abies</i>	ヨーロッパトウヒ	ドイツ	-5	-5	-5	-15	-15	-30	-25	-30	-50	-40	-70	-70	-40	-90	-90	-30	-70	-70
<i>P. abies</i>	ヨーロッパトウヒ	チェコスロバキア				-15	-15	-30	-20	-25	-40	-30	-60	-60	-30	-90	-90	-30	-90	-90
<i>P. rubens</i>	ルヘンストウヒ	アメリカ, New York	-10	-10	-10	-20	-20	-40	-20	-50	-70	-30	-50	-90	-40	-80	-90	-40	-70	-70
<i>P. mariana</i>	マリナトウヒ	アメリカ, N. Michiga	-5	-5	-10	-25	-30	-40	-25	-50	-70	-40	-70	-90	-40	-90	-90	-40	-90	-90
<i>P. glauca</i>	グラウカトウヒ	カナダ							-25	-70	-70						-50	-90	-90	
<i>P. glauca</i>	グラウカトウヒ	アメリカ, Minnesota							-20	-60	-70									
<i>P. glauca</i>	グラウカトウヒ	アメリカ, Wisconsin							-20	-60	-70									
<i>P. glauca</i>	グラウカトウヒ	アメリカ, Michigan	-10	-10	-10	-20	-30	-40	-25	-50	-70	-40	-70	-90	-40	-90	-90	-50	-50	-70

注)

耐凍度の表示、実験用穂木の器官名及びハードニング処理方法などは、表-5に同じ。

表-7 マツ属の耐凍性増大過程とハードニング効果

樹種名	種子産地	9月下旬			10月下旬			11月下旬			12月下旬			2月下旬						
		B	L	C	B	L	C	B	L	C	B	L	C	B _H	L _H	C _H				
<i>Pinus densiflora</i>	アカマツ	青森県・野辺地	-5	-5	-5	-10	-10	-15	-15	-15	-17	-30	-40	-60	-30	-40	-60	-30	-50	-50
<i>P. thunbergii</i>	クロマツ	青森県・野辺地	-5	-5	-5	-10	-10	-10	-10	-10	-15	-30	-30	-50	-30	-40	-50	-40	-30	-50
<i>P. pumila</i>	ハイマツ	北海道・弟子屈				-15	-15	-25	-15	-15	-20	-30	-40	-90	-70	-70	-90			
<i>P. resinosa</i>	レジノサマツ	アメリカ, Wisconsin				-20	-20	-40										-90	-70	-90
<i>P. banksiana</i>	バンクスマツ	アメリカ, Michigan	-10	-10	-15	-25	-25	-30										-90	-90	-90
<i>P. rigidata</i>	リキテグマツ	韓国	-15	-10	-15	-15	-10	-15												
<i>P. strobus</i>	ストロブマツ	カナダ, Quebec				-15	-15	-20				-90	-90	-90	-90	-90	-90	-90	-90	-90
<i>P. strobus</i>	ストロブマツ	アメリカ, New York				-15	-15	-20				-70	-70	-70	-90	-90	-90	-90	-80	-90
<i>P. strobus</i>	ストロブマツ	アメリカ, Virginia				-10	-10	-10				-40	-70	-70	-70	-70	-70	-70	-90	-90
<i>P. sylvestris</i>	ヨーロッパアカマツ	スウェーデン	-15	-10	-15	-25	-20	-30				-90	-90	-90	-90	-90	-90	-90	-90	-90
<i>P. sylvestris</i>	ヨーロッパアカマツ	ドイツ	-10	-10	-15	-15	-15	-30							-90	-90	-90	-90	-90	-90
<i>P. sylvestris</i>	ヨーロッパアカマツ	ブルガリア				-10	-10	-20							-60	-70	-90			
<i>P. sylvestris</i>	ヨーロッパアカマツ	スペイン				-10	-10	-15				-20	-50	-50	-70	-50	-70	-70	-50	-70

注)

耐凍度の表示、実験用穂木の器官名及びハードニング処理方法などは、表-5に同じ。

の自然集団の遺伝的な変異に関する研究及びトドマツの精英樹と耐凍性個体の耐凍性の検定等に利用され、多くの知見を得た。しかし、これらのに関する研究成果はここでは割愛する。

参考文献

- 1) 栄花 茂・酒井 昭：トドマツ苗木の耐凍性変動に及ぼす温度の影響，日林誌，54(12)，412-417，(1972)
- 2) 栄花 茂・酒井 昭：トドマツ冬芽の耐凍性と休眠について，89日林論 (1978)
- 3) Shigeru Eiga and Akira Sakai: Altitudinal Variation in Freezing Resistance of Sakhalin Fir (*Abies sachalinensis*),

Can.J. Bot. 62, 156-160, (1984)

- 4) 栄花 茂：北海道におけるトドマツの耐凍性に関する生態遺伝学的研究，林育研報， 2 ,61-107, (1984)
- 5) 栄花 茂，飯塚和也，丹藤 修：モミ属，トウヒ属及びマツ属の耐凍性増大期の耐凍度とハードニング効果
(未発表)
- 6) Shigeru Eiga and Akira Sakai：Regional Variation in Cold Hardiness of Sakhalin Fir (*Abies sachalinensis* MAST.) in Hokkaidou, Japan, Plant Cold Hardiness (Alan R.Liss, Ina.) 169-182, (1987)
- 7) 大島誠一・長谷川洋三・酒井 昭：マツ属の耐凍性と分布 I 耐凍性の季節変動，日生態誌会 31, 79-89,
(1981)
- 8) 岡田 滋：北海道におけるトドマツ (*Abies sachalinensis* MAST.) の変異について，林育研報， 1 ,15-92,
(1983)
- 9) 酒井 昭：植物の耐凍性と寒冷適応，学会出版センター, 469pp, (1982)
- 10) 酒井 昭編：凍結保存—植物・動物・微生物—，朝倉書店, 300pp, (1992)
- 11) 酒井 昭：植物と低温，東京大学出版会, 138pp, (1983)

**A testing method the cold hardiness of Sacharin (*Abies sachalinensis*)
by way of artificial freezing.**

Shigeru EIGA , Kazuya IZUKA, and Osamu TANDO

summary

The study of cold hardiness in plants advanced remarkably through the development of experimental techniques beginning in the 1970's. Through the artificial freezing of forest trees, a precise experimental result can be attained that is not provided by study of genetic variation and by taking into account complicated physiological phenomena. By using the following experimental materials, a wide sampling, and the following freezing method, a higher level of experimental precision can be attained. Experimental factors include genetical management concerning provenance, forest stand, seed tree, a clone and an individual. These factors are analyzed statistically, and a hardening method is used as an experimental technique to determine which plant has the maximum cold hardiness in extream environments.