



## シモバシラ (*Keiskea japonica* Miq.) 氷晶形成における通水経路

### および氷成長面

<sup>1</sup>岩手大学, <sup>2</sup>帯広畜産大学, <sup>3</sup>サスカチュワン大学  
<sup>1</sup>松嶋 卯月, <sup>2</sup>武田 一夫, <sup>3</sup>Karen K. TANINO

### Water Pathway in Xylem during Ice Segregation by *Keiskea japonica* Miq.

<sup>1</sup>Uzuki MATSUSHIMA, <sup>2</sup>Kazuo TAKEDA, <sup>3</sup>Karen K. TANINO

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, Iwate University, Ueda, Morioka, Iwate 020-8550 Japan

<sup>2</sup>Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada, Obihiro, Hokkaido 080-0834 Japan

<sup>3</sup>Dept. Plant Sciences, College of Agriculture and Bioresources, University of Saskatchewan,  
 51 Campus Drive, Saskatoon SK S7N 5A8 Canada

In order to clarify the role of the vascular system for creating ice segregation, the water pathway through the stem of *Keiskea japonica* and the freezing front of ice segregation were investigated. Harvested stems of *Keiskea japonica* were used as plant samples. The water pathway was visualized with a 2.5 mM fluorescein solution. After ice segregation was induced, the stem was tightly fixed on a microtome that cross sectioned the stem every 40  $\mu\text{m}$ . The light source with excitation filter illuminated the stem cross section. Fluorescence emission was captured by using CCD camera with fluorescent filter. Three-dimensional fluorescent image was reconstructed from the series of captured images. By observing horizontal cross sections, fluorescent illumination reached to the periphery of xylem. It means the freezing front should be the xylem surface. Pits on xylem cells, were 0.4  $\mu\text{m}$  of averaged short diameter. According to Ozawa (1989), ice segregation grew on the surface of a micropore membrane filter ( $\leq 0.2 \mu\text{m}$ ) that were placed in between supercooling water and surrounding atmosphere below 0°C. We anticipate the mechanism of ice segregation is based on the pore of the xylem pits and should be similar to the micropore membrane filter.

(Received Jul. 8, 2013; Accepted Oct. 7, 2013)

### 緒 言

シモバシラ (*Keiskea japonica* Miq.) は、南は九州地

方から北は本州の関東地方までに分布するシソ科の多年草で、冬期に気温が零下になると茎の周囲に板状の氷晶が形成されることで知られる。この現象を観察するためによく知られた産地である高尾山（東京都八王子市高尾町）等には多くの方が訪れるが、一方で現象そのものについての科学的研究はあまり行われていない。犀川らは、シモバシラ氷晶形成時に水が茎を上昇する経路を肉眼、顕微鏡観察により

#### 研究報告

[Key words: Fluorescence imaging, 3-D observation, *Keiskea japonica*, 蛍光イメージング, 三次元観察, 霜柱]

(32)

観察することで木部表面に必ず着氷することを明らかにし、木部にある柔組織性放組織とその近傍に位置する放射状に配列した細胞間隙は、氷晶形成と無関係であるとした<sup>1,2)</sup>。しかし、氷晶成長時の水の経路および氷成長面がどこかについてはいまだ解明に至っていない。そこで、植物茎内部の通水経路を蛍光色素で着色することで細胞レベルで三次元観察する装置を作成し、シモバシラ茎内の氷晶形成時の通水経路および氷成長面がどこであるかを調査した。

## 材料および方法

### 1. 実験材料

東京都、陣馬山において2012年11月9日に採取したシモバシラを実験材料として用いた。シモバシラ茎は採取後約20 cmに切りそろえ、水道水中に浸け家庭用冷蔵庫内で約2ヶ月間保存した。なお、採取は自然公園法の許可を得て行った。

### 2. 冷却装置

氷晶形成過程におけるシモバシラに蛍光色素溶液を供給すると、蛍光観察により容易にその位置を特定できる。まず、氷晶出現温度である $-4^{\circ}\text{C}$ にシモバシラ茎を置き氷晶を形成させた。根を取り除いた状態でも氷晶が形成されるため<sup>3)</sup>、シモバシラ茎下端をフルオレセイン溶液入の断熱水槽に浸けた。水槽温度をペルチェユニットで温度制御し、氷晶形成時の土壌温度である $0^{\circ}\text{C}$ に保持した。断熱水槽およびシモバシラ容器は断熱容器で覆い、さらに断熱容器は恒温装置に設置した。恒温装置の温度設定は $-4^{\circ}\text{C}$ とし、内部の断熱容器はさらに別のペルチェユニットで温度制御を行った。

### 3. 三次元観察装置

氷晶形成後、蛍光試薬で染色されたシモバシラ茎を1軸ステージに固定し $40\ \mu\text{m}$ ずつ切断面を送り出した後、ブレードで切削を行った。中心波長 $472\ \text{nm}$ の励起光源を切断面に照射し、中心波長 $520\ \text{nm}$ の蛍光フィルタを設置したカメラを用いて蛍光画像撮影を行った。得られた連続した切断面画像から、三次元画像を再構築した。また、切断面の構造を確認するために、蛍光画像を撮影した後、同一断面に白色光を照射し明視野撮影も行った。

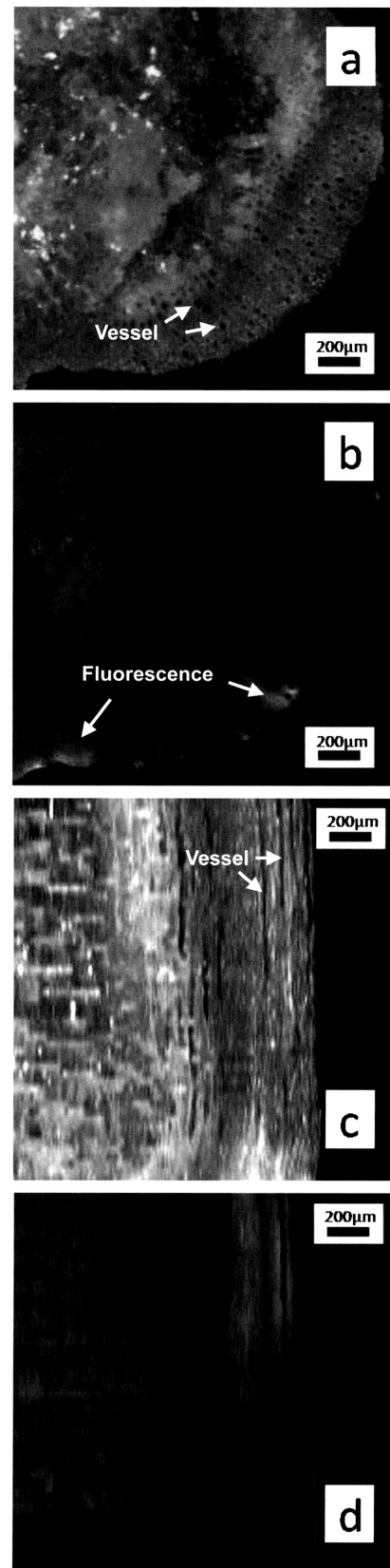


Fig. 1. Monochromatic and fluorescent images of *keisukea japonica* Miq. stem. a: horizontal monochromatic image, b: horizontal fluorescent image c: vertical monochromatic image, d: vertical fluorescent image

## 結 果

犀川の報告と同様、師部、皮層および表皮は、氷晶形成時に維管束形成層を境目として茎から剥離した<sup>2)</sup>。明視野撮影で得られた水平断面画像 (Fig. 1-a) は、茎中心部の髓およびその周囲の木部の組織構造をよく示し、導管の分布を観察可能であった。画像処理によって再構築された明視野垂直断面画像は、髓の柔組織と木部、および、縦方向に一樣に長い導管の構造を確認できる画像分解能を有した (Fig. 1-c)。明視野画像と蛍光画像をあわせて観察することで、蛍光色素で着色した部位と茎の組織との位置関係を確認することが可能であった。蛍光が見られた部位は導管を含む木部であった (Fig. 1-b, d) が、特に導管周辺から茎表面にかけて強く現れた。

## 考 察

組織構造がよく観察された三次元明視野画像と通水経路が観察された三次元蛍光画像とを比較すると、導管周辺から茎の表面に強い蛍光が見られた。これは、水が茎の導管を通過して上昇した後周囲に移動して木部表面に達したとき、凍結して氷が成長することを暗示している。木部内における水移動の痕跡は不規則で、水移動が植物の生理的理由から起こったというより、物理的理由によってもたらされたことを物語っている。

Ozawa らは、土壌で起こる霜柱の発生メカニズムを説明するため、過冷却水の上に細孔が分布するメンブレンフィルタを置き、その上で氷晶を析出させた。氷晶は、フィルタの細孔によって過冷却水内への侵入が阻止されると、析出を続ける。このとき氷は 0°C よりわずかに低い負の温度にあり、この 0°C との温度差である過冷却度と、細孔直径との関係を考察した<sup>4)</sup>。一般に、過冷却度が低くなると氷の曲率半径が小さくなり、細孔へ侵入しやすくなる。もし、半径が細孔の半径より小さく、細孔への氷の侵入を許すと、過冷却水は凍結して析出が停止する。すなわち、細孔が小さいほど過冷却度の許容範囲は広く、氷晶析出は起こりやすいことになる。

一方、武田らの電子顕微鏡の観察によると、シモバシラの氷晶析出後の木部表面にピットとよばれる細孔が存在した<sup>5)</sup>。ピットの平均短径は 0.3 μm で、フィルタの細孔径 0.2 μm と類似している。こうしたピットによる細孔構造が氷の侵入を阻止し、過冷却状態にある氷表面で大きな吸引力を発生させることで、導管を通水経路として水が供給され、連続的な氷晶析出を起こすと考えられる。

## ま と め

三次元蛍光画像は、垂直断面における導管の構造を明確に識別できる画像分解能を有した。シモバシラ茎の蛍光画像において蛍光が見られた部位は導管を含む木部であった。すなわち、導管周辺から茎表面にかけて強い蛍光が見られ、蛍光溶液が導管を通り上昇し、外気との境界で凍結したことが示された。

## 謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会の科学研究費助成事業 (課題番号 24658207) で行った。

## 文 献

- 1) 犀川政稔: シモバシラによる霜柱形成におけるいくつかの新知見, 東京学芸大学記要自然科学, **58**, 151-161 (2006)
- 2) 犀川政稔: シモバシラによる霜柱形成と木部にできる二次的な水の通路, 東京学芸大学記要自然科学, **59**, 55-59 (2007)
- 3) 鈴木綾, 武田一夫, Karen Tanino: シソ科植物「シモバシラ」による氷核活性機能, 雪氷研究大会, 福山 9月(2012)
- 4) Ozawa H, Kinoshita S: Segregated ice growth on a microporous filter, *J Colloid Interface Sci*, **132**, 113-124 (1989)
- 5) 武田一夫, Karen Tanino, 松嶋卯月: シソ科植物「シモバシラ」の氷晶析出に関わる茎の構造, 雪氷研究大会, 福山 9月(2012)