

カラマツ花粉の人工発芽に関する研究 (II)

梶 勝次* 久保田泰則* 市河三次**

Artificial germination of *Larix* pollen (II)

Katsuji KAJI*, Yasunori KUBOTA*
and Sanji ICHIKAWA**

はじめに

北海道の造林にとってカラマツの育種はきわめて重要な課題である。とくにグイマツとニホンカラマツの雑種生産技術の開発、実用化が急がれていることは第1報で述べた。筆者らは、これらの研究を遂行するうえで、交配の技術的な問題として欠くことのできない、花粉の貯蔵および、それに関連して生存力検定のため、人工発芽とその方法、および受精機構についての究明を重ねている。また最近、人工交配を行なう機会が多くなり、それにさきだつての花粉の生死判定は重要と考えられる。

カラマツ花粉の人工発芽についての究明はすでに、原田・柳沢(1964)、百瀬(1955)、BARNER and CHRISTIANSEN(1960)、市河・久保田・安達(1969)、CHRISTIANSEN(1970)、そのほか多くの研究者により調べられているが、その人工発芽は困難とされており、最終的な発芽の仕かたについては、ほとんど明らかにされていない。筆者らは前報で、通常の寒天培地上でのカラマツ花粉のうごきを調べたところ、カラマツ花粉はスギ科(Taxodiaceae)の花粉と類似の発芽の仕かたを示すと考えられることを報告したので、さらに無菌操作を加えて、長時間発芽床上的でのうごきを観察した。ここにその結果と実用的な花粉の生死判定法についての知見を得たので、その概要を報告する。なお、これらの研究を行なうにあたり御教示を賜った京都大学 四手井綱英氏、渡辺光太郎氏、新潟大学 船引洪三氏に厚く感謝の意を表する。

材料および方法

使用した花粉は、1969年5月、道立林業試験場構内に植栽されているクローン“留朋2号”数本(樹齢13年)より、雄花序の開葯1~2日前の状態にあるものを採取し、1~2秒間80%エチルアルコールに浸漬して、表層にある樹脂をとり除いたのち、10%クロールカルキで10分間消毒し、直ちに殺菌水で十分水洗し、大型シャーレ内でシリカゲルにより、常温48時間で開葯させたものである。採取時の花粉の含水率は22.5%であった。さらに供試花粉を1cc入りアンプルに溶封し、液体窒素(-196°C恒温)中に貯蔵した。

人工発芽床は、30%蔗糖液+1%寒天培地を用い、そのほか下記に示すような雌花抽出液添加培地を用いた。雌花5gをくだき、80%エチルアルコールおよび水20ccにそれぞれ24時間浸漬したのち、常温で吸引ポンプでアルコールおよび水を取り除き、乾固した抽出液をそれぞれ5%、10%、20%濃度

* 北海道立林業試験場 Hokkaido Forest Experiment Station, Bibai, Hokkaido.

** 京都市立旭ヶ丘中学校 Asahigaoka Junior High School, Kyoto.

になるように寒天培地に添加した。これらの培地はオートクレーブにより殺菌（1.2気圧 10分間）したりち、小型シャーレに約4mmの厚さに分注し、花粉を置床した。なおこれら一連の操作はすべて無菌的に行ない、発芽は27℃に保たれた恒服器のもとで行なわれた。同一条件下におかれたシャーレのうちから1個を24時間ごとにとり出して検鏡したのちその培地は棄却した。なおこれらの結果はすべてミニコピーフィルムで撮影し、発芽経過を比較検討する資料とした。

実験結果および考察

時間経過にともなう花粉のうごき

1) 置床直後： 外皮 (Exine) からの吸水がはじまり、膨化するとともに、2つの前葉体細胞と2個の大きな細胞がみえる。後者は柄細胞 (Stalk cell) と中心細胞 (Central cell) である。

2) 24時間前後： 正常な花粉は、外皮の内側にある内皮 (Intine) が発芽床から水分を吸収し、外皮を脱皮する。さらにこの頃から発芽能力のない花粉、すなわち死花粉は、内部に大きな気胞の発生をみたり、花粉内容物の萎縮をみるので、正常花粉とは容易に識別できる (写真-1a, b)。

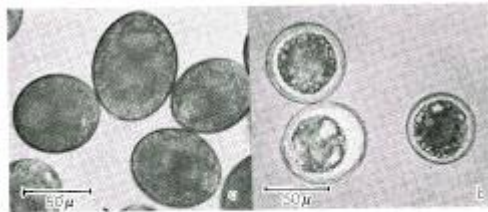


写真-1 花粉の生死判定。置床後24時間
a: 正常花粉 b: 死花粉

Photo 1. About 24 hours after setting on agar medium.
a: Normal pollen. b: Plasmolysis of mortal pollen.

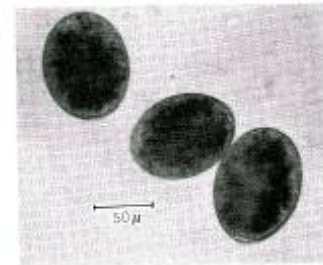


写真-2 ヨードヨウカリによって染色された澱粉粒。置床後48時間

Photo 2. About 48 hours after setting on agar medium. Formation of starch grains of normal pollen. Stain: I-K

3) 46時間前後： ほとんどの花粉粒は、吸水した内皮の膨圧によって、外皮を脱皮する。脱皮した花粉粒は、2個の前葉体細胞や中心細胞、柄細胞が容易に識別でき、花粉粒の楕円球化が認められる。これらの形態変化とともに、花粉粒内での澱粉の形成をみる (写真-2)。また中心細胞は、前葉体細胞部から花粉中央部方向への移動をみて、いくぶん大きくなる。

4) 72~96時間： 花粉はさらに長楕円球化して正常花粉はすべて外皮を脱皮*する。この頃になると、中心細胞はさらに大きくなり、花粉中央部に進出して、分裂する花粉粒もみられる。中心細胞は染色がきわめてむずかしく、Neutral red, Aceto-carmin 1:1液で染色が可能であるが、細胞膜は明確でなく、2~4個の細胞になっていると推定される。また2つの前葉体細胞のうち、内皮-外層 (Ect-intine) にある第1前葉体細胞 (1st prothallial cell) は内皮-外層の消滅とともに消失する。

* カラマツ花粉における外皮の脱皮は、Taxodiaceaeの花粉の脱皮よりやや遅い。Taxodiaceaeの花粉では、生死にかかわらず、27~30℃の条件下における通常発芽床上で、10~60分で脱皮するが、カラマツ花粉の外皮の脱皮にいたるまでの時間が非常に長いといえる。

5) 120~144 時間： 長楕円球化のすすんだ花粉粒のうち，異常生長を呈するものが現われはじめる。この異常生長を呈した花粉は，そのほとんどが原形質分離の状態を示すが，その後の形態変化はみられず，かなり長時間，その状態を保つ（写真-3 参照）。

6) 168 時間以上： 異常生長を示す花粉が次第に増加する。花粉が長楕円球に発達していく速度がおそくなり，置床後 200 時間前後になるとほとんど楕円球化を停止する。また長径がのびないまま，短径が次第にのびて円形に近い形態をとるものが多い。

長時間の発芽試験と異常な形態の出現

無菌培養による花粉発芽能力の推移は，表-1，図-1 のとおりである。表-1 を簡単に説明すると，置床後 72 時間を経て形態変化のみられないもの，すなわち花粉内容物の萎縮をみるものは，発芽能力のないものとして取扱った。異常な形態を呈したものは，前述のように，発芽床上において発芽の方向への形態変化をみて，内部にも澱粉粒の形成や生殖細胞の発育，分裂という生理的变化をあわせ“前

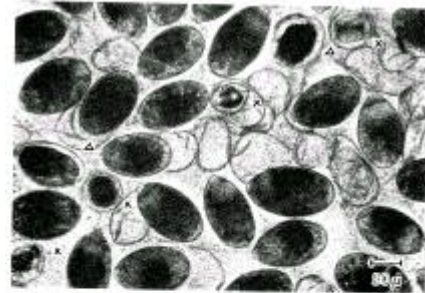


写真-3 人工発芽床におけるカラマツ花粉の形態

寒天発芽床に置床後 144 時間楕円球化した正常花粉は，この頃より異常生長を呈し始める場合が多い。また活力のない花粉粒は容易に識別できる。

×：死花粉，△：異常生長を呈した花粉

Photo 3. *Larix* pollen cultured on agar medium.

About 144 hours after setting on agar medium. Following this stage, in general, the ellipsoidal normal pollens gradually change to abnormal shapes. × and △ stand for mortal and abnormal (probably) autolysed pollen respectively, and the others are normal pollen.

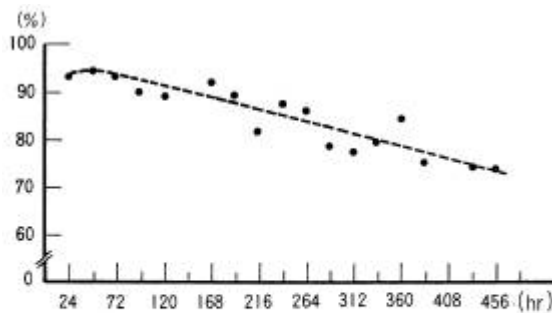


図-1 人工発芽床におけるカラマツ花粉の生存率の変化

Fig. 1. Changes of pollen viability on agar medium.

表-1 花粉発芽能力の変化
Table 1. Changes of viability of *Larix* pollen.

| 時 間 Time (hr) | | 24 | 72 | 120 | 168 | 216 | 264 | 312 | 360 | 456 |
|----------------|---------------------------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 生 Survival | 正常な生長をみたもの* (%) Normal form | 93 | 93 | 85 | 81 | 60 | 77 | 12 | 3 | 9 |
| | 異常生長を呈したもの** (%) Abnormal growth | — | — | 4 | 11 | 21 | 9 | 65 | 81 | 65 |
| 死 Mortality | 活力のない花粉粒*** (%) Plasmolysed pollen | 7 | 7 | 11 | 8 | 19 | 14 | 23 | 16 | 26 |

* 長楕円球化しているもの：Ellipsoidal pollen.

** 前発芽の状態のち異常生長を呈したもの：Probably autolysed pollen.

*** 花粉内容物の萎縮をみて明らかに死花粉と認められた花粉：Morphologically sterile plasmolysed pollen.

発芽(Pre-germination)”の状態を示したのちに異常生長を示したもので、発芽能力を機能的に失ったものと考えられる。このような発芽能力を途中で失う花粉粒の割合は、時間の経過とともに急速に増加し、置床後 480 時間(20 日間)前後になると、すべての花粉が、原形質分離状態を伴った異常生長を呈する。このように人工発芽床上での花粉が、時間経過とともに原形質分離に似た形態を示すというのは、一般植物細胞の原形質分離とは異なり、この場合、自己分解(Autolysis)*による偽原形質分離(Pseudoplasmolysis)の一種と考えられる。なおこの自己分解する原因について考えられるのは、培地の組成と、花粉の生理的なものに由来するのであろうが、未だ究明されておらず、今後研究をすすめなければならない。

形態変化と発芽の方向

発芽床上における長時間の花の長径、短径の変化は、表-2、図-2a, b のとおりである。測定されたものは、異常生長を呈さない花粉から無作為にとった約 100 粒の平均径である。図-2 に示すごとく、置床後 200 時間前後からは、発芽床上でのカラマツ花粉の長径の伸長が鈍化し、置床後 120~144 時間

表-2 カラマツ花粉発芽試験
Table 2. Germination tests of *Larix* pollen under the aseptic condition.

| 処 理 別 | | 置 床 時 間 | | | | | | | |
|----------------------------------|---------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 360 |
| Control | 長 径 (μ) | — | 112.2 | 123.3 | 128.8 | 143.8 | 153.0 | 151.5 | 135.0 |
| | 発芽能力 (%) | — | 86.7 | 87.2 | 94.0 | 84.5 | 89.2 | 69.3 | 84.6 |
| | 長短径率 (%) | — | 78.4 | 72.1 | 65.3 | 71.9 | 63.5 | 68.2 | 68.2 |
| アルコール による 球果抽出液 5%添加培地 | 長 径 (μ) | 106.9 | 112.2 | 125.7 | 142.3 | 156.5 | 164.3 | 154.3 | 177.7 |
| | 発芽能力 (%) | 86.9 | 89.0 | 90.9 | 88.9 | 81.5 | 84.5 | 55.5 | * |
| | 長短径率 (%) | 80.5 | 73.9 | 72.8 | 67.0 | 65.4 | 64.9 | 74.6 | * |
| アルコール による 球果抽出液 10%添加培地 | 長 径 (μ) | 109.1 | 115.9 | 126.6 | 144.2 | 155.1 | 167.4 | 166.2 | 175.4 |
| | 発芽能力 (%) | 92.1 | 91.3 | 89.3 | 88.0 | 61.9 | 75.5 | * | * |
| | 長短径率 (%) | 78.2 | 73.9 | 69.8 | 62.6 | 70.1 | 67.0 | 71.4 | * |
| アルコール による 球果抽出液 20%添加培地 | 長 径 (μ) | 108.9 | 114.2 | 123.7 | 133.3 | 148.2 | 163.0 | 178.6 | 184.2 |
| | 発芽能力 (%) | 78.6 | 91.0 | 74.0 | 83.8 | 72.5 | 41.7 | * | * |
| | 長短径率 (%) | 72.7 | 73.9 | 72.2 | 69.5 | 57.7 | 70.6 | 71.4 | 68.3 |
| 水による 球果抽出液 5%添加培地 | 長 径 (μ) | 98.4 | 113.3 | 121.9 | 126.3 | 150.7 | 161.4 | — | 172.4 |
| | 発芽能力 (%) | 88.3 | 87.1 | 88.1 | 91.9 | 91.5 | 78.8 | — | 81.8 |
| | 長短径率 (%) | 83.7 | 79.3 | 75.3 | 70.1 | 62.1 | 67.4 | — | 75.4 |
| 水による 球果抽出液 10%添加培地 | 長 径 (μ) | 104.0 | 112.8 | 123.6 | 130.2 | 160.5 | 160.7 | 147.0 | 173.7 |
| | 発芽能力 (%) | 90.3 | 89.9 | 89.7 | 83.0 | 74.3 | 87.3 | * | * |
| | 長短径率 (%) | 84.6 | 80.0 | 74.6 | 65.6 | 61.3 | 61.4 | 61.3 | 64.8 |
| 水による 球果抽出液 20%添加培地 | 長 径 (μ) | 108.9 | 114.8 | 128.0 | 148.5 | 161.3 | 163.6 | 155.0 | 159.1 |
| | 発芽能力 (%) | 86.0 | 92.0 | 90.9 | 83.6 | 67.6 | * | * | * |
| | 長短径率 (%) | 76.7 | 78.5 | 76.5 | 59.3 | 64.2 | 56.0 | 72.7 | 74.3 |

* 自己分解 (autolysis) : 自己消化 (autodigestion) ともいう。細胞, 組織が死んだとき, それらを形成している物質が無菌状態においても分解する現象をいい, この分解は, 組織に含まれている諸種の酵素が, 細胞物質に働きかけて引き起こすものである。

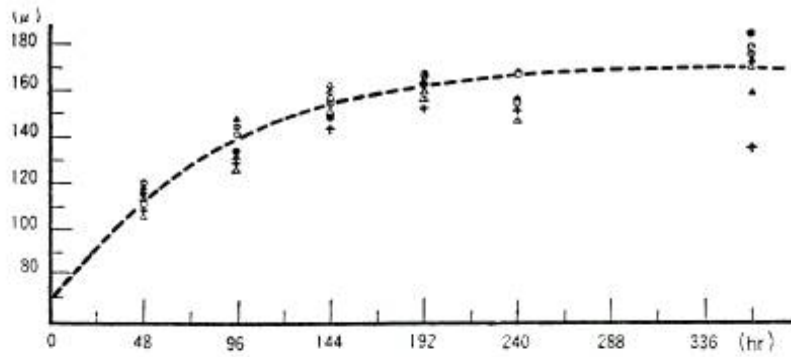


図-2 a 人工発芽床での長径の変化

Fig. 2 a. Changes of pollen length on agar medium.

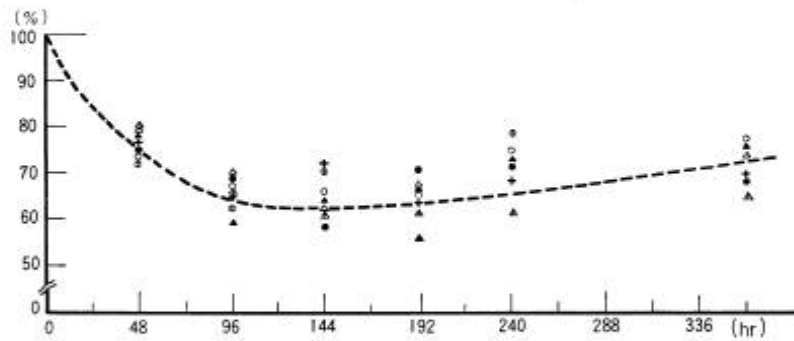


図-2 b 人工発芽床での長短径率変化 (短径/長径×100) %

正常に楕円球化した花粉約 50 粒の平均値

○: エチルアルコールによる球果抽出液 5% 添加発芽床, ⊕: 同 10%, ●: 同 20%
 △: 水による球果抽出液 5% 添加発芽床, △: 同 10%, ▲: 同 20%, +: Control

Fig. 2 b. Changes of pollen shape on agar medium indicated in terms of percentage ratio: shorter/longer axes.

An average of 50 ellipsoidal pollen grains.

- : The agar medium contains 5 volume ethanol extract from female flower.
- ⊕: The agar medium contains 10 volume ethanol extract from female flower.
- : The agar medium contains 20 volume ethanol extract from female flower.
- △: The agar medium contains 5 volume water extract from female flower.
- △: The agar medium contains 10 volume water extract from female flower.
- ▲: The agar medium contains 20 volume water extract from female flower.

で長短径率の変化がみられなくなる。このことは、短径の伸長を意味し、膨化するとともに、自己分解をもたらすようである。カラマツ花粉の発芽初期にみられるこれらの長径、短径の変化は、BARNERら (1962), CHRISTIANSEN (1970) の報告したトガサワラ属 (*Pseudotsuga*) 花粉の発芽形態と非常に類似しており、トガサワラ花粉のように、通常の花粉管を形成せず、そのかわりの長楕円球化する過程の途中で、培地の組成または水分条件などによって異常形態を示すものと考えられる。

写真-4, 5 は人工発芽床でまれにみられるカラマツ花粉の発芽形態である。この花粉管状の突起はスギ科 (*Taxodiaceae*) の花粉管と非常に類似している。花粉極軸に対して直角方向に花粉管が形成されるのは、スギ科 (*Taxodiaceae*) 花粉において常にみられるものであるが、これらの写真は、数百にのぼる発芽床で、まれに 2~3 の視野でみられたものであり、追試をしても、現在のところ容易に再現できない。しかし、これらの写真から、カラマツ花粉も一般針葉樹花粉の発芽形態と同じように、花粉



写真-4 カラマツ花粉の花粉管

a: 置床後 168 時間 b: 置床後 144 時間 染色: アセトオルセイン

Photo 4. Elongated pollen tubes of *Larix* pollen.

a: About 168 hours after setting on agar medium.

b: About 144 hours after setting on agar medium. Stain: Aceto-orcein.

管を形成するものと考えられる。さらに発芽床上での花粉のうごきをよく観察すると、短径方向へのわずかな突起をみるものが多く、長楕円球化した正常花粉においても、その傾向が認められる。写真-3 に示すように、中心細胞が花粉中央部にあるものも多く、さらに中心細胞はわずかなふくらみの方向に近づいている。これらの点から、先述のように、発芽の段階では長楕円球化するが、次第に短径が大きくなって短径方向へ花粉管をのぼすのであろうと推定できる。



写真-5 コイマツ花粉の花粉管

Photo 5. Pollen tubes of *Larix*.

一方雌花内での花粉のうごきについて、BARNER ら (1962)

は、受粉後、約 1 週間のあいだに、花粉径の 1/5 ほど大きくなるものもしばしばみられるが、この状態で 5~7 週間の休止期 (Resting period) にはいり発芽は停止するとしており、さらに SMOLSKA (1927) は、受粉後約 44 日間は造卵器が形成されず、このことが花粉の休止期をもたらすのであろうといている。筆者らが調べたところ、当场においても 6 月上旬では未だ造卵器が形成されていない点から、造卵器が形成されるまで、花粉は花粉管を形成しないものと考えられ、休止期が終れば、珠頭についた花粉は他の一般針葉樹花粉のように花粉管をのぼして授精するものと考えられる。造卵器が形成されると花粉管をのぼすことから、花粉の発芽を促進する何らかの物質が珠頭または造卵器内に存在するものと考えられたので、造卵器が形成された 6 月中・下旬の球果抽出液添加発芽床上での花粉のうごきを調べたが、表-2、図-2 に示すごとく通常発芽床との間に差は認められなかった。

カラマツ花粉の人工発芽試験をとおして、その発芽過程を図示すると図-3 のようになる。発芽床上への花粉の置床直後、または外皮を脱皮した直後は (9) であり、花粉が偽原形質分離の状態を呈し、自己分解するときは (9) から (10) にかけてである。中心細胞が分裂して 2 個の精核になる (10) はまれにみることができる。発芽床上で (11) まで到達しない原因については明らかではない。

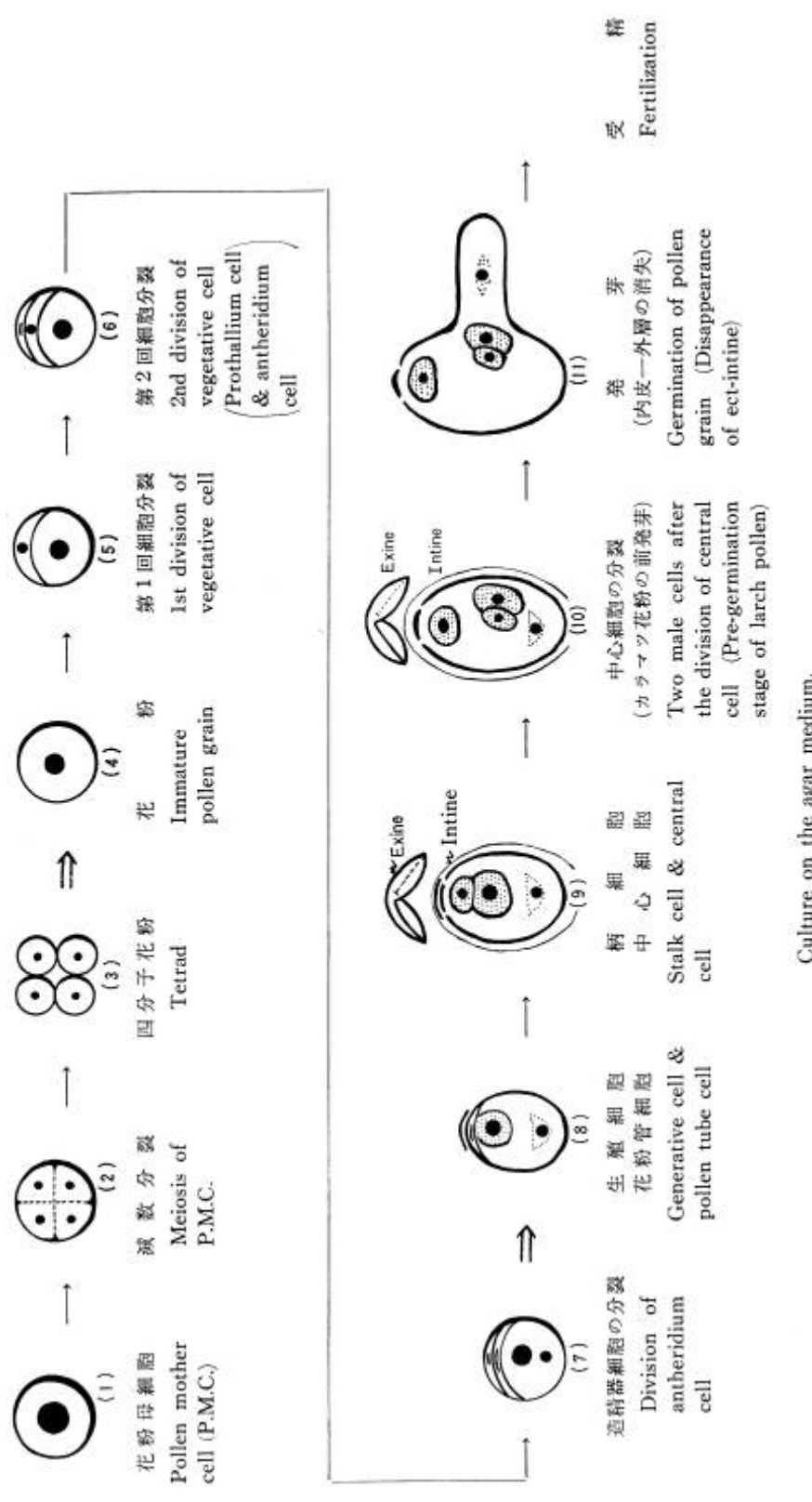


図-3 カラマツ花粉発育形態模式図
Fig. 3. Development of *Larix* pollen on anther and agar medium.

生死の検定方法

花粉の発芽試験は交配に先だってその授精能力を調べることであるが、交配を成功させるためには、発芽試験と並行して雌花の受精能力についても調べる必要がある。今回の試験により、前者についてはほぼ満足できる結果が得られた。その検定方法は、無菌培養によっても、先述のように花粉管の形成、伸長という形での発芽は長時間追跡してもごく少数しか得られなかったが、死花粉は原形質が萎縮するか、または形態変化がみられない点から、置床後短時間で容易に識別することができる(写真-1a, b ; 3参照)。しかし、形態変化、生理的变化は置床時間の経過とともにより識別し易くなり、検定の精度も高められると考えられる。また、通常発芽床での検定は、置床後 96 時間以降になると培地に雑菌が発生するので、生死判定は 24~74 時間で行なうのが適当と思われる。CHRISTIANSEN(1970)は、カラマツ、トガサワラのように人工発芽床で花粉管を形成しない花粉の活力検定方法として、中心細胞(Central cell)の分裂およびそれにともなう花粉径の変化をもって検定できるとしているが、これらの変化を正確に識別するためには置床後 24~72 時間を必要とする。しかし先述のように、実用的レベルでの生死判定は 24 時間前後で可能であり、より精度の高い活力検定は 72 時間前後を必要とする。生死判定にあたり、発芽床上に置床した花粉が同一条件下にある場合の検定には、数視野にわけ、花粉 200 粒程度で十分と考えられる。

種子稔性と花粉生存率との関係

本試験に先だって、1 年間貯蔵した花粉の交配結果は表-3 のとおりである。交配前の花粉の生死判定より、生存率 87%前後の花粉を交配した結果、得られた種子の稔性は正常であり、生存率 0%の花粉では稔性のある種子が得られなかった点から、上記検定方法によって発芽能力があるとした花粉は、そ

表-3 貯蔵花粉の人工交配結果 (3 球果当り)
Table 3. Effect of pollen storage for one year on fruiting.

| 交配母樹名 Pollination Mother tree | 花粉 No. Used pollen | 交配前生存率* Viability (%) | 種子総数 Seed (Total) | 充実種子総粒数 Fruited seed (Total) | 種子充実率 Fruited Ratio (%) |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| 留萌 2 号 Rumoi No.2 No. 40 | Open | — | 244 | 95 | 38.9 |
| | 16 | 19.3 | 241 | 10 | 4.1 |
| 留萌 2 号 Rumoi No.2 No. 41 | Open | — | 283 | 130 | 45.9 |
| | 21 | 87.6 | 283 | 178 | 62.9 |
| 留萌 2 号 Rumoi No.2 No. 60 | Open | — | 274 | 103 | 37.6 |
| | 47a | 83.3 | 252 | 101 | 40.1 |
| 留萌 2 号 Rumoi No.2 No. 98 | Open | — | 246 | 83 | 33.7 |
| | 52 | 0.0 | 254 | 1 | 0.4 |
| 留萌 2 号 Rumoi No.2 No. 99 | Open | — | 237 | 57 | 24.1 |
| | 47b | 87.8 | 235 | 135 | 52.4 |
| | 49b | 0.0 | 245 | 4 | 1.6 |

* 交配前の生存率は花粉約 200 粒の平均値

Viability of pollen was tested before pollination on agar medium and was indicated as an average of about 200 pollen grains.

Seeds were totaled in 3 corns. Pollination was done in 1969.

の授精能力もあると推定されるので、花粉の生死判定は、実用的レベルでその目的を満足し得ると考えられる。

ま と め

従来カラマツ花粉の人工発芽は困難とされていたが、無菌培養により、長時間の発芽状態を追跡した。その結果、発芽床上では、前発芽以上の形態変化はみられなかったが、カラマツ花粉も、雌花内では造卵器の形成にともなって一般針葉樹花粉のように花粉管を形成するものと考えられる。

花粉の活力検定は、通常の花粉のように発芽床上で花粉管を形成しないので、細胞の分裂、形態の変化から推定することが可能と考えられた。しかし活力検定は、今後主に雌花の受精機構の究明を待たなければならず、筆者らはこれらの研究を継続、発展させて行く予定である。

摘 要

1. カラマツ花粉の人工発芽試験を無菌操作のもとで行なった。
2. 人工発芽床上では、前発芽の状態が多くみられ、まれに花粉管状の突起または管形成を示した花粉粒があった。
3. カラマツ花粉も、他の針葉樹花粉のように花粉管を形成し、その発芽のしかたはスギ科に似ていると考えられる。
4. 発芽床上での花粉のうごきをみて花粉の活力検定方法について論議した。活力検定は培地に置床後 24～72 時間で行なうのが適当と考えられる。花粉が楕円球化し、花粉粒内に澱粉粒を形成すると同時に、生殖細胞の移動や分裂をみるもの(前発芽状態を呈したものは)は活力を有すると認定した。

文 献

- 市河三次・久保田泰則・安達芳克 1969 カラマツ花粉の人工発芽に関する研究(I). 北林試報 7 : 32-38
- 原田 泰・柳沢聡雄 1964 森林植物花粉の発芽試験. 帝林北林試報 2 : 45-70
- 百瀬行男 1965 カラマツ花粉の発芽力を調べる方法. 日林誌 47 (7) : 171
- BARNER, H. and H. CHRISTIANSEN 1960. The formation of pollen, the pollination mechanism, and the determination of the most favourable time for controlled pollination in *Larix*. *Silvae Genetica* 9(1) : 1-11.
- BARNER, H. and H. CHRISTIANSEN 1962. The formation of pollen, the pollination mechanism, and the determination of the most favourable time for controlled pollination in *Pseudotsuga menziesii*. *Silvae Genetica* 11 (4) : 89-102.
- CHRISTIANSEN, H. 1970. On the germination of pollen of *Larix* and *Pseudotsuga* on artificial substrate, and on viability tests of pollen of coniferous forest trees. *Silvae Genetica* 18(4) : 104-107.
- SMOLSKA, A. 1927. Die Entwicklung des Archgoniums und der Befruchtungsprozeß bei *Larix europaea*.

Summary

Germination of larch (*Larix leptolepis*) pollen on the medium have not been succeeded in our successive experiments. To make another attempt, therefore, *Larix* pollen grains were cultured on agar medium under the aseptic condition. Some of them grew to ellipsoidal form with formation of starch grains and with development led to division of generative cell (body cell). We called this as the pre-germination stage (see Photo 3 and Figs. 2a, b).

A few pre-germinated pollen grains produced pollen tubes, but most of them did not. These germinated pollen grains are shown in Photo 4 a, b and Photo 5.

It is suspected that *Larix* pollen also produce the pollen tube as other coniferous trees, because of the facts that we observed a few pollen grains which produced pollen tubes on the medium and nucellus top of the female flower. The ratio of germinated pollen grains which produced pollen tubes, however, is not parallel with their fertilizing capacity. Then, we intend to get fertilizing capacity by criteria for viability test.

The viability was tested according to the physiological and morphological changes of the pollen grain. It was suitable to observe these changes about 24 to 72 hours after setting on agar medium. While viable pollen (see Photo 1a) turned to ellipsoidal form with formation of starch grains (see Photo 2) and with generative cell being divided. Those viable pollen grains are quite similar status as the pre-germination stage defined above, while unviable pollen grains are autolysed (see Photo 1b).