

トドマツ花粉の採集，貯蔵および

発芽検定に関する研究

梶 勝 次*

Studies on the longevity of *Abies sachalinensis* MAST pollen , and on a method of measuring viability of the pollen

Katsuji KAJI*

はじめに

トドマツ(*Abies sachalinensis*)の遺伝的なふるまいを解明するなかで，人工交配をおこなう機会がおい。しかし，トドマツは産地および個体により開花時期がいちじるしくことなるため，人工交配を効率的にすすめるには，花粉を一定期間発芽能力を失わないように採集，貯蔵しなければならない。ところが，トドマツ花粉のとり扱いに関する報告はきわめて少なく，貯蔵方法や発芽検定があいまいな形でおこなわれてきた。

花粉のとり扱いは樹種により多少のちがいが認められるが，針葉樹花粉の発芽検定法および寿命に関するこれまでの報告を要約すると，花粉は自然状態で放置するときわめて短期間のうちに発芽能力を失う。しかし，貯蔵条件が適切であればかなりの長期間発芽能力を保持でき(市河ら，1971，1973)，花粉の寿命は花粉粒を採集するときの相対湿度，花粉含水率ならびに貯蔵温度などと深い関係があることがすでに明らかにされ(DUFFIELD *et al.*，1941；LANNER，1962)，一般に低温下，気密な容器での貯蔵，低含水率花粉は生存期間がいちじるしく長くなる(武藤ら，1962；梶ら，1972)。一方，発芽検定方法は樹種により検定の温度ならびに培地の糖の濃度がことなる。

本稿は，トドマツ花粉のとり扱いに関する基礎資料を得るため，花粉の発芽能力を検定する方法を明らかにし(実験1)，その結果をもちいて，いろいろな含水率をもった花粉を，貯蔵温度をかえてそれぞれ1年間貯蔵した場合の発芽能力の変化を調べ(実験2)，花粉含水率と寿命との関係を中心に花粉の採集方法，貯蔵方法および検定方法についてとりまとめた。

この研究をはじめめるにあたり，山梨県立女子短期大学市河三次博士および北海道立林業試験場久保田泰則副場長には終始ご指導を賜った。また，当场育種科の各位には実験にさいし助言と協力をいただいた。本稿をとりまとめるにあたり上記の各位に幸甚な謝意を表す。

実験1．花粉の発芽能力検定試験

花粉貯蔵の最終的な目的は交配である。したがって，花粉は交配に供するまで採集した時の新鮮なままの状態を維持する必要があり，また貯蔵花粉の発芽能力を正確に検定する必要がある。この実験では，検定のため(1)蔗糖濃度は何%が最適か，(2)花粉置床後どの時間で検定するか，(3)花粉の置床密度

* 北海道立林業試験場 Hokkaido Forest Experiment Station, Bibai, Hokkaido 079-01

[北海道林業試験場報告 第18号 昭和55年10月 Bulletin of the Hokkaido Forest Experiment Station, No. 18, October, 1980]

によるちがいがあるかなど目的にかなう実用的な方法を調べた。

1. 材料と方法

供試花粉は、花粉を培地に置床したのち相対的に早い時間に花粉管を形成するクローン (OKO - 101) と遅いクローン (IKE - 103) をもちい、クローン別に飛散直前の雄花をもぎとり、室温下で、自然開葯させて得た。

人工発芽床は、表1 にしめすとおり蔗糖濃度を0%から30%までの7段階に分けた蔗糖寒天培地 (寒天1%) をもちいた。これらの培地はオートクレーブ (1.2kg/cm², 10分間) で殺菌したのち、小型シャーレに分注した。なお、発芽温度は27とした。

花粉の培地への置床は、花粉粒が重なり合わないようにできる限り均一におこなった。さらに、花粉置床密度が検定結果に与える影響を調べるため、置床密度を、疎・中・密に分けた場合の発芽率を比較検討した。

発芽の検定は、同一条件下におかれたシャーレのうちから所定の時間ごとに、各処理につきそれぞれ3シャーレ (3反復) をとり出し、Cotton blue で染色して検鏡した。検鏡したシャーレはすべて廃棄し、時間の経過にともなう検定は別のシャーレをもちいた。検鏡結果はすべて顕微鏡写真を取り、発芽の割合および花粉管の長さの測定は写真上からおこなった。発芽検定は3反復合計約200粒について調べ、花粉管が50μm以上伸長したものを発芽花粉とみなした。また、発芽花粉はその平均花粉管長を測定した。

2. 結果および考察

蔗糖濃度別、検鏡時間ごとの発芽の割合を、図-1にしめた。図から明らかなように蔗糖濃度が0.5%の培地では、花粉粒は発芽しているが花粉管が不鮮明できわめて検定し難い (写真参照)。また、蔗糖濃度が20%の培地では20~30μmの花粉管を持った花粉粒が散見され、25%および30%の培地ではこのような花粉粒が大部分をしめ、発芽能力を有している花粉と発芽能力をすでに失ったものとの識別が困難で正確な検定ができないと判断された。一方、蔗糖濃度が10~15%の培地では、発芽能力をもった花粉は正常な花粉管の形成が認められた。以上のことから、トドマツ花粉の発芽検定は蔗糖濃度が10~15%の培地が適当といえよう。

表1 花粉発芽検定培地

Table 1 . Cultivation media for germination test of pollen

処 理 Treatment	寒天濃度 Agar concentration (%)	蔗糖 Sucrose concentration (%)	備 考 Reference
No. 1	0	0	No.1: 蒸留水 Distilled water
2	1	0	
3	1	5	
4	1	10	培養温度 Culture temp.
5	1	15	+27
6	1	20	
7	1	25	
8	1	30	

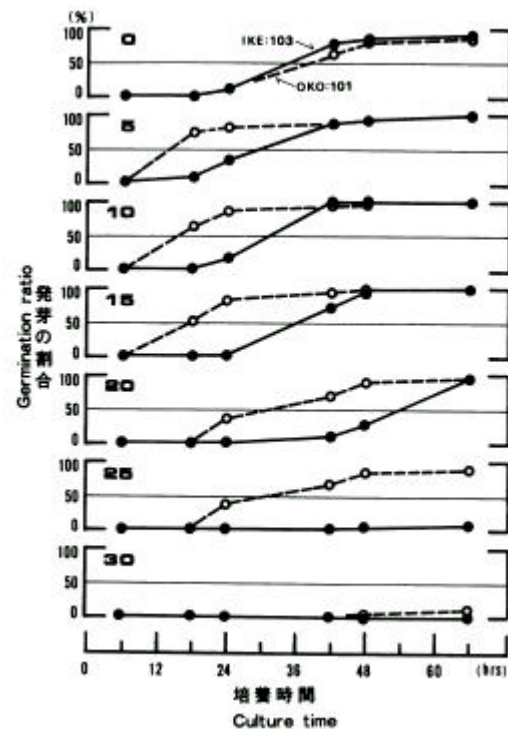


図-1 培養時間ごとにみた蔗糖濃度と発芽の割合との関係

Fig .1 . Effect of sucrose concentration on the germination ratio in culture time

図の中にしめす数字は培地中の蔗糖濃度をあらわす。Arabic numerals (0 ~ 30) stand for sucrose concentration

なお、蒸溜水のみ液体培地では花粉管の形成は認められなかった。蔗糖濃度が5%以下および20%以上の培地では、花粉内部と培地との浸透圧が平衡状態を維持できないため花粉管形成に支障をきたしているものと考えられる。

検定のための最適発芽時間は、発芽能力を保持しているすべての花粉粒が適当な長さの花粉管を伸長した時点がよい。検鏡しやすい理想的な花粉管長は、トドマツ花粉粒の大きさが約100 μmであるから、100~150 μmであろう。しかし、クローン(個体)により経時的な発芽の遅速が認められており(梶, 1978), それぞれの花粉粒によってもいちじるしくことなる。一方、発芽時間にともない花粉管は伸長を続け、花粉管が交錯して検定し難くなる。

図-1(蔗糖濃度 10~15%の場合)から両クローンの花粉の管形成が認められたのは、花粉置床後 48 時間である。一方、置床 48 時間後の平均花粉管長は、図-2 にしめすとおり 300~400 μmに達する。また、置床後 66 時間では培地上に雑菌が発生しているものがみられた。これらの結果から検定時間は発芽の遅いものが管形成した時点、すなわち花粉置床後 48 時間前後でおこなうのが最適と判断された。

花粉の発芽率は、置床密度によってことなるといわれている。そこで置床密度に

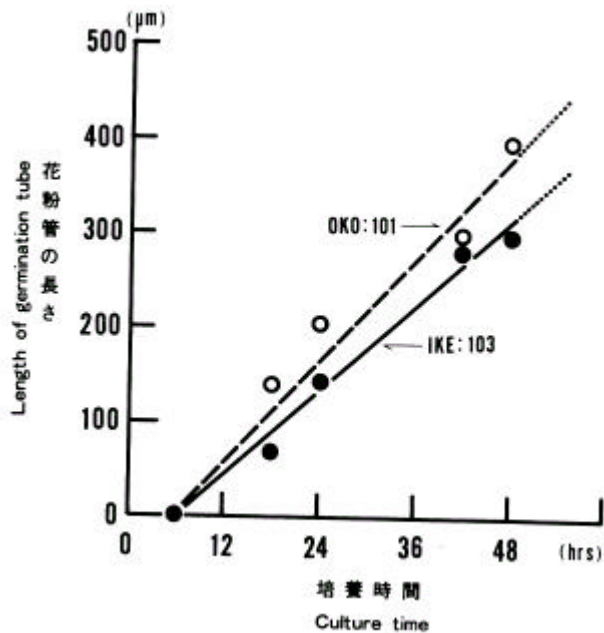


図-2 花粉の培養時間と花粉管の伸長との関係

Fig. 2 .Relation between length of germination tube and culture time (hours)

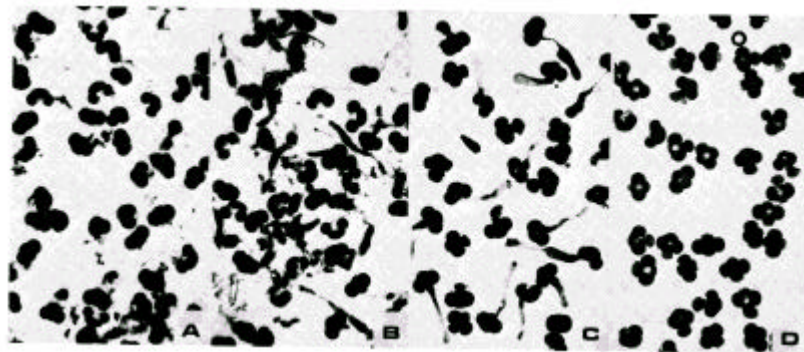


写真-1 トドマツ花粉の蔗糖濃度別発芽試験 (花粉置床 48 時間後)

Photo .1 .Effect of sucrose concentration on the germination test of polles (48 hours after setting pollen on the culture medium)

蔗糖濃度 Sucrose concentration : A = 0% , B = 10% , C = 20% , D = 30%

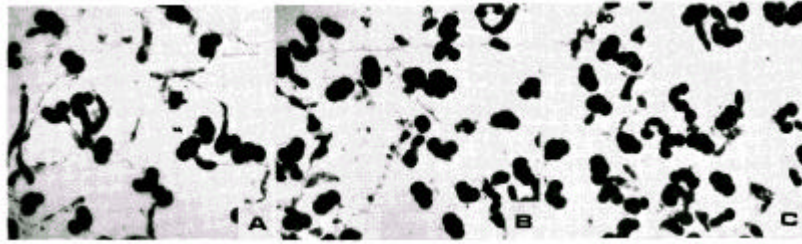


写真-2 花粉の置床密度と発芽の割合との関係

Photo .2 .Relation between setting density of pollen on the culture medium and the corresponding germination ratio
A = 疎 Sparse , B = 中 Intermediate , C = 密 Dense

よるちがいを調べた結果(写真-2),花粉管長にはちがいがあがるが発芽の割合にはおおきなちがいが認められなかった。しかし,花粉を厚く置床した場合,花粉粒が重なりあうのでシャーレのまま検定することは不可能で,スライドグラス上に移しかえて検定しなければならないため繁雑であり,かつ検定には相当の熟練を要する。したがって,花粉の置床はうすく均一にするのがよい。

実験 2 . 花粉の貯蔵試験

さまざまな含水率をもった花粉をそれぞれ1年間貯蔵し,それら貯蔵花粉の発芽検定の結果から,貯蔵に最も適した花粉含水率,温度および貯蔵容器についての検討をおこなった。

1 . 材料および方法

北海道立林業試験場構内に植栽されているトドマツクローン集植所から,32 クローンについてクローン別に花粉飛散直前の雄花序を採取し,室温下で自然開薬させて花粉を採集した。クローン別の花粉は,赤外線水分計をもちいて平均含水率を測定したのち,それぞれ管瓶に入れて密栓した。さらに,このうち12 クローンをガラスアンプルに入れて溶封した。

花粉の貯蔵方法はつぎの3とおりとした。(1)液体窒素(-196) , ガラスアンプル,12 クローン,(2)電気冷蔵庫(+5 前後),ガラスアンプル,12 クローン,(3)電気冷蔵庫,管瓶密栓,32 クローンである。なお,供試クローンおよびその平均花粉含水率,貯蔵方法は表-2 に要約してしめした。また,(1)では専用の貯蔵容器をもちいた。

発芽能力の検定は,実験1の結果から蔗糖濃度12%の蔗糖寒天培地をもちい,花粉置床後48時間でおこなった。また,貯蔵花粉は上記の貯蔵方法(1)と(2)では貯蔵前と貯蔵3,6,9 ヶ月後および1年後にそれぞれ検定をおこなって経時的な発芽能力の変化を調べ,(3)では貯蔵1年後の発芽の割合を調べた。

なお,この実験材料は,花粉置床48時間後の検定ではクローン間におおきなちがいが認められないという結果(実験1)から,平均花粉含水率ごとにそれぞれことなるクローンをもちいた。また,発芽能力検定の方法はすべて実験1に準じておこなった。

2 . 結果および考察

1)液体窒素による貯蔵

貯蔵花粉の発芽能力は,平均花粉含水率とふかい関係が認められた。すなわち-196 に貯蔵した場合,花粉含水率が23%以下では貯蔵1年後でもほとんど発芽能力が失われない。つまり,花粉含水率が28%の場合,貯蔵3 ヶ月後では大部分の花粉が発芽能力を有しているが6 ヶ月後ではほとんどの花粉が能力を失っている(表-3)。

表2 花粉貯蔵試験材料

Table 2 . Materials for storage test of pollen

クローン名 Clones	花粉含水率 Moisture content (%)	処 理* Treat- ments	クローン名 Clones	花粉含水率 Moisture content (%)	処 理* Treat- ments
OKO - 101	4	A, B	NAY - 102	13	A
OHM - 104	5	A	IKE - 103	14	A
OKO - 103	6	A	YAM - 322	15	A
TOM - 12	7	A, B	KIT - 106	18	A
URK - 106	7	A	AKK - 116	19	A
AKK - 102	8	A, B	ASA - 103	20	A, B
KIT - 107	8	A, B	YAM - 93	20	A, B
BIF - 105	8	A, B	IWA - 107	21	A
RUM - 101	8	A	KIT - 105	22	A, B
IKE - 113	9	A	AKK - 121	23	A, B
BIF - 102	9	A	IKE - 107	24	A
TOM - 109	10	A	IWA - 102	25	A, B
AKK - 108	11	A, B	OHM - 102	26	A
URK - 103	11	A	YAM - 57	28	A, B
URH - 106	12	A	YAM - 1	29	A
IKE - 110	12	A	AKK - 111	30	A

* A : 花粉を管瓶に入れ密栓し, 5 (電気冷蔵庫) に貯蔵
 B : ガラスアンプルに溶封し-196 (液体窒素) と 5 にそれぞれ貯蔵
 A : Stored at 5 (refrigerator) by tightly stoppered vial .
 B : Stored at -196 (liquid-nitrogen) and 5 by small glass ampoules ,
 respectively .

このように比較的に高い含水率の花粉が貯蔵期間中に急激に発芽能力を失う原因は, 超低温下の貯蔵のため花粉粒内部の微氷晶が徐々に生長していき, 発芽能力に支障をきたすような細胞内凍結を引き起こすためと考えられる。したがって花粉含水率が 25% の場合, 表-3 にしめす結果では貯蔵一年後の発芽の割合は 85% であるが, 1 年間以上の長期貯蔵ではその割合が急速に変化することも予想される。

以上の結果から, 液体窒素による貯蔵は平均花粉含水率が 23% 以下であれば 1 年間以上の長期貯蔵が可能といえる。この貯蔵期間に関して, 含水率 12% の花粉を 1971 年 6 月に貯蔵し 1979 年 6 月に発芽検定したところ, 大部分の花粉が発芽能力を失っていないことを確認した。したがって, 低含水率花粉であれば少なくとも 8 年間以上は発芽能力を保持できる。

2) 電気冷蔵庫による貯蔵

ガラスアンプルに溶封して貯蔵した結果, 花粉含水率が 8% 以下であれば貯蔵 1 年後でも貯蔵前とほぼ同様な発芽能力を有している (表-3) 。一方, 含水率が 11% では貯蔵 1 年後の発芽の割合は 40% であり, 含水率が 20% では全く発芽がみられなかった。これらの結果から, 電気冷蔵庫に貯蔵するには平均花粉含水率が 8% 以下でなければ 1 年間の発芽能力を保持できないことが明らかとなった。

これを液体窒素に貯蔵した結果と比べると, 冷蔵庫に貯蔵する場合の花粉含水率はかなり低くなければならない。つまり, +5 前後よりも -196 の低温が発芽能力の保持にきわめて有効といえる。

管瓶に密栓して 1 年間貯蔵した場合の花粉含水率と発芽の割合との関係は, これまでのべてきた結

表-3 貯蔵温度，期間別にみた花粉含水率と寿命との関係

Table 3 . Effect of storage temperatures and moisture content of pollen on the survival ratio in storage periods

クローン名 Clones	花粉含水率 Moisture content (%)	貯蔵期間(月)別の生存率(%) Storage period (month) and survival (%)									
		電気冷蔵庫(+5) Refrigerator					液体窒素(-196) Liquid-nitrogen				
		0	3	6	9	12	0	3	6	9	12
		OKO - 101	4	100	94	98	97	98	100	97	98
TOM - 102	7	100	99	99	96	98	100	98	99	98	99
AKK - 122	8	100	98	99	92	97	100	98	99	81	89
KIT - 107	8	100	99	98	97	99	100	99	99	98	97
BIF - 105	8	100	99	99	97	99	100	99	99	98	98
AKK - 108	11	100	99	99	82	41	100	99	99	98	99
ASA - 103	20	100	96	80	9	0	100	99	99	99	97
YAM - 93	20	100	55	4	1	0	100	99	97	89	88
KIT - 105	22	100	98	0	0	0	100	99	97	93	97
AKK - 121	23	100	98	73	5	0	100	99	99	95	98
IWA - 102	25	100	0	0	0	0	100	99	97	91	85
YAM - 57	28	100	0	0	0	0	100	93	10	0	0

果とほぼ同じ傾向が認められた(図-3)。しかし，図からも明らかのように花粉含水率が8%以上のすべての貯蔵花粉が発芽能力を完全に失うわけではなく，含水率が高くなるにつれて発芽の割合は低くなり，24%以上の高含水率花粉ではすべて発芽能力を失っていた。これらの結果は，貯蔵容器を密栓としたためガラスサンプルによる貯蔵とほぼ同じ結果を得たものと考えられる。

以上 1), 2)の結果において，いずれも検定時に貯蔵花粉が粘着性を呈しているものがみられた。これらの花粉はすべて高含水率花粉で，検定結果は大部分の花粉が発芽能力を失っていた。つまり，貯蔵花粉が粘性を呈したものは，すでに発芽能力を失っており，貯蔵目的を失なっているといえる。また，上記と対照的にきわめてサラサラしている貯蔵花粉は発芽の割合が高い傾向にあり，正確な発芽の割合を知る必要のない場合は，人工発芽床による発芽検定を省略しても実用的には交配に供せるか否かのおおまかな判断ができる。

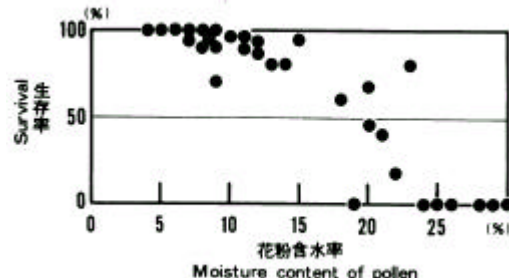


図3 貯蔵花粉の平均含水率と寿命との関係(1年間)
Fig. 3 . Relation between survival ratio and moisture content of pollen (one year after storing)

論 議

1. 花粉の採集と含水率の調整

トドマツ花粉の採集方法は，花粉が飛散する直前の雄花をもぎとり室内で自然開薬させると容易である。この場合，雄花の採取時期が早いと開薬しないまま萎縮することがおおいので，採取時期を慎重に決定しなければならない。この時期のめやすは，雄花内のそれぞれの葯が肉眼で観察でき丸味を呈する頃で

ある。なお、花粉採集の別の方法として群生する雄花の切枝法があるが、採取木を損傷するため好ましくない。

一方、花粉採集時の相対湿度は花粉含水率と密接な関係があり、また花粉の寿命に大きな影響を与える。つまり、雄花のもぎとり法など通常おこなわれる自然開葯によって採集した場合の平均含水率は、一般に数%から 20 数%である(表-2 参照)。ところが花粉を 1 年間以上貯蔵しようとする場合、これまで述べてきたように所定の含水率以下でなければ寿命を失うため、平均含水率の高いものは低く調整しなければならない。

花粉含水率の調整には、強制的におこなう方法と自然におこなう方法とが考えられる。前者の 1 例をあげると、梶ら(1972)がすでに採用している方法で、濃硫酸を通し乾燥させた空気をデシケータ内に入れた花粉に循環させる方法が簡便と思われる。一方、後者の方法は花粉をとりまく相対湿度を低くすることにより調整できよう。例えば、吸湿性の高い紙の上で自然開葯させると同時に、室内の相対湿度を低くすることにより貯蔵可能な低含水率に調整できる。

2. 貯蔵容器および貯蔵温度

花粉粒は、相対湿度の変化により敏感にその含水率も変る。とくに電気冷蔵庫の場合、除霜や停電などにより多少の温度変化が十分予想され、それにもなつて庫内の相対湿度も変化する。したがって、湿度調整ができない場所での貯蔵では、花粉含水率が高くなることを防止するため、貯蔵容器を密栓する必要がある。

貯蔵条件に関して、武藤ら(1962)は花粉を真空状態で貯蔵すると生存期間がいちじるしく長くなり、さらに電気冷蔵庫(0~3℃)より-8~-10℃の低温が発芽能力の保持に有効であるとしている。今回の実験でも液体窒素(-196℃)による超低温貯蔵が発芽能力の保持に有効であった。しかし、低含水率花粉ではちがいが認められず、含水率が9%~23%のあいだに顕著なちがいが認められている。したがって、花粉含水率を低く調整した場合の貯蔵温度は、電気冷蔵庫または冷凍室で得られる低温で実用的には十分と考えられる。

液体窒素による超低温貯蔵は、花粉含水率をほとんど調整しなくても長期間寿命を保持できるという利点があり、また化学的に不活性で安全であるとともに他の冷媒や冷凍室のような装置を必要とせず経済的である。しかし、細胞内凍結限界含水率に近い含水率の高い花粉では、貯蔵開始(冷却)および終了(加温)において敏速なとり扱いを必要とし、緩速では冷却(加温)過程で微氷晶ができ発芽能力に影響を与えるため、予備凍結方法など今後究明を要する点もいくつか残っている。

3. 花粉の発芽検定

人工発芽床はきわめて雑菌が発生しやすく、雑菌が発生すると検定が不可能となる。したがって、発芽床は予め殺菌し、花粉の置床も無菌室でおこなうのが好ましい。今回の実験で検定時間は置床後 48 時間前後でおこなうのを最適としたが、これは発芽床への雑菌発生を配慮したためでもある。また、検定時間は発芽温度によって変る。1 例をあげると、マツの花粉では、発芽温度 30℃前後では置床 24 時間後に花粉管が顕著に伸びているが 25℃以下では 48 時間以上かかって管が形成される(渡辺ら, 1970)。さらに、人工発芽床には、通常もちいられている蔗糖寒天培地のほか各種の培地があり、それぞれの培地により発芽のしかたがことなる。

本稿では、発芽温度および寒天濃度、ならびに他の培地による検討はおこなっていない。しかし、貯蔵花粉の発芽検定は発芽能力をもった花粉の割合を知ることにあるから、発芽温度は 27℃前後とし、寒天濃度は通常もちいられている 1%濃度で大きな問題はないと思われる。

摘 要

トドマツ花粉の実用的な貯蔵方法を明らかにする目的から、花粉の発芽試験と1年間の貯蔵試験をおこなった。発芽試験は7段階の蔗糖寒天培地(蔗糖濃度, 0~30%)をもちいて最適発芽床を検討し、貯蔵試験は4~30%のさまざまな含水率を持った花粉を電気冷蔵庫(5 前後)と液体窒素(-196)にそれぞれ貯蔵し、発芽能力の経時的な変化を調べた。これらの試験結果を要約するとつぎのとおりである。

1) トドマツ花粉の発芽検定は、発芽温度 27 のもとで寒天 1%, 蔗糖 10~15%濃度の蔗糖寒天培地が最適で、発芽時間の経過にともない花粉管が著しく伸長して交錯することや培地に雑菌が発生しやすいことから、花粉の培地置床後 48 時間前後で検定するのが最良と考えられた。

2) 電気冷蔵庫に1年間貯蔵した結果、花粉の平均含水率が 8%以下であれば貯蔵前とほぼ同様な発芽能力を保持していた。一方、含水率が 9~23%の範囲での発芽の割合は、含水率が高くなるにつれて低下する傾向が認められ、含水率が 24%以上ではすべて発芽能力を失っていた。

3) 液体窒素に貯蔵した結果、含水率が 23%以下では貯蔵前とほぼ同様な発芽能力を有していた。これらの結果から、貯蔵花粉の平均含水率と寿命とのあいだにきわめて深い関係があること、また低温が発芽能力の保持に効果があることが確認された。

4) 以上のことから、花粉を1年間以上貯蔵しようとする場合は、平均含水率を 8%以下に調整する必要があり、調整後の貯蔵容器は含水率が変化しないように密栓する必要がある。また、この場合の貯蔵温度は、電気冷蔵庫で得られる低温で貯蔵の目的にかなうと思われる。

5) さらに、雄花を室温下で十分乾燥させたのち花粉を採集すれば貯蔵可能な低含水率花粉が得られること、人工発芽床は予め殺菌すること、貯蔵花粉が粘性を呈していない時は発芽検定をするまでもなく発芽能力を保持していることなど、花粉の取り扱いについてのいくつかの知見を得た。

文 献

- DUFFIELD, J. W. and A. G. SNOW 1941 Pollen longevity of *Pinus strobs* and *Pinus resinosa* as controlled by humidity and temperature. Amer. J. Bot. 28: 175-177
- 市河三次・四手井綱英 1971 樹木花粉の超低温貯蔵に関する研究(1). 京大演報 42: 51-82
- ・ 1973 樹木花粉の超低温貯蔵に関する研究(). 京大演報 44: 47-67
- 梶 勝次・市河三次・久保田泰則 1972 カラマツ花粉の超低温貯蔵に関する研究(II) - 含水率別, 温度別による貯蔵結果と貯蔵方法に対する考察. 北林試報 10: 49-58
- 1978 トドマツ花粉の発芽試験とクローンによる発芽特性. 日林北支講 27: 58-60
- LANNER, R. M. 1962 Controlling the moisture content of conifer pollen. Silvae Genet. 11(4): 114-117
- 武藤憲由・竹野鉄男・吉田静夫・岡本 広・田中館弘 1962 トウヒ属・モミ属花粉の生存期間. 北大演報 21(2): 353-372
- 渡辺光太郎・市河三次 1970 花粉の発芽に関する一, 二の知見. 日花誌 6: 3-8

Summary

For the purpose of fundamental studies on using pollen by controlled pollination, the germination test and the storage test of pollen were made on the longevity of Sakhalin fir (*Abies*

sachalinensis). As outline of experimental designs and results is summarized as follows :

1) In order to establish a practical method of measuring pollen viability , the pollen was germinated at 27 °C with the conditions using seven different sucrose-agar media , i . e . , 1 percent agar concentration plus sucrose concentrations 0 , 5 , 10 , 15 , 20 , 25 and 30 per cent , respectively .

The above experimental results indicated that the optimum sucrose concentration for the viability test of the pollen was 10-15 per cent and the most desirable observation time was 48 hours after setting pollen on the culture medium (Figs . 1 and 2) .

2) The present storage test was limited to the effect of pollen moisture content and storage temperature on the pollen longevity . Pollen of 32 clones with various moisture contents were collected for this preliminary work (Table 2) because the final germinability was not different among the clones under the conditions at 27 °C and 48 hours after setting pollen on the sucrose-agar medium (KAJI , 1978) . The moisture content of each pollen was measured before storage , and each of the tightly stoppered vials containing the pollen was stored in an electric refrigerator at 5 °C and in the liquid-nitrogen at - 196 °C . The viability tests were carried out at intervals of three months for one year under the condition of 12 per cent sucrose-agar medium .

The results indicate that when stored in the refrigerator , the pollen moisture content less than 8 per cent remained its viability for a year . When stored in the liquid-nitrogen , however , most of the pollens kept at less than approximately 23 per cent moisture content had its viability for a year (Table 3) . In both tests , the higher moisture content was , the more loss of the pollen viability occurred .

It is concluded that the most favourable extracting and storing conditions of pollen are to maintain the pollen under the low moisture content . Therefore , the vials containing pollen should be sealed tightly to keep pollen high viability .