

第4章 ニホンナシ ‘幸水’ 花芽、花器の凍結様式

4-1 緒言

植物体の多くの部分は水で構成されており、平均すると、原形質は85~90%、葉緑体やミトコンドリアなどでは50%の水を含んでいる。含水量が特に多いのは果実(85~95%)や、根(70~95%)であり、反対に熟した種子では10~15%の水分しか含まないものもある。このように水は生体構成成分の大部分をしめ、生体の構造を保ち、機能を維持する上で重要な役割を果たしている。植物が氷点下で生存する際には、氷晶の形成は避けることができない現象であると同時に、これは凍結傷害の前提条件として、また低温耐性の機構解明において重要なポイントである(Rodrigo、2000)。凍結障害の要因として、致死的な細胞内凍結の他に、細胞外凍結時の氷晶形成(ice nucleation)による水分ストレスが挙げられる。氷晶の形成と水分含量は関係が深く、一般に水分含量が低く、細胞液の浸透圧が高いと低温耐性が強いことが報告されている(酒井、1982)。さらに、細胞中の溶質の変化が、低温耐性に影響を与えると考えられている(Sasakiら、1998；吉田、1999)。そのため、細胞、組織、器官レベルにおける過冷却や氷晶の形成などを含む凍結様式を明らかにし、制御することができれば、植物における低温耐性機構解明に十分寄与できると思われる。

落葉果樹の花器における霜害は低温そのものよりも、氷晶の形成が要因であると考えられており(Rodrigo、2000)、霜害の防止は氷晶形成の制御が重要である

(Wisniewskiら、1997)。

赤外線サーモグラフィは、植物組織が凍結する時の潜熱の解放を色の変化として視覚的に確認できるため、植物における氷晶の形成やその伝搬を調査するうえで有用であり、モモ、リンゴ、セイヨウナシやクランベリー、クロフサスグリにおいて凍結過程の観察に使用されている(Ceccardiら、1995; Wisniewskiら、1997; Fuller・Wisniewski、1998 ;Workmasterら、1999)。しかし、ニホンナシの花器についての報告は無いため、今回赤外線サーモグラフィによる花器の凍結過程の観察を行った。

液相の水が氷晶に成長する際には鋳型が必要であり、氷核活性物質とはその鋳型として働く物質であると考えられている(荒田、1998)。氷核活性を持つ物質に関する研究の歴史は長く、初めにヨウ化銀が氷核活性を持つことが報告(Vonnegut、1947)され、人工降雨のための氷核として用いられているが、霜害に氷核活性細菌が関わっていることが明らかになったのは、比較的最近のことである(Schnell・Vali、1972)。その後*Pseudomonas syringae*が氷核細菌であることが確認(Makiら、1974)され、氷核細菌が霜害に大きく関わっていることが明らかにされてきた(Ashworth、1992 ; 荒田、1998)。植物において氷晶を形成する要因の一つは氷核活性細菌であるが、一方、最近になってモモの枝(Ashworth、1985a ; Grossら、1988)、ツツジの鱗片(Ishikawaら、1992; Ishikawaら、2000)、冬コムギの葉(Brushら、1994)の細胞壁や細胞内に氷核形成物質があることが報告された。しか

し、植物組織における氷核活性(INA、ice nucleation activity)には、未解明の部分が多く、本章では植物における氷晶の形成を制御していると考えられる氷核活性(氷晶の形成しやすさ)について調査した。

以上のように、本章はニホンナシ‘幸水’花器における傷害機構に関して、赤外線サーモグラフィによる観察や花器における氷核活性の測定を行い、その凍結様式(freezing pattern)を明らかにすることを目的とした。

4-2 赤外線サーモグラフィによるニホンナシ‘幸水’花器の凍結過程の観察

4-2-1 材料および方法

筑波大学農林技術センターにおいて育成した、ニホンナシ‘幸水’の2年生苗を1998年10月20日に畑土とソイルミックス(サカタのタネ)の混合土(6:4)を培土とした直径25cmのポットに鉢上げし、自然日長下で生育させた。灌水は慣行に従い、培土表面の乾燥状態で判断し、2mm程度灌水した。実験に供した2001および2002年の展葉期から幼果期にかけて、ポット植樹は120cm程度に切り戻し、樹高を調節した。ポット植樹はまず2°Cで30分間低温順化させた後、-6°Cに設定した低温庫に移した。冷却ファンからの風は、発泡スチロールの板でポット植樹に直接当たらないようにした。

花芽および幼果における凍結時の温度変化過程は、赤外線サーモグラフィビデオカメラ(model TVS-2000MK、NIPPON AVIONICS)を使用して観察し、熱画像はフロッピーディスクに記録した。記録した熱画像は赤外線熱画像分析ソフトウェア(PicEd Avio、NIPPON AVIONICS)により解析を行った。発熱現象を表示するために、温度範囲は紫(-5°C)から白(-2°C)で表示した。選択した温度範囲よりも下の温度は黒で、上の温度は白で表示した。37本のポット植樹を観察し、その中から最も明瞭な画像を選んだ。また、記録したサーモグラフィから花器の各部位の凍結曲線を作成し、過冷却点(過冷却が破れる温度)を凍結(開始)温度とした。

4-2-2 結果及び考察

ポット植樹を -6°C の低温に曝露させた場合、花器組織の温度は10分以内に急激に $-6\sim-4^{\circ}\text{C}$ に下がった。さらに凍結時の温度変化(発熱現象)は、平均 $1\sim3^{\circ}\text{C}$ の温度の上昇が明らかな色の変化として観察できた(第23図)。花蕾期の花器においては花托よりも花柄においてより速く温度が下がり、その後、約 $-6\sim-5^{\circ}\text{C}$ まで過冷却した。最初の凍結は、花弁、がく片および花托周辺で起こることが観察できた(第23図、A~D)。その後、最初の凍結による発熱が確認されてから、100秒以内には凍結は花柄に伝搬していった。花蕾期における花の各組織の平均凍結温度は、花弁では $-5.6\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ($n=12$)、花托が $-5.2\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ($n=8$)、花柄が $-5.8\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ($n=8$)であった(第1表)。

開花直後の花器においても、花托に比べ花柄で先行して温度が下がって行き、約 $0.5\sim 2^{\circ}\text{C}$ 低かった。その後、 $-6\pm 1^{\circ}\text{C}$ まで過冷却した。まずがく片・花托の部分が、第23図E~Hで明るい色で示されているように凍結し始め、その後90秒以内にその凍結は花弁や花柄に伝搬していった。開花期の花における平均の凍結温度は、花弁では $-5.3\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ($n=20$)、花托が $-5.2\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ($n=70$)、花柄が $-6.0\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ($n=40$)であった(第1表)。凍結試験後、花そうは著しく傷害を受け、個々の小花において水浸状や褐変した組織が観察された。

幼果においては果実よりも花柄の先行的な温度低下が著しかった。花蕾期および開花期の花器とは異なり、 -6°C に約1時間曝露させたが、凍結による温度の上昇は

確認できなかった。しかし凍結試験後、果実の表面にまだらの染みの傷害の様子が確認できた(第24図)。

以上のようにニホンナシ花器の凍結過程の観察には、赤外線サーモグラフィが有効であることが示された。今回の実験において花蕾期、開花期の花器において凍結はがく片・花托周辺から始まっており、その後花器全体に拡がっていくことが確認された。前章の凍結試験で示されたように花器において傷害を受けた組織は、最初花托で確認され、その後、より低温に曝露するにつれて胚珠、雌ずいや花弁、花柄に拡がっていった。したがって、凍結試験後の傷害の現れる様子と赤外線サーモグラフィから得られた熱画像の変遷から、氷晶はまずがく片・花托の表皮上、またはその直下に形成され、その後、胚珠を経由して雌ずいや花柄に伝搬していくことが明らかになった。

幼果期の凍結試験では、赤外線カメラにおいて色の変化としての発熱の現象は検出できなかったが、果皮の表面に傷害の様子が観察できた。金田ら(2001)は甘果オウトウの過冷却した花芽が、凍結すること無く雌ずいが傷害を受けることを報告している。ニホンナシの幼果においても、同様な現象が花・果実において起こりえるのかもしれない。

花器の異なる組織において、過冷却できる限界点はその表面積や体積にも左右され異なっていると予想される。しかし、モモにおける氷晶形成とその伝搬についての報告によれば、花器において形成された氷晶は直ちに枝を伝わり、最初の単一の

凍結現象が開花しているモモの結果枝全体の凍結の引き金になる(Wisniewskiら、1997)ことが示されており、氷晶が形成された組織が必ずしも過冷却する能力が低いとは限らない。しかし、今回の実験においては、枝を経由しての花の基部からの氷晶の伝搬は確認できなかった。これはニホンナシの花はモモとは異なり、かさ状の総状花序であり、氷晶の移動は花序の違いにより異なることが考えられた。Carterら(2001)は、クロフサスグリの小花柄における凍結の発熱はとてつもなくあり、解放された熱はすぐに霧散すると報告している。今回の実験においても、最初の小さな氷結の形成を見逃してしまったことも考えられる。

また、今回の実験では鉢植えしたポット植樹を用いたため、開花期の花が着生しているモモの切り枝を用いたWisniewskiら(1997)の結果と異なったことも考えられる。*Rhus laurina*の切り取った葉において凍結試験中、明瞭で急激な発熱が確認されたが、無傷の植物体の葉や莖では明確な発熱はみられない(Boorseら、1998)ことから、ポット植樹は切り枝に比べ、氷晶の侵入が難しいと考えられる。ニホンナシ

‘幸水’においても、花そう間および花そうの中で傷害を受けた花と受けない花が混在したことから、モモの花芽(Quammeら、1995)やクロフサスグリ花器(Carter、1999)の凍結や傷害のパターンに関係するとされている、氷晶の伝搬を防ぐ障壁がニホンナシでも存在する可能性が示された。クロフサスグリでは、凍結した花柄と隣接している小花柄が、過冷却し続けた現象も確認されている(Carterら、2001)。

もう一つの要因は速い冷却速度である。今回の実験において予冷した樹体を -6°C の低温庫に移動させたが、約10分間で $-6\sim-4^{\circ}\text{C}$ まで低下し、Wisniewskiら(1997)の実験に比べ速い冷却速度であった。Kakuら(1980)はツツジの冬芽における小花を用いた凍結試験において、冷却速度が遅いときよりも早いほうが、凍結時の発熱は 0°C 近くの高い温度でおこると報告している。Ashworth (1992)も速すぎる冷却速度は、過冷却の大きさを過大評価する恐れがあると指摘している。反対に氷晶の形成は温度そのものに相関があると仮定されるので、冷却速度はそれほど重要でないという意見もある(Lindowら、1982; Hiranoら、1985)。加えて低温環境下で赤外線サーモグラフィによって計測された表面温度は、熱電対での測定温度よりも低い温度を示すとの報告もある(宮下・米谷、1999)。

ニホンナシ‘幸水’の花器において、雌ずいや子房は霜害に対してもっとも被害を受けやすい部位である(猪俣ら、1993; 猪崎、1985)が、今回の実験から最初に氷晶が形成する部位はがく片・花托であり、またニホンナシの開花期のステージが進むにつれて、霜害に対する抵抗性は無くなっていく(小沢・本田、1955)が、花器の異なる器官の凍結開始温度は、ステージが違ってもそれほど変わらなかった。このように氷晶の形成しやすさと最終的な被害の大きさとの間に特に相関は見られなかった。このことはニホンナシ‘幸水’の花器においては、それぞれの組織の水核活性と低温耐性の間に明確な関係がないことを示唆するものである。

今回の実験から、花托周辺で氷晶が形成されることが推定されたが、ニホンナシ

‘幸水’の霜害にあった花は、花托の表皮の下に空隙を持つことが多かった。クランベリーでは葉の表皮表面で形成された氷晶が気孔を通って体内に侵入し、果実表面では、ていあ部の蜜腺の跡から侵入して、葉や果実の凍結が始まる(Workmasterら、1999)。ニホンナシでは氷晶形成が表皮の上なのか、その下なのかは判断できなかったが、第2章で示したように、低温試験により褐変した組織は初め胚珠にあらわれ、その後雌ずいに拡がっていくこともあわせると、氷晶は花托周辺でまず形成され、胚珠を介して雌ずいまで伝搬していく可能性が考えられた。

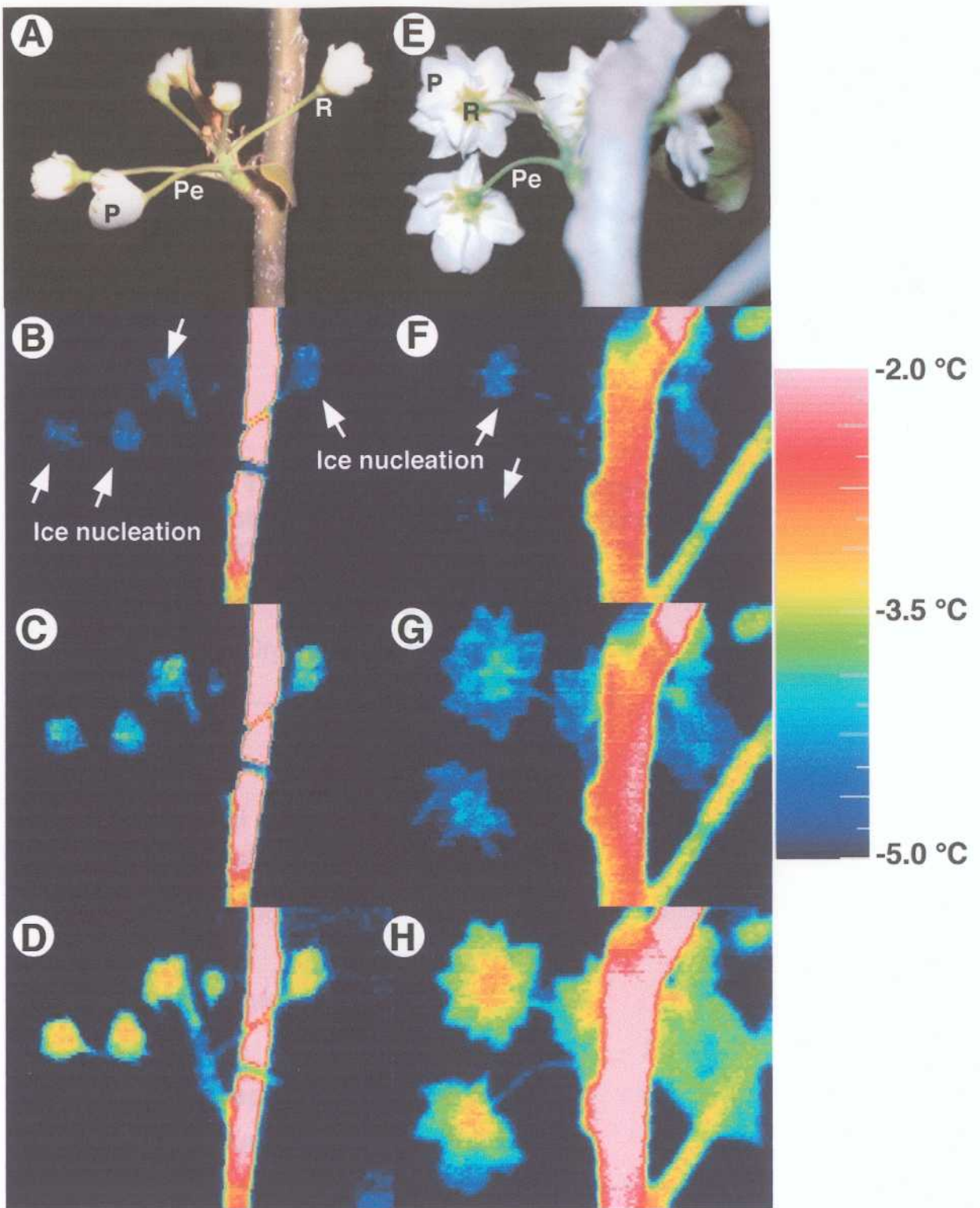


Fig. 23. Ice nucleation and propagation in potted Japanese pear 'Kousui' tree at balloon and flowering stage as seen with IR video thermography during freezing test. Colors of the temperature range from violet (colder, -5°C) to white (warmer, -2°C). With balloon flowers (A, B, C, D), the IR images in each of B through D are shown in time order. Ice nucleation initially occurred in petals (P), sepals and/or receptacle (R) after the temperature of their tissues decreased at about $-5\sim-6^{\circ}\text{C}$ (B, arrow) and then propagated out along the peduncle (Pe) within 100s after ice nucleation (C, D). With opening flowers (E, F, G, H), the IR images in each of F through H are shown in time order. The sepals and/or receptacle (R) were initially frozen as indicated by the bright region (F, arrow), and then the ice nucleation propagated to the petals (P) and along the peduncle (Pe) within about 90s after the freezing event began (G, H).

Table 1. The mean ice nucleation temperature of each organ during freezing test in potted Japanese pear tree.

Stage/Organs	Temperature when freezing began	n
	°C	
Balloon		
Petal	-5.6 ± 0.3	12
Receptacle	-5.2 ± 0.4	8
Peduncle	-5.8 ± 0.2	8
Open flower		
Petal	-5.2 ± 0.3	20
Receptacle	-5.2 ± 0.1	70
Peduncle	-6.0 ± 0.2	40

Values are means ± SE.

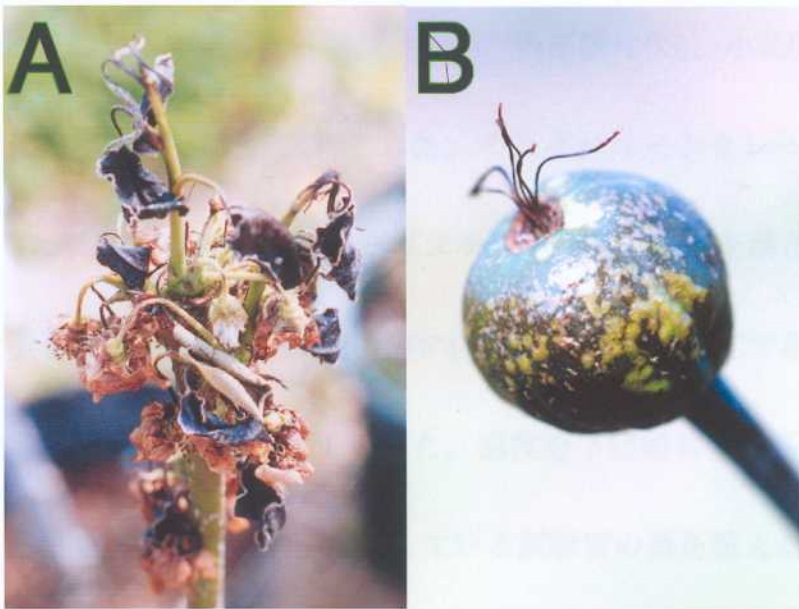


Fig. 24. Freezing injury of Japanese pear 'Kousui' 2 days, after the freezing test. The damaged tissues spread from flower to peduncle (A). The visible spotty stain appeared on the skin of young fruit (B).

4-3 ニホンナシ‘幸水’のハードニング・デハードニングにおける氷核活性の変化

4-3-1 材料および方法

氷核活性の測定は、Ishikawaら(2000)の方法に従って行った(第25図)。供試植物としては、筑波大学農林技術センター内で栽培されている花蕾期から幼果期のニホンナシ品種‘幸水’の新梢および花芽を使用した。新梢(一年生枝)は節の部分を除き、0.5cm長に切り、花芽は外部鱗片(OS)、内部鱗片(IS)、小花(FL)、包葉(BR)の各部位ごとに分解し(第2図)、試料とした。それぞれオートクレーブをかけた滅菌水2mlとともに試験管に入れ、40%ポリエチレングリコールを満たした凍結試験用のバスに設置した。各部位ごとに20個体ずつ測定した。0.3°Cで温度平衡させた後、1.0°Cずつ段階的に温度を下げていった。温度を下げ始めてから25分間、設定した温度で平衡させ、その後、水が凍結している試験管の数を数えた。50%の試験管が凍結した温度を氷核活性とした(第25図)。凍結したサンプルはオートクレーブ(121°C、20分)で加熱した後、クリーンベンチ内で滅菌水を取り替え、再び氷核活性を測定した。また花器の各器官の乾物重も測定した。

4-3-2 結果及び考察

1999年の秋における外部鱗片、内部鱗片および新梢における氷核活性は、小花および包葉に比べ高い値であった(第26図)。鱗片の氷核活性は秋から春にかけて-4~

6°Cの間でほぼ一定の値であった。それに対し、小花、包葉ではハードニング期である10月末から2月にかけて、それぞれ-12.6°Cから-6.0°C、-10.4°Cから-5.6°Cと急激に活性が上昇した。2000年もほぼ同様の傾向であったが小花、包葉における氷核活性の上昇の時期が、前年よりも早まっていた。この年次の違いは、実験年度の気温の違いによるものだと考えられた。また、気温が上昇し低温耐性が減少するデハードニング期に、測定したいずれの部位についても厳冬期とほぼ同程度の高い氷核活性を保っていた。

細菌による影響を除外するため、オートクレーブ後の氷核活性も測定したところ、枝において測定期間中わずかに低下した(第26図)。また、小花では測定開始した秋季においては、オートクレーブ後の氷核活性が約1.8°C低下したが、ハードニング後はその差が約1°Cに縮まっていた。鱗片、包葉において明らかな低下はみられなかった。これらのことから、ニホンナシの花芽においても氷核活性細菌による影響だけでなく、植物の組織によって、その活性にも差があることが示唆された。オートクレーブ後、枝において氷核活性が低下したが、これは試料の大きさが他の部位に比べ大きかったため、オートクレーブにより組織が破壊された際に漏れだした溶質が影響し、滅菌水を一回取り替えただけでは不十分だったたのかもしれない。小花において、ハードニングにつれてオートクレーブ後の氷核活性の低下が少なくなったのは、小花に存在する氷核活性物質が熱により変成しにくくなったと考えられた。

この実験において鱗片では、小花に比べ氷核活性が比較的高かったことから、より氷晶形成を効率的に行う氷核物質が存在していると考えられた。Prestonら(1986)は、氷晶の形成温度と組織の重量間には対数関係があると報告している。小花や包葉の乾物重は鱗片に比べ小さく、このサンプルの大きさが過冷却や氷晶の形成に影響を与えた可能性も考えられた(第27図)。しかし、その大きさが他の組織に比べ著しく大きかったが、枝における氷核活性はそれほど高いわけではなく、組織における質的な氷核活性の違いもあると考えられた。

多くの植物で花芽内の小花の細胞は細胞外凍結する能力に乏しく、細胞内凍結を起こしやすい。しかし、凍結している周囲の組織からの氷晶の連鎖的な形成を防ぎ、器官ぐるみで器官内の水分を外部に氷晶として析出させ、凍結脱水を促進させる器官外凍結をしている(酒井、1982)。示差熱分析の結果から、ニホンナシの花芽は器官外凍結は行わないと考えられてきた(Rajashekarら、1982)。しかしKangら(1998)はニホンナシの花芽でも花芽は器官外凍結を行い、小花を過冷却させ低温傷害を回避していると報告している。本実験では厳冬期の2月に、花芽のついた枝を $-2^{\circ}\text{C}/\text{h}$ で温度を下げていき、凍結させると比較的冰核活性が高い値であった鱗片の間や包葉の周囲に氷晶が形成されているのが観察できた(第28図)。しかし、小花の細胞が細胞外凍結を起こしているのか、または花芽が器官外凍結することにより小花が過冷却しているのかは判定できなかった。

氷核形成の要因としては内的小および細菌など表面に着生している外的要因が考え

られており、越冬植物において観察される氷核活性は、それらを合計した氷核の形成しやすさとして表されている(Brushら、1994)。今回の実験においては、植物の組織自身が細胞壁や細胞内に存在する内生の氷核活性なのか、氷核活性細菌などの外生の要因によるものなのかは完全には区別できなかつたが、ニホンナシの花芽はハードニングにともない、小花や包葉において氷核活性の上昇がみられ、氷核活性が花芽の低温による傷害に大きく関与していることが明らかとなった。しかしデハードニング中でも、花芽の氷核活性は高い活性を維持したことから、低温耐性、氷核活性の間の関係は必ずしも直接的ではなく、多くの複雑な機構を含んでいると考えられた。

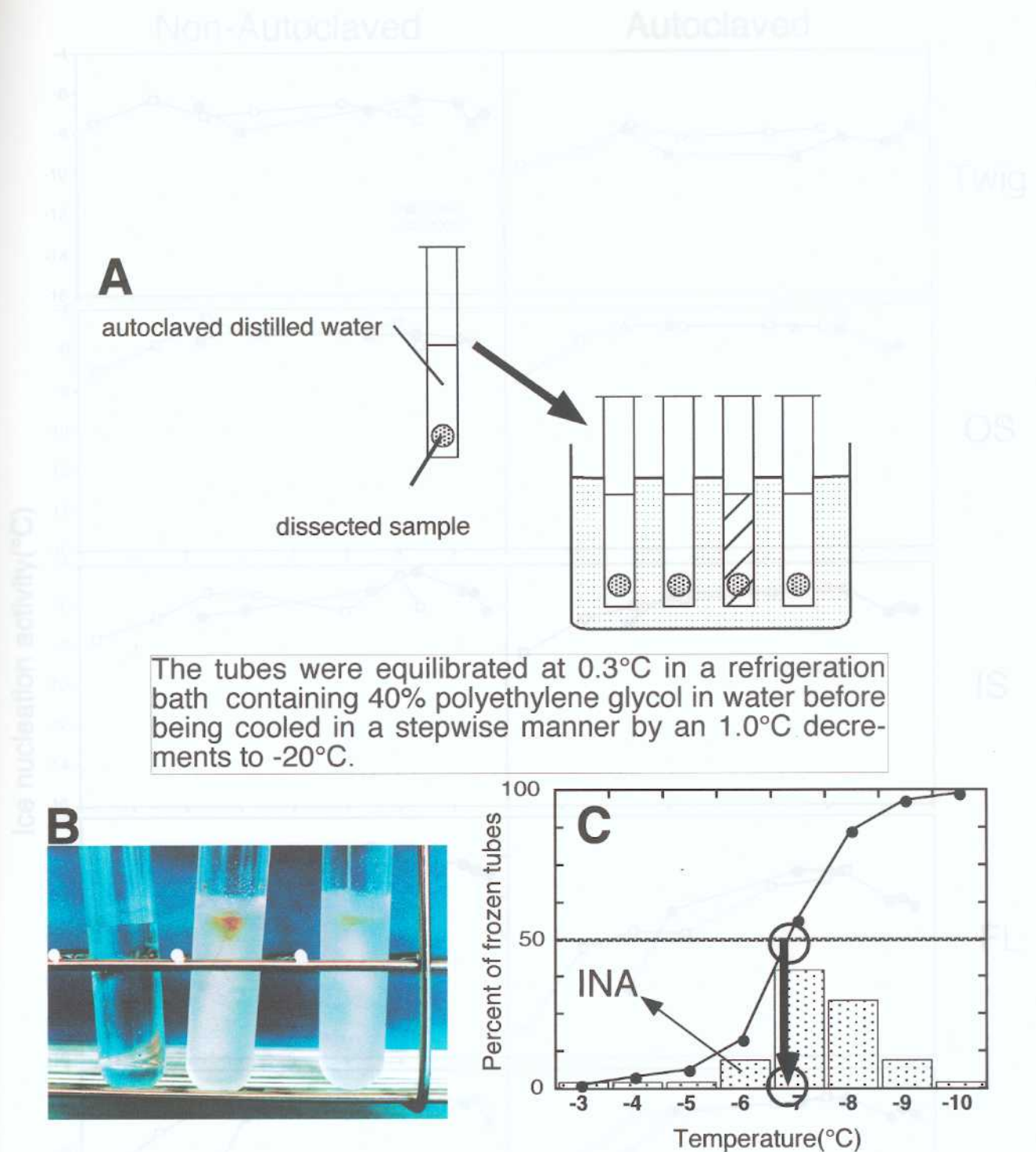


Fig. 25. Ice nucleation assay. The tubes were equilibrated at 0.3°C in a refrigeration bath containing 40% polyethylene glycol in water before being cooled in a stepwise manner by an 1.0°C decrements to -20°C(A). The tubes were allowed to equilibrate at each designated temperature for 25 min. and the number of tubes frozen was determined(B). Ice nucleation activity(INA) were calculated as the temperature at which 50% of tubes was frozen(C).

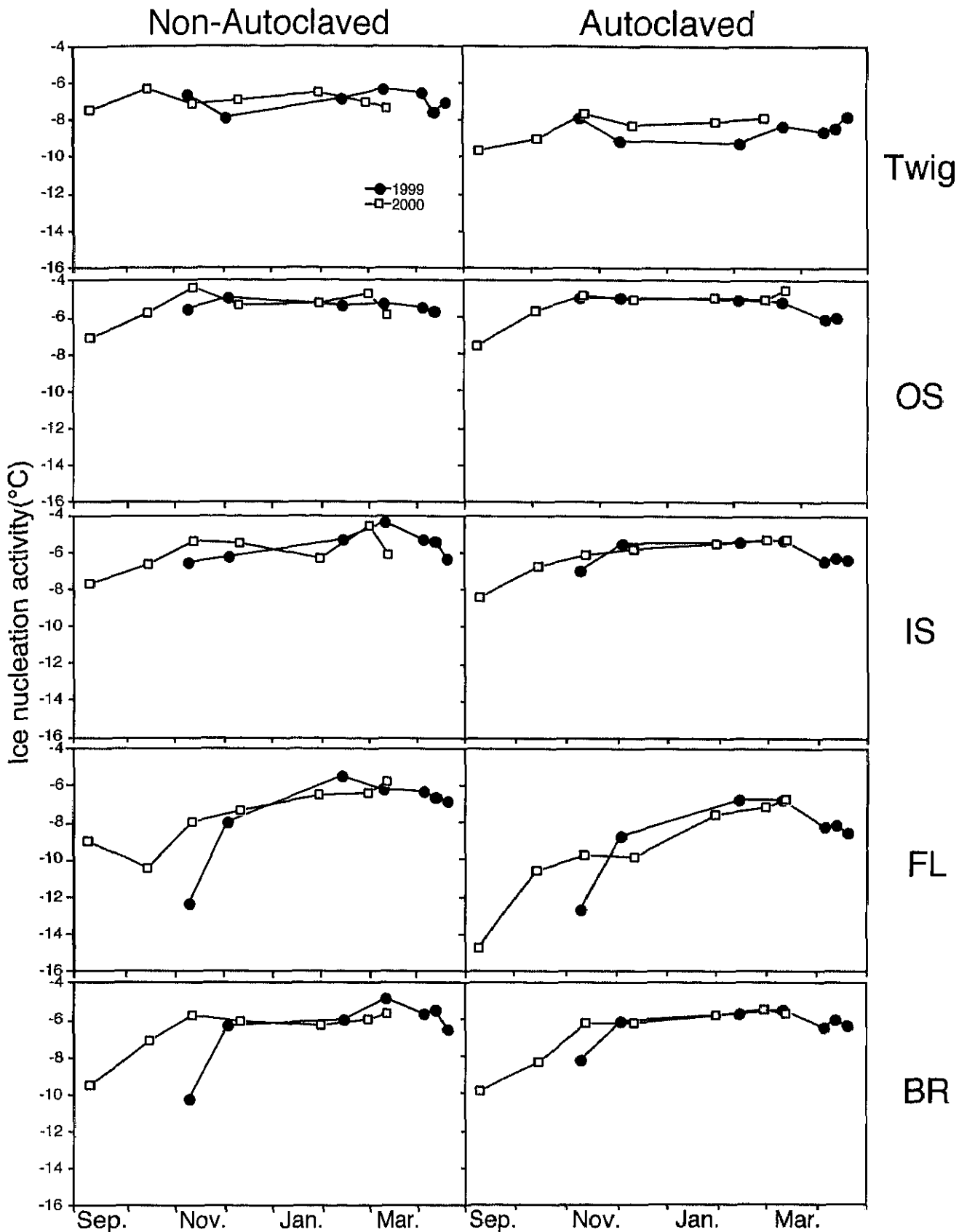


Fig. 26. Seasonal changes in ice nucleation activity (INA) before and after autoclaved of one-year-old twig or a winter bud component tissue; outer scales (OS), inner scales (IS), florets (FL) and bracts (BR) dissected from winter buds of Japanese pear 'Kousui' in 1999-2001. INA was measured using the tube nucleation assay with a total of 40 samples. The INA were calculated as the temperature at which 50% of tubes were frozen. Autoclaved; supposed to be eliminated the affect of bacteria.

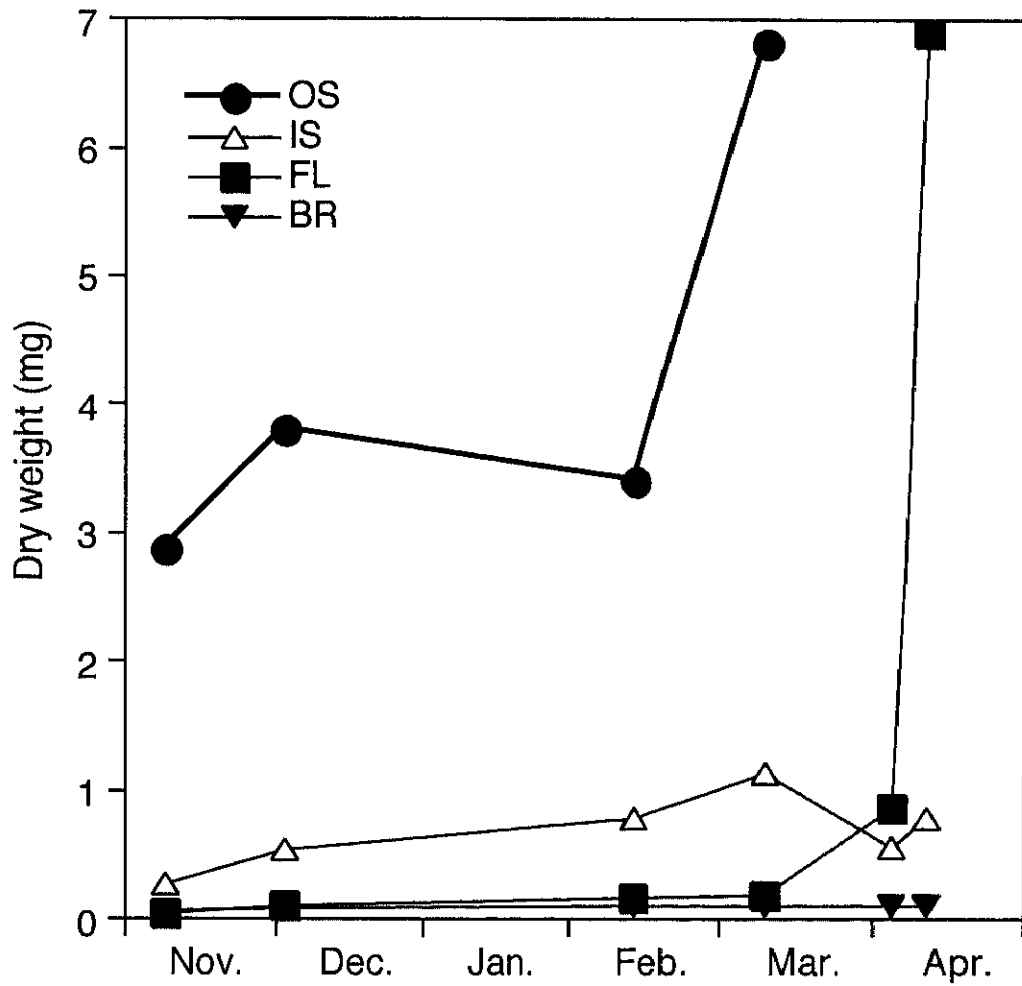


Fig. 27. Seasonal changes in dry weight of a winter bud component tissue; outer scales (OS), inner scales (IS), florets (FL) and bracts (BR) dissected from winter buds of Japanese pear 'Kousui' in 1999-2000.

4-4 ニホンナシ「華水」花蕾の水核活性

4-4-1 材料および方法

水核活性の測定は前節と同様に行った。供試植物は、筑波大学農林技術センター内で栽培されているニホンナシ品種「華水」の花蕾を用いた。開花期の直前に花弁、雄ずい、雌ずい、花托、がく片、花柄に分解し、オートクレーブ処理の水核活性を測定した(節29図、第2表)。またそれぞれの乾燥量も測定した。水核活性の測定はそれぞれの器官を20個体ずつ、4反復行った。

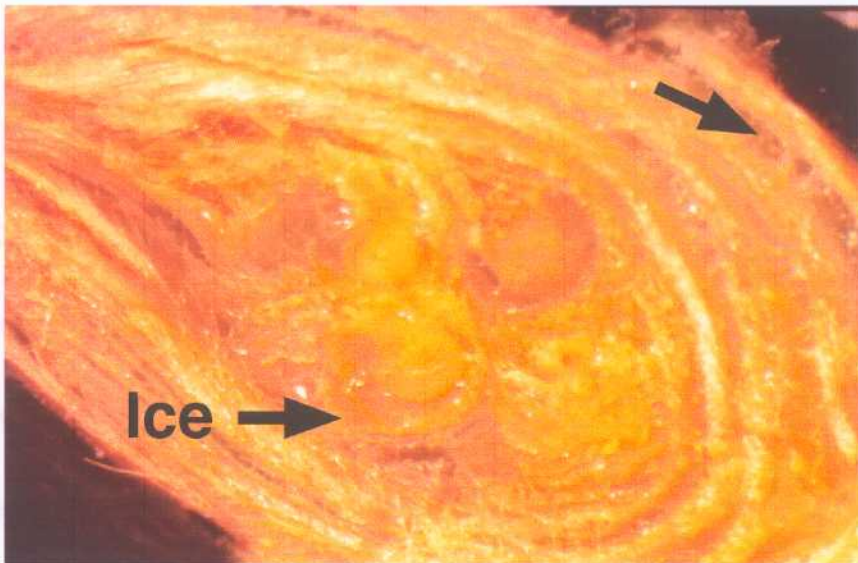


Fig. 28. A winter flower bud exposed to subfreezing temperature. Ice crystals were located in the space between florets and bracts and within scales where INA was fairly high.

4-4 ニホンナシ ‘幸水’ 花器の氷核活性

4-4-1 材料および方法

氷核活性の測定は前節と同様に行った。供試植物は、筑波大学農林技術センター内で栽培されているニホンナシ品種 ‘幸水’ の花器を用いた。開花期の花器を花弁、雄ずい、雌ずい、花托、がく片、花柄に分解し、オートクレーブ前後の氷核活性を測定した(第29図、第2表)。またそれぞれの乾物重も測定した。氷核活性の測定はそれぞれの器官を20個体ずつ、4反復行った。

4-4-2 結果及び考察

ニホンナシ ‘幸水’ の開花期の花器における氷核活性は、雄ずい -14.1 ± 0.9 °C、雌ずい -13.9 ± 1.2 °Cと非常に低かったのに比べ、花托、がく片、花柄はそれぞれ、 -6.9 ± 0.1 °C、 -8.4 ± 0.2 °C、 -8.2 ± 0.4 °Cと高い活性を示した(第2表)。高い氷核活性を示した花托やがく片は、雌ずいや雄ずいよりも、より効果的に氷核を形成する物質を含んでいると考えられた。雌ずいや雄ずいの乾物重は、花托やがく片に比べ非常に小さく、前述したように質量や大きさの違いが、氷核の形成や過冷却に影響を与えたかもしれない。しかし、乾物重の大きい花托とがく片でも、氷核活性は同程度であり、組織における質的な氷核活性の違いも重要であると考えられた(第3表)。氷核活性が比較的高かったがく片・花托は、IRカメラでの観察(第4章1節)のように、凍結試験中、花器の中で最初に凍結が始まる部位であり、ニホンナシ ‘幸水’ 花器の凍結様式に、氷核活性が大きく関与していることが示唆された。オート

クレープ後の氷核活性は、雄ずいを除いてすべての器官において1.5～3.3°C低下した。しかし、がく片、花托、花柄は約-10°Cと雄ずいや雌ずいに比べ氷核活性が高く、氷核活性細菌による影響だけでなく、植物の各器官由来の活性にも差があることが示唆された。

一方、氷核活性がともに低かった雌ずいと雄ずいは、低温耐性の強さは前章で示したとおり、両者間で大きく異なっており、雌ずいがもつとも弱い部類に入るのに対し、雄ずいは比較的低温耐性が強かった。そのため雌ずいが低温環境下で傷害を受けやすいのは、雌ずい自体の氷核活性の影響よりも、すでに凍結した部位からの氷晶の連鎖的な形成により、雌ずいでも凍結が起こり、その結果傷害が発生してしまうことが考えられた。また過冷却中の代謝の異常など、他の機構による要因も推察された。氷核活性が高い花托やがく片は、花器の中でも凍結しやすい性質をもち、前章で示したように凍結試験時にも傷害の兆候が最初に現れるが、その程度は比較的軽微であった。このことはこの器官が氷晶を形成しやすい性質とともに、比較的高い低温耐性を持っていることを示している。Carter(1999)が報告しているように、氷晶の伝搬を防ぐ障壁が無い場合は、最初の単一の凍結現象が次々の隣接する部位に氷晶は連鎖的な形成していく。したがってがく片や花托で形成された氷晶が連鎖的に形成され、組織間を伝わっていき、氷核活性は低いいため過冷却しやすいが、低温耐性も弱い胚珠や雌ずいに致命的な傷害を与えてしまうのかもしれない。

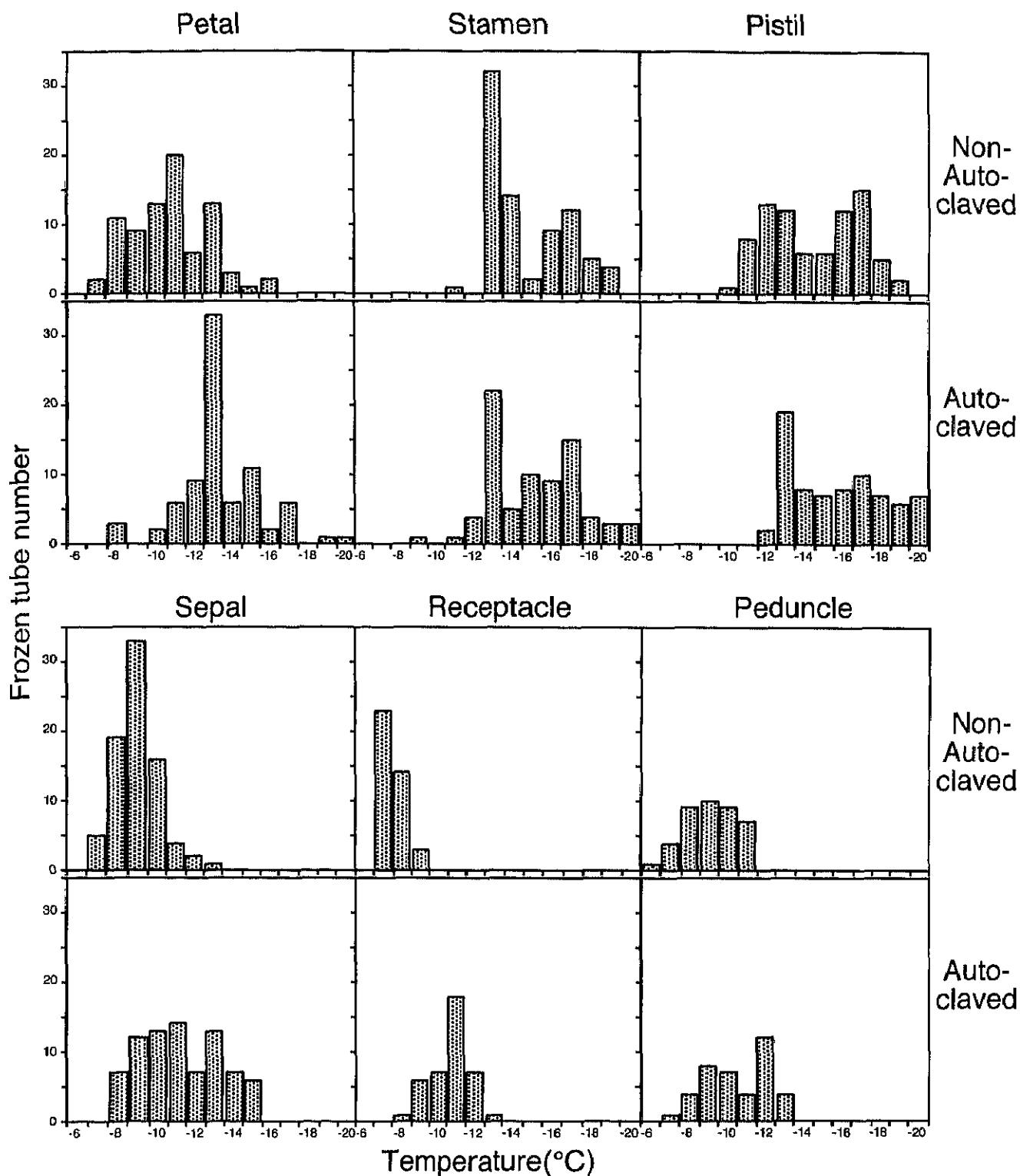


Fig. 29. Comparison of ice nucleation activity as expressed by frozen tube numbers before and after autoclaving assay of petals, stamens, and pistils, receptacles (including ovules), sepals and peduncles dissected from flowers of Japanese pear 'Kousui'. A total of 80 tissue samples were used each experiment.

Table 2 . Ice nucleation temperature of petals, stamens, pistils, receptacles, sepals and peduncles dissected from flowers of Japanese pear 'Kousui' .

	Initial ice nucleation temperature(°C)		Ice nucleation activity(°C)	
	Non-Autoclaved	Autoclaved	Non-Autoclaved	Autoclaved
Petal	-7.3±0.3 a	-9.8±0.7 ab	-10.1±0.4 b	-12.7±0.3 ab
Stamen	-11.3±0.9 b	-11.5±0.9 bc	-14.1±0.9 c	-14.7±1.0 b
Pistil	-10.8±0.4 b	-13.0±0.7 c	-13.9±1.2 c	-15.4±1.4 b
Sepal	-6.8±0.0 a	-8.3±0.5 a	-8.4±0.2 ab	-10.2±0.6 a
Receptacle	-6.8±0.0 a	-9.3±0.5 ab	-6.9±0.1 a	-10.2±0.3 a
Peduncle	-7.3±0.6 a	-7.8±0.4 a	-8.2±0.4 ab	-10.3±0.7 a

Means indicated by different letters within a column are significantly different by Tukey-Kramer test (p=0,05). Values are means of four replications ± SE.

Table 3 .Comparison of fesh and dry weight among flower components in; petal, stamen, pistil, receptacle, and peduncle of ‘Kousui’ Japanese pear flower.

	Fresh weight(mg)	Dry weight(mg)	Water content (%)
Petal	16.32 ± 0.91	2.07 ± 0.11	87.3 ± 0.2
Stamen	1.11 ± 0.05	0.20 ± 0.01	81.7 ± 0.7
Pistil	0.53 ± 0.03	0.02 ± 0.00	96.6 ± 0.7
Sepal	10.24 ± 0.73	1.51 ± 0.10	85.2 ± 0.3
Receptacle	47.10 ± 5.59	6.91 ± 0.90	85.4 ± 0.4
Peduncle	55.75 ± 3.19	6.84 ± 0.61	87.8 ± 0.6

Values are means of six replications ±SE.