

## 平成23年度 岩手県農業研究センター試験研究成果書

区分	指導	題名	リンドウ越冬芽を用いた超低温保存法	
[要約] リンドウ品種の原体や親系統を維持するため、低温にあたったリンドウの株の越冬芽を用いることで保存前の培養を要しない簡易な超低温保存法が可能となる。低温処理や前培養を省くことで、処理時間も5時間程度に短縮される。				
キーワード	リンドウ	越冬芽	超低温保存法	技術部野菜花き研究室

## 1 背景とねらい

岩手県で育成した花き品種の原体や F<sub>1</sub> 親の一部は組織培養により維持している。組織培養による維持は、圃場での維持に比べ病害が回避できるなど効率的かつ安定的な手法であるが、コストがかかることが難点であり、より低コストで省力的な手法の導入が望まれる。

昨今、低コストで遺伝的変異が起こればとされている液体窒素 (-196℃) を利用した保存方法 (以下超低温保存法) が遺伝資源保存法として普及されつつある。リンドウでも茎頂部分を使ってガラス化法、ビーズガラス化法などの手法が確立されている (文献 (1))。これらの手法よりも、越冬芽を用いることで、操作を簡易にすることが可能か検討を行う。

## 2 成果の内容

- (1) 越冬芽を用いることで、従来法で行っていた保存前の組織培養を省略した超低温保存が可能となり、処理時間も短縮される (表 1, 2, 図 2, 3, 4)。

表 1. 越冬芽を用いた超低温保存法の手順

手順	方法
試薬調整	試薬を調整する
前処理	1 圃場の株から、越冬芽を採取する。 2 リン片葉を数枚むき、土のついた部分を除去する。
滅菌処理	3 越冬芽を流水で30分洗浄。中性洗剤の入った液中でスターラーを回して10分間洗浄する。その後流水で30分洗浄する。 4 70%エタノール中で1.5分浸漬後、有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で3分滅菌する。その後3回滅菌水で洗浄する。
凍結保存処理	5 保存用チューブに越冬芽を入れ、液体窒素中に保存する。
融解	6 37℃の温水で2-3分振とうして解かす。
培養	7 茎頂培養を行い、23℃で培養する。

- (2) 根雪前に採取した越冬芽を用いると、低温処理をしなくても保存が可能である。(表 3)

## 3 成果活用上の留意事項

- (1) 越冬芽は12月根雪前の低温遭遇後に採取したものである。  
(2) 超低温保存で必要とする主な資材、器具類は表5に示したとおりである (表 5, 図 4)。  
(3) 変異は現段階見られていないが、今後も観察を続ける予定である。

## 4 成果の活用方法等

- (1) 適用地帯又は対象者等 リンドウ育種に係わる個人及び団体

## (2) 期待する活用効果

- ア. 誰でも保存操作が簡易で、誰でも作業できる。  
イ. 電気を使用しないため、停電の影響を受けない。  
ウ. 容器 (50cm(縦)×50cm(横)×70cm(高さ)) 1本にチューブ 180本分の保存が可能で、省スペースである。

## 5 当該事項に係る試験研究課題

(H19-05) 岩手県オリジナル花き遺伝資源の超低温保存法の確立 [H19~23/県単研究]

## 6 研究担当者

星 伸枝

## 7 参考資料・文献

- (1) 植物超低温保存マニュアル 2006年3月 農業生物資源研究所  
(2) 星ら(2011), リンドウ種苗生産のための組織培養システム, 岩手県農研センター研究報 11: 17-33

## 8 試験成績の概要（具体的なデータ）

表2 越冬芽を用いた方法とビーズガラス化法の所用時間の比較\*

作業	越冬芽を使った方法		ビーズガラス化法(従来手法)	
	時間	内容	時間	内容
試料採取		圃場の株から越冬芽採取		培養物の茎頂を採取
試薬調整	10分		4時間	
低温処理	—		20日	5°C、前培養
前処理	1時間	採取、調製	25時間	茎頂培養後、5°C処理
滅菌処理	2.5時間	洗浄、滅菌	—	
ビーズガラス化処理	—		4.5時間	茎頂包埋
凍結保存処理	15分	越冬芽をチューブに入れ、液体窒素へ保存	15分	ビーズをチューブに入れ液体窒素へ保存
融解	5分	37°C、2-3分	5分	37°C、1-2分
培養	1時間	茎頂培養	0.5時間	ビーズを培地へ置床
計	<b>5時間</b>		<b>21日13時間40分</b>	
メリット	操作時間の短縮 操作が簡易		材料の採取時期がいつでも可能	
デメリット	材料の採取時期が限定		保存前操作に組織培養が必要 ビーズ作製が難しい	



図1. ビーズガラス化法でのビーズ



図2. 調製前の越冬芽

\*10 個体供試した場合とした

表3 越冬芽を用いた超低温保存後の生存率\*

供試系統	採取日	供試数(本)	生存個体数(本)	生存率(%)*	枯死(本)	コンタミネーション(本)
エゾリンドウ早生系1	H22.12.10,21	11	10	90.9	0	1
エゾリンドウ早生系2	H22.12.21	5	2	40	3	0
エゾリンドウ中生系1	H22.12.14	11	6	54.5	4	1
エゾリンドウ晩生系1	H22.12.21	15	11	73.3	2	2
エゾリンドウ晩生系2	H22.12.14	8	7	87.5	0	1
エゾリンドウ晩生系3	H22.12.14	12	11	91.7	0	1

\*生存率は融解後(液体窒素から出して茎頂培養後)2カ月経過後の値

表4 ガラス化法、ビーズガラス化法を用いた超低温保存後の生存率

供試系統	手法	供試数(個)	生存数 (生存率)	
			融解2カ月後	融解1年後
エゾリンドウ早生系	ガラス化法	23	14(61%)	13(59%)
	ビーズガラス化法	16	13(80%)	7(43%)
エゾリンドウ晩生系	ガラス化法	20	14(70%)	14(70%)
	ビーズガラス化法	20	15(75%)	5(25%)



図3. 越冬芽を用いた超低温法の融解後に培養した植物体

表5 農研センターで使用している器具類

器具	規格等	参考価格(円)
液体窒素保存容器	MVE社製、容量36L、ケーン36本収容可能	338,000円/個
サンプル保存ケーン	1本あたり1.8mlチューブ5個収容	7,000円/50本
サンプル保存用チューブ	1.8ml容器	28,350円/450本
液体窒素	初回30L、以降6~7カ月毎に25L ずつ追加必要。480円/L	14,400円/30L



図4 超低温保存用容器(左)とケーン及び保存用チューブ(右)