

熱に弱いプラスチック容器を用いたランの簡便な無菌増殖

梁川 正・三木裕子・片平香織

京都教育大学 〒612-8522 京都市伏見区深草藤森町 1

Sterile micropropagation for orchids using plastic vessels by direct application of chlorine disinfectants

Yanagawa, T., Y. Miki and K. Katahira

Kyoto University of Education, 1-Fukakusa-Fujinomori-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612-8522

The sterile medium could be prepared without autoclaving by immediately incorporating various chlorine disinfectants into the medium. In these cases, all chlorine disinfectants tested were effective for sterile medium preparation. The media could be used for sterile cultures in various micropropagation processes of orchids. Spraying the surface of a medium and the whole explants with chlorine disinfectants after inoculating was effective for inoculating explants sterilely and for subsequent sterile cultures under non-sterilized conditions. These techniques could be applied to the following cultures, shoot tips of *Cymbidium*, PLB and plantlets of *Cymbidium*, flower stem section, leaf section, plantlets of *Phalaenopsis* and seed sowing of orchids. The treated levels of incorporated and sprayed chlorine disinfectants suppressed in vitro contamination and did not appear to be toxic to PLBs and plantlets of orchids tested. Propagated plantlets which were cultured on the disinfectant incorporated medium and handled with spraying treatments under non-sterile conditions could survive without harming tissues and were raised without in vitro contamination. The results of this study showed a simple micropropagation system for orchids using plastic vessels and bags that cannot be sterilized by autoclaving. The present study using common chlorine disinfectants revealed several functions of the chlorine disinfectants: medium sterilization and maintaining sterility of cultures. In these cases, hypochlorous acid in the chlorine disinfectants plays an important role in maintaining of in vitro sterility. We showed that residual chlorine remained in the media incorporated chlorine disinfectants even after 60 days of the medium preparation.

緒言

ラン類の増殖には、無菌培養の手法が用いられているが、筆者らは、オートクレーブやクリーンベンチを用いずに無菌培養できることを報告した(Yanagawa ら 1995、2001)。また、ランの他、キクやアスパラガスなどを用いて、簡便に無菌培養できることも報告している(Yanagawa ら 1998、2000、2007、Kohmura ら 1999)。こうした簡便な培養法は、これらの植物やその他の花卉種苗の無菌増殖の簡便化に貢献できるものと考えられる。

本報告では、種々の塩素殺菌剤によって、熱に弱い様々なプラスチック容器を用いて、ランを簡便に無菌培養して増殖する方法について報告するとともに、塩素殺菌剤を加用した培地における残留塩素濃度を測定して、培地中の残留塩素が培地の無菌化と植物の生育に及ぼす影響についても検討した。

材料および方法

表 1 に示す様々な塩素殺菌剤、次亜塩素酸ナトリウム(アンチホルミン)(有効塩素濃度 約10%)、塩素化

イソシアヌール酸(同 60%)、次亜塩素酸カルシウム(同 60%)、次亜塩素酸ナトリウムを含む市販塩素系台所用漂白剤花王キッチンハイター(同 6%)、をそれぞれ加用処理した滅菌培地を作成して、それらの培地で培養した植物の生育の様子を調査した。培地は全て、ショ糖 20g/l、寒天 8g/l を加えた Murashige & Skoog(MS)培地(1962)とし、各種塩素殺菌剤を各々有効塩素濃度0.005%になるように加えた後、pH5.8に調整して溶解し、200ml エルレンマイヤーフラスコに分注して滅菌培地を作成した。塩素殺菌剤を加えない区ではオートクレーブ滅菌を行った。これらの培地に、クリーンベンチ内で茎頂培養由来のシンビジウムのシュート切片を植えつけ、そのシュート切片の生長の様子を調査した。

0.005%次亜塩素酸ナトリウムを加用した上記の実験と同様の MS 寒天培地と、ショ糖 20g/l を含んだ MS 液体培地をつくり、それらを熱に弱い様々なプラスチック容器(ポリエチレン袋、ポリエチレンテレフタレート容器、ペットボトル)(表 2)に分注し、さらに、栓の種類を変えて滅菌培地を作成した。一定期間後、タクミナ製残留塩素計を用いて培地中の残留塩素濃度を測

定した。なお、対照区はエルレンマイヤーフラスコとした。また、上述の容器に分注した寒天培地にシラン (*Bletilla striata*) の種子を植えつけ、容器の違いと培地中の残留塩素がシラン幼苗の生育に及ぼす影響について検討した。

さらに、100円ショップ等で市販されている安価なプラスチック容器として、表3に示すような様々な7種類の容器、すなわち、ポリプロピレン箱形容器、スチロール製カップ、ポリエチレン袋、ペットボトル等を培養容器として用いて、そこに、茎頂培養由来のシンビジウムのPLB塊と幼植物体を植えつけて、これらのプラスチック容器の培養容器としての可能性について検討した。各容器は新品のものを無殺菌で各区10~12容器を供試し、培地には塩素殺菌剤を加用した上述の培地を分注して培養に用いた。

培養条件は、いずれの実験についても、温度25±1、湿度50~60%、光3000ルクス16時間日長とした。

実験結果および考察

種々の塩素殺菌剤を加用した培地でシンビジウムのシュート切片を培養した結果、いずれの塩素殺菌剤加用区において汚染切片は全くみられず、滅菌培地を得ることができた。シンビジウムシュート切片の生存数についてみると、市販塩素系漂白剤では最も低い値であった(表4)。これは、市販塩素系漂白剤に含まれる次亜塩素酸ナトリウム以外の成分が植物の生育を阻害したためではないかと考えられた。しかし、正常に生育してPLBやシュートを形成した切片も観察できたことから、市販塩素系漂白剤を培地滅菌に用いることは可能であると考えられた。

各種のプラスチック容器に分注し、栓を変えて封をした容器の培地中の残留塩素濃度を測定した結果、液体培地、寒天培地ともに、最初の15日間のうちにほとんどの塩素が培地中から抜け出た。また、様々な容器や栓の違いについては大きな差異はみられず、液体培地に比べると寒天培地の方が残留塩素濃度の減少する速度が遅いことがわかった。培地作成後60日目においても、残留塩素の存在が確認されたことから、この残留塩素によって培地の無菌化が比較的長い期間保持できていると考えられる(表5、6、図1)。また、全てのプラスチック容器および栓を用いた培養実験において、シランの種子は正常に発芽し、容器や栓の違いによる発芽率やシラン幼苗の生育状態に

差はみられなかった。

シンビジウムのPLB塊と幼植物体を様々なプラスチック容器を用いて培地を分注して作成した培養容器で培養した結果、供試したどの培養容器で培養した場合でも、汚染したものが全く認められずに培養することができ、PLB塊からのシュートの生長およびPLBの増殖が認められ、これらのプラスチック容器が培養容器として利用可能であることがわかった(写真から)。

さらに、これらのプラスチック容器に分注された培地を用いて、シンビジウムの茎頂切片の培養やコショウランの花茎腋芽培養、葉切片培養、PLB増殖培養、無菌播種を行った結果、いずれも、汚染することや塩素殺菌剤の薬害の影響なく、培養できることを確かめている。また、上記の培養を非無菌条件下で行い、切片等を植えつけた後に、塩素殺菌剤を噴霧することにより、無菌培養ができることも確認している。

摘要

ランを無菌培養して増殖する種々の培地に、数種の塩素殺菌剤の他、市販の塩素系漂白剤も用いることが可能であることがわかった。また、その培養容器に100円ショップで市販されているような安価なプラスチック容器が利用できることが明らかとなり、各種のプラスチック容器に残留する塩素濃度を測定した結果、培地作成後60日目においても培地中に残留する塩素の存在が確認され、この残留塩素によって培地の無菌化が長期間保持されていると考えられた。また、上記の培養を非無菌条件下で行い、切片等を植えつけた後に、塩素殺菌剤を噴霧することにより、無菌培養ができることも確認した。

引用文献

- 1) Yanagawa, T., M. Nagai, T. Ogino and R. Maeguchi. 1995. Application of disinfectants to orchids seeds, plantlets and media as a means to prevent in vitro contamination. *Lindleyana* 10:33-36.
- 2) Yanagawa, T. 2001. Simple sterile culture for orchid seeds, PLBs and plantlets by direct application of chlorine disinfectants. *Proceedings 7th Asia Pacific Orchid Conference*. Nagoya, Japan.
- 3) Yanagawa, T., X. Chen and S. Usui. 1998.

Simple micropropagation using direct application of chlorine disinfectants for orchids. Abstracts XXV International Horticultural Congress. pp. 417-418.

4) Yanagawa, T. 2000. Simple sterile culture using chlorine disinfectants for ornamentals. International Symposium on Biotechnology Application in Horticultural Crops. p.142. Beijing, China.

5) Yanagawa, T., R. Tanaka and R. Funai. 2007. Simple micropropagation of ornamentals by direct application of chlorine disinfectants without equipment. Acta Horticulturae 764

6) Kohmura, H., T. Yanagawa and M. Tanaka. 1999. An efficient micropropagation system using disinfectant incorporated medium and film culture vessel for in vitro plant regeneration of asparagus. Acta Horticulturae 479:373-380.

7) Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-479.

表1 実験に用いた塩素殺菌剤

| 塩素殺菌剤の種類 | 有効塩素濃度 |
|----------------------------|--------|
| 次亜塩素酸ナトリウム(アンチホルミン) | 約 10 % |
| 塩素化イソシアヌール酸(商品名:ハイライト) | 60 % |
| 次亜塩素酸カルシウム(さらし粉) | 60 % |
| 市販塩素系殺菌剤(花王製、商品名:キッチンハイター) | 6 % |
| オートクレーブ(対照区) | - |

表2 実験に用いたプラスチック容器

| 容器の種類 | 栓の方法 | 容器の容量 | 培地分注量 |
|-------------------------------|--------------------|-----------------|--------|
| ポリエチレン袋 (ポリ袋) | 熱栓 | 83 mm × 118 mm | 100 ml |
| | 輪ゴム | | |
| | ジッパー | 114 mm × 168 mm | 150 ml |
| ふた付きポリエチレンテレフタレート容器 (ポリ容器) | セロハンテープ (セロテープ) | 129 × 97 H | 250 ml |
| | パラフィルム | | |
| ペットボトル (PET) | 専用フタ | 500 ml | 150 ml |
| | アルミホイル (アルミ) | | |
| エルレンマイヤーフラスコ (フラスコ) | アルミホイル (アルミ) | 200 ml | 80 ml |

表3 培養容器に用いた7種類のプラスチック容器

| 容器の種類 (商品名) | 材質(容量) (栓) | 形状 | 分注量 (ml) | オート クレーブ |
|--------------------|--|------|-------------|-------------|
| 小分けパック | ふた:ポリエチレン 容器:ポリプロピレン (縦5cm×横8cm×高さ3.5cm) | 箱形 | 60 | 不可 |
| クリアカップ | スチロール樹脂(225ml) (アルミホイル) | コップ型 | 80 | 不可 |
| ポリエチレン袋 | ポリエチレン(100×190mm) (熱栓) | 袋型 | 80 | 不可 |
| クリアパック (チャック付き) | ポリエチレン(98×138mm) (チャック) | 袋型 | 80 | 不可 |
| クリアパック (チャック付き) | ポリエチレン(114×168mm) (チャック) | 袋型 | 150 | 不可 |
| クリーンカップ | ポリエチレンテレフタレート (専用フタ) (直径130×高さ100mm) | 円柱型 | 250 | 不可 |
| ペットボトル | ポリエチレンテレフタレート(500ml) (専用フタ) | 円柱型 | 150 | 不可 |

表4 各種塩素殺菌剤を加用した培地に植えつけたシンビジウムシュート切片の培養結果

| 塩素殺菌剤の 種類 | 供試切 片数 | 生存切 片数 (%) | 汚染切 片数 (%) | 枯死切片 数(%) | PLB形成 切片数 (%) | シュート形成 切片数(%) |
|--------------|-----------|------------------|------------------|--------------|---------------------|------------------|
| アンチホルミン | 20 | 16(80) | 0(0) | 0(0) | 16(80) | 12(60) |
| ハイライト | 20 | 16(80) | 0(0) | 2(10) | 10(50) | 10(50) |
| さらし粉 | 20 | 16(80) | 0(0) | 2(10) | 4(20) | 16(80) |
| キッチンハイター | 20 | 10(50) | 0(0) | 10(50) | 8(40) | 10(50) |
| オートクレーブ | 20 | 18(90) | 0(0) | 2(10) | 4(20) | 8(60) |

培養後90日目の結果

表5 様々な容器に分注した液体培地に含まれる残留塩素(ppm)

| 液体培地 | フラスコ・ア ルミ栓 | ポリ袋・熱栓 | ポリ袋・ 輪ゴム 栓 | ポリ袋・ ジッパー 栓 | PET・専 用フタ | PET・ア ルミ栓 | ポリ容 器・セロ テープ | ポリ容 器・パラ フィルム |
|------|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|-----------------|--------------------|---------------------|
| 0日後 | 1.103±0.020 | | | | | | | |
| 15日後 | 0.040± 0.063 | 0.048± 0.0075 | 0.050± 0.0063 | 0.040± 0.0000 | 0.050± 0.0090 | 0.048± 0.012 | 0.056± 0.010 | 0.056± 0.010 |
| 45日後 | 0.028± 0.0075 | 0.036± 0.0080 | 0.016± 0.0049 | 0.048± 0.0040 | 0.054± 0.0080 | 0.074± 0.013 | 0.036± 0.0049 | 0.040± 0.0063 |
| 60日後 | 0.030± 0.0063 | 0.050± 0.0063 | 0.044± 0.0049 | 0.048± 0.0040 | 0.048± 0.0074 | 0.038± 0.010 | 0.044± 0.0080 | 0.046± 0.0049 |

表 6 様々な容器に分注した寒天培地に含まれる残留塩素 (ppm)

| 寒天培地 | フラスコ・アルミ栓 | ポリ袋・熱栓 | ポリ袋・輪ゴム栓 | ポリ袋・ジッパー栓 | PET・専用フタ | PET・アルミ栓 | ポリ容器・セロテープ | ポリ容器・パラフィルム |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
| 0 日後 | 1.09 ± 0.036 | | | | | | | |
| 15 日後 | 0.24 ± 0.0090 | 0.178 ± 0.0075 | 0.202 ± 0.0075 | 0.220 ± 0.021 | 0.228 ± 0.0098 | 0.204 ± 0.019 | 0.222 ± 0.0075 | 0.250 ± 0.0090 |
| 45 日後 | 0.074 ± 0.0049 | 0.276 ± 0.022 | 0.074 ± 0.0080 | 0.078 ± 0.0075 | 0.138 ± 0.0075 | 0.152 ± 0.015 | 0.246 ± 0.0049 | 0.246 ± 0.012 |
| 60 日後 | 0.134 ± 0.0049 | 0.108 ± 0.0075 | 0.048 ± 0.0040 | 0.064 ± 0.012 | 0.076 ± 0.010 | 0.106 ± 0.014 | 0.078 ± 0.0040 | 0.084 ± 0.010 |

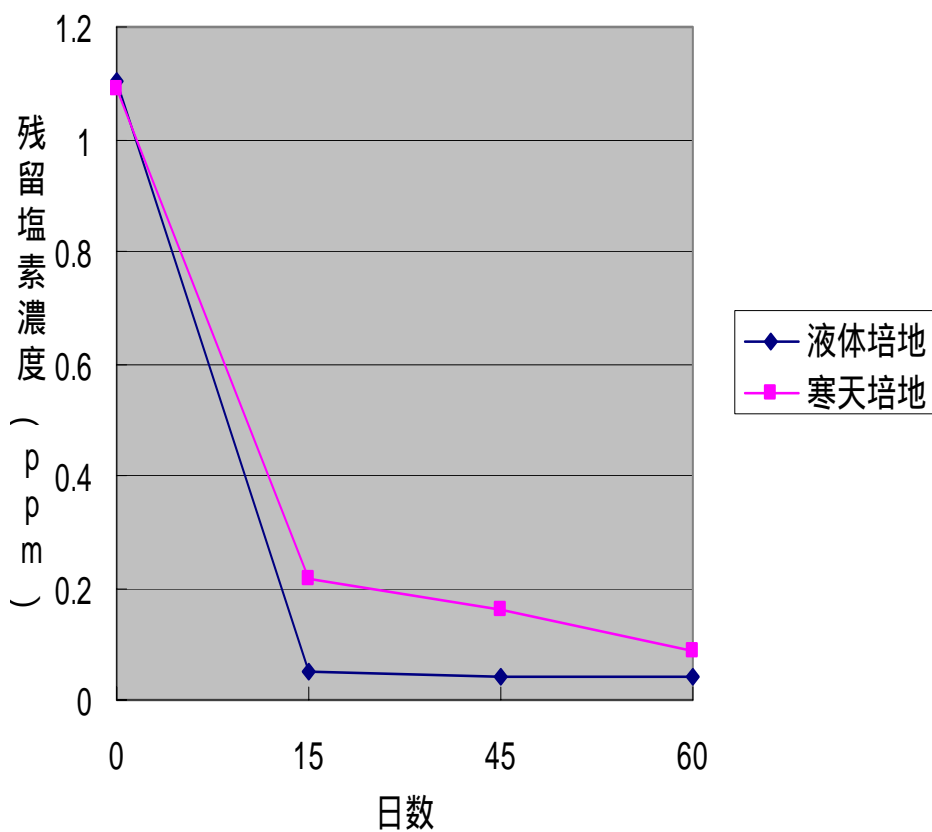


図 1 液体培地と寒天培地における培地中の残留塩素の推移



写真 小分けパック(ポリプロピレン製)



写真 クリアカップ(スチロール樹脂製)
アルミホイル栓



写真 ポリエチレン袋、熱栓



写真 クリアパック小(チャック付き)(ポリエチレン製)



写真 クリアパック大(チャック付き)(ポリエチレン製)



写真 クリーンカップ(ポリエチレンテレフタレート製)



写真 ペットボトル(ポリエチレンテレフタレート製)