

家庭用漂白剤を用いたランの簡便な無菌増殖

梁川 正・姫野洋子

京都教育大学 〒612-8522 京都市伏見区深草藤森町 1

Simple micropropagation for orchids by direct application of commercial bleaches containing chlorine disinfectants

Yanagawa, T. and Y. Himeno

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 commercial bleaches containing chlorine disinfectants into the medium. In these cases, all commercial bleaches 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 the commercial bleaches 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, PLBs and shoots of *Cymbidium* and seed sowing of *Blettilla striata*. The treated level (0.005%) of incorporated and sprayed commercial bleaches suppressed in vitro contamination and did not appear to be toxic to PLBs and shoots of the orchids tested. Propagated plantlets which were cultured on the commercial bleaches incorporated medium and handled with spraying treatments under non-sterile conditions could survive without harming tissues and were raised without in vitro contamination.

We concluded that our techniques which were easy to prepare media and to inoculate explants and to maintain sterile cultures without special equipment should be applied to in vitro micropropagation procedures of other horticultural plants. These simple micropropagation methods may be applied to not only for micropropagation methods in the home but also for studies of students in schools and for horticultural practices without soil for people of middle and advanced age because of easy methods using common commercial bleaches.

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、前報(梁川ら 2009)に引き続き、ランを家庭や学校等の無菌培養のための設備の無いところでも簡便に無菌培養を行う方法を開発することを目的として、市販の家庭用漂白剤を用いて、簡便な操作で無菌培養して増殖する方法について報告する。

材料および方法

表 1 に示す(A)、(B)、(C)の家庭用漂白剤を実験に用いた。いずれの漂白剤も次亜塩素酸ナトリウムを

含んでいるが、メーカーによって濃度に違いがあると同時に、界面活性剤と水酸化ナトリウムが含まれている。これらの家庭用漂白剤をそれぞれ加用処理して滅菌培地を作成した。培地に加用する濃度として、含有する次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素濃度に応じて、それぞれの家庭用漂白剤を加用して、0.1%、0.01%、0.005%、0.001%の 4 実験区を設けた。実際に培地に加用する家庭用漂白剤の量は、培地 1リットルに対して、(B)の 5%を含むものを 1ml 加用する場合に 0.005%とみなし、それを基準として(A)、(C)区の加用量を決定した。培地は、ハイポネックス(N:P:K=6.5:6:19)3g/l、ショ糖 20g/l、寒天 8g/l を加えた Kano の培地(1965)とし、各家庭用漂白剤を所定の濃度になるように加えた後、pH 調整せずに加熱して溶解し、200ml エルレンマイヤーフラスコ(培地 70ml 分注)と硬質試験管(18×140mm、10ml 分注)に分注して滅菌培地を作成した。フラスコと試験管の他に、チャック付きポリエチレン袋(大創産業製、12mm×8.5mm、厚さ 0.04mm)に 70ml 分注した培地とポリエチレン容器(直径 129mm×高さ 90cm、250ml 分注)も作

成した。ポリエチレン袋とプラスチック容器は新品のものを無殺菌で供試し、培地を調合後、培地の温度が 70 に低下してから容器に分注した。このようにして作成した滅菌培地に、茎頂培養由来のシンビジウム (*Cymbidium*) 品種ピコレディの PLB 塊切片 (約 5mm 角)、シュート切片またはシラン (*Bletilla striata*) の種子を植えつけた。各培養容器に植え付けた切片数は、1 容器当たり、エルレンマイヤーフラスコには 4 切片、硬質試験管には 1 切片、ポリエチレン袋には 3 切片、プラスチック容器には 5 切片とした。対照区として、家庭用漂白剤を加用せずに培地を作成し、同じエルレンマイヤーフラスコ及び硬質試験管に分注してオートクレーブ滅菌する区も設けた。

植え付けの場所は非無菌のオープン条件下とクリーンベンチ下とし、オープン下で植え付け後には、加用した家庭用漂白剤 (0.005%) と同じの漂白剤を有効塩素濃度 0.005% に希釈した液を培地と植え付け材料の上に噴霧した。噴霧には、500ml 容量のスプレーボトルを用い、400ml の蒸留水に対して、家庭用漂白剤 (A) : 0.33ml、(B) : 0.4ml、(C) : 0.5ml を入れて有効塩素濃度 0.005% になるように調整した。培養容器の栓はフラスコと試験管はアルミホイルを用い、ポリエチレン袋はチャックで、ポリエチレン容器は専用のふたで封をした。また、噴霧する際の噴霧回数を 1 回 ~ 4 回に比較した実験も行った。

上記の実験では、蒸留水を培地及び家庭用漂白剤噴霧用希釈液の作成に用いたが、一部の実験では、さらに簡便に実施するために蒸留水を用いずに、培地作成及び漂白剤噴霧用希釈液作成用に水道水を使用して同様の実験を行った。また、学校等の授業等で多人数に対していっせいに実験を行う際の汚染を回避するために、大きなポリエチレン袋を用いて植え付け操作を行う実験も試みた。

植え付けた培養物は、本学環境教育実践センターの培養室で培養を行った。培養室の培養条件は、温度 25 ± 1 、湿度 50 ~ 60%、蛍光灯光 3000 ルックス 16 時間日長とした。培養後、上記の培養物の様相を定期的に調査した。

実験結果および考察

供試した家庭用漂白剤にはいずれも水酸化ナトリウムが含まれているので、培地調合の際に pH 調整を行わずとも、弱酸性の培地を作成することができた。この点からも家庭用漂白剤は簡便な培地作成のためには好都合であった。種々の家庭用漂白剤を加用し

た培地でシンビジウムの PLB 切片を培養した結果、いずれの漂白剤も培地滅菌に有効であった。加用濃度については、0.005% 加用区が生存切片数や変色切片数を考慮した場合にもっとも適当であると考えられた。漂白剤の種類で比較すると、(A) に対して、(B) または (C) を使用した場合に汚染切片がやや少ない結果であった (表 2)。

非無菌のオープン条件下でシンビジウム PLB 塊切片の植え付けを行い、その直後に、加用した家庭用漂白剤と同じものを噴霧して培養した結果、培地の汚染は極めて少なかったが、葉害と考えられる変色した切片や枯死切片が観察された。試験管やポリエチレン袋培地ではとくに変色や枯死切片が多く認められた (表 3)。これは、試験管区やポリエチレン袋区がプラスチック容器区に比べて培地の表面積が狭く、培地表面や植え付けた切片が噴霧された家庭用漂白剤の希釈液に一部浸される状態であったことによることが要因であると考えられた。

シンビジウム PLB 塊切片の植え付けを行い、その後に噴霧するスプレーの噴霧回数を比較して実験を行った結果、上述の実験の噴霧量はやや多いために変色や枯死切片が多くみられたものと考えられ、試験管やポリエチレン袋では 1 回で、プラスチック容器では 2 回の噴霧量で十分な効果があることがわかり、葉害を軽減させるための噴霧量の目安を得ることができた (表 4)。したがって、培養容器の大きさすなわち培地面の広さに応じて噴霧する量を調節することが必要であると考えられる。なお、使用したスプレーボトルの各噴霧回数における平均の噴霧量は、噴霧 1 回 2.33ml、2 回 5.17ml、3 回 7.5ml、4 回 8.7ml であった。

シンビジウムのシュート切片を PLB 塊切片と同様に培養を行った結果、PLB 塊切片と同様の傾向を認めた。

水道水を用いて、ハイポネックス培地の作成を試み、家庭用漂白剤を加用して調合した培地をチャック付きポリエチレン袋に分注して封をした滅菌培地に、シランの種子を非無菌のオープン条件下で播種した結果、正常に発芽させて苗を得ることができ、水道水の利用も可能であることを認めた (図 1)。さらに、1 人で実験室にて操作する他、大学生 40 人の実験実習の授業の中で、シランの無菌播種を非無菌のオープン条件下でいっせいに実施し、この実験の際に、シランの種子の準備と播種、その直後の家庭用漂白剤 (B) の噴霧を大きなポリエチレン袋内で

行ったグループと袋を用いずに実験台の上で行ったグループでの培養結果を表5に示すように比較した結果、ポリエチレン袋内で操作を行い、その中で培地に家庭用漂白剤を噴霧した場合、汚染は全くみられず、多人数の中で実験操作を実施する場合の簡便な改善方法を示すことができた。

摘要

ランを無菌培養して増殖する寒天培地の滅菌に、市販のいずれの家庭用漂白剤を加用して用いることが可能であることがわかった。培養容器には安価なプラスチック容器をすることができた。上記の培地への植え付けは、非無菌条件下でも行うことができ、切片や種子等を植えた後に、家庭用漂白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。この際に、大きなポリエチレン袋の中に培地や植え付け材料、スプレー等を入れておいてから、上記の操作を行って植え付けると、汚染がほとんどみられず、ランの無菌培養、無菌増殖を家庭や学校等でたいへん簡便に行える方法であることを認めた。

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 7 th 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) 梁川 正・三木裕子・片平香織.2009. 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. *名古屋国際蘭会議記録 2009* pp.47-52.

7) 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.

8) Kano, K. 1965. Studies on the media for orchids seed germination. *Mem. Fac. Agric. Kagawa Univ.* 20:1-68.

表1 実験に用いた家庭用漂白剤

家庭用漂白剤の種類	製造会社、成分
(A) <u>クレイクレイ</u>	ライオン製、成分...次亜塩素酸ナトリウム：6%、界面活性剤：アルキルアミンオキシド、水酸化ナトリウム(塩素系) / 液性：アルカリ性))
(B) <u>キッチンハイター</u>	花王製、成分...次亜塩素酸ナトリウム：5%、界面活性剤(アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム)、水酸化ナトリウム(アルカリ剤) / 液性：アルカリ性
(C) <u>キッチンブリーチ</u>	タカマツヤ製、成分...次亜塩素酸ナトリウム：4%、界面活性剤(アルキルアミンオキシド)、水酸化ナトリウム / 液性：アルカリ性

表2 クリーンベンチ下で植え付けたシンビジウム PLB 塊切片に及ぼす家庭用漂白剤加用の影響

加用した家庭用漂白剤	有効塩素濃度	汚染切片数	生存切片数	変色切片数	PLB の大きさ	シュート形成切片数	シュート数	シュートの長さ
(A)キレイキレイ	オートクレーブ	0	23	0	1.6	23	11.6	1.8
	0.1%	0	0	26	0.5	0	-	-
	0.01%	0	18	8	1.6	18	10.7	1.5
	0.005%	3	19	7	1.6	16	9.6	1.3
	0.001%	10	16	9	1.3	16	9.3	1.2
(B)キッチンハイター	オートクレーブ	0	26	0	1.8	26	12.9	1.7
	0.1%	0	0	26	0.5	0	-	-
	0.01%	0	26	0	1.4	26	15.9	1.5
	0.005%	1	26	0	1.8	26	15.5	1.9
	0.001%	8	26	0	1.2	26	13.8	1.3
(C)キッチンブリーチ	オートクレーブ	0	23	0	1.6	23	11.6	1.8
	0.1%	0	0	26	0.5	0	-	-
	0.01%	0	18	8	1.6	18	10.7	1.5
	0.005%	4	19	7	1.6	16	9.6	1.3
	0.001%	11	16	9	1.3	16	9.3	1.2

エルレンマイヤーフラスコと試験管で合計26切片を培養後、60日目の結果

表3 培地に加用し、非無菌のオープン条件下で植え付け後噴霧した家庭用漂白剤(0.005%)がシンビジウム PLB 塊切片に及ぼす影響

噴霧した家庭用漂白剤 (植え付け場所)	培養容器 (加用した家庭用漂白剤 0.005%)	供試切片数	汚染切片数	生存切片数	変色切片数	枯死切片数	PLB 増殖切片数	発芽 PLB 数
(A)キレイキレイ (非無菌条件下)	硬質試験管(A)	10	0	4	6	6	4	0
	ポリエチレン袋(A)	15	0	9	6	6	9	2
	プラスチック容器(A)	10	0	5	5	5	4	3
(B)キッチンハイター (非無菌条件下)	硬質試験管(B)	10	0	10	3	0	7	7
	ポリエチレン袋(B)	15	2	13	7	2	5	5
	プラスチック容器(B)	10	0	9	4	1	5	5
	硬質試験管(オートクレーブ)	10	0	7	3	3	7	5
(クリーンベンチ)	硬質試験管(オートクレーブ)	10	0	10	0	0	10	8
(C)キッチンブリーチ (非無菌条件下)	硬質試験管(C)	10	2	8	5	2	8	4
	ポリエチレン袋(C)	15	3	9	7	6	9	6
	プラスチック容器(C)	10	5	4	5	6	3	3

培養後 30 日目の結果

表4 非無菌のオープン条件下で植え付け後噴霧する家庭用漂白剤(B) (0.005%)の回数がシンビジウム PLB 塊切片に及ぼす影響

培地滅菌の方法	培養容器の種類	植え付け場所	噴霧回数	供試切片数	汚染切片数	変色、枯死切片数	PLB 増殖切片数
(B)キッチンハイター加用 (0.005%)	ポリエチレン袋	オープン条件下	1回	12	0	6	11
			2回	12	0	6	12
	プラスチック容器		2回	10	0	1	9
			4回	10	0	4	8
	ポリエチレン袋	クリーンベンチ	無	12	0	1	9
			プラスチック容器	無	12	0	0
オートクレーブ	硬質試験管	オープン条件下	1回	10	0	0	10
		クリーンベンチ	無	10	0	0	10

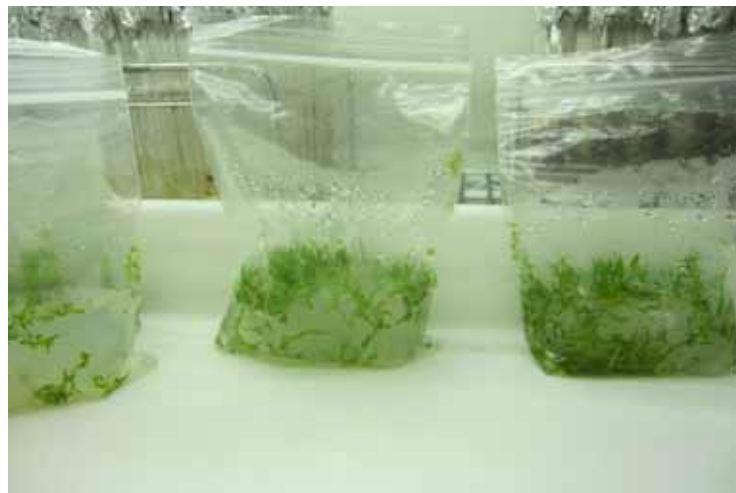
培養後 30 日目の結果

表5 非無菌条件下での植え付け操作実験時のポリエチレン袋の有無とシランの播種実験

実験方法	ポリエチレン袋の使用の有無	供試容器数	汚染容器数	発芽容器数
1人で実験室にて実施	有	10	0	10
	無	10	2	8
大学生に対する 40 人の授業で実施	有	40	0	40
	無	40	19	21

ポリエチレン袋培地に播種後、家庭用漂白剤(B)0.005%を噴霧して、培養後 30 日目の結果

図1 水道水を用い、家庭用漂白剤により滅菌処理したシランの無菌播種結果



(オープン条件下でポリエチレン袋培地に播種後 50 日目の写真)