

家庭用漂白剤による寒天を用いない培地でのランの簡便な無菌増殖

梁川 正・里 昌幸

京都教育大学 〒612-8522 京都市伏見区深草藤森町 1

Simple micropropagation for orchids on agarless medium by direct application of commercial bleach

Yanagawa, T. and M. Sato

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

The sterile agarless medium could be prepared without autoclaving by immediately incorporating commercial bleach containing Sodium Hypochlorite into the medium. In this case, instead of agar, several materials were tested as medium. Folded gauze soaking by the commercial bleach was effective for sterile medium preparation for orchids as agarless medium. The media could be used for sterile cultures in micropropagation processes of orchids. Spraying the surface of a medium and the whole explants with the commercial bleaches after inoculating under non-sterilized conditions was effective for inoculating explants sterilely and for subsequent sterile cultures. These techniques could be applied to the following cultures, PLBs of *Cymbidium* and seed sowing of *Bletilla striata*. The treated level of incorporated (0.01%) and sprayed (0.005%) bleach 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 bleach 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 orchids and other horticultural plants.

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, 2010)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、限られた時間内に培地を準備して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、寒天を用いない培地を短時間で作成して直ちにその培地にランを無菌培養して増殖する方法について検討した結果を報告する。

材料および方法

家庭用漂白剤として、含有する次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素濃度を 5%としている花王製のキッチンハイターを供試した(表 1)。対

照区として、ナカライテスク社製アンチホルミン(次亜塩素酸ナトリウム溶液、有効塩素濃度 8.5%から 13.5%のもの、10%とみなして実験を実施)も用いた。花王製のキッチンハイターは次亜塩素酸ナトリウムの他、界面活性剤と水酸化ナトリウムが含まれている。

培地に加用する濃度として、これまでの実験結果から有効塩素濃度 0.01%とした。したがって、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、2ml 加用することによって、0.01%の濃度を準備した。培地は、ハイポネックス(N:P:K=6.5:6:19) 3g/l、シヨ糖 20g/l、寒天 8g/l を加えた Kano の培地(1965)から寒天を除いた液体培地とし、家庭用漂白剤を所定の濃度になるように加えた後、pH 調整せずに少し加熱して溶解し、ポリエチレン容器(リスパック社製、直径 129mm × 高さ 90cm、フタ付き)に 100ml ずつ分注した。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 以下に低下していることを確認後容器に分注した。

寒天に代わる培地材料として、医療ガーゼ(スズラン社製)、医療脱脂綿(カット綿、スズラン社製)、キッチンタオル(日本製紙クレシア社製)、濾紙(No.2、直径 9cm 東洋濾紙社製)、パーミキュライト(園芸用)を

用い、これらをそれぞれ上記のプラスチック容器に入れた後、家庭用漂白剤を加用して調合された液体培地を分注した。一部の実験では、培地材料をプラスチック容器に入れる前にあらかじめ 0.01%に希釈したアンチホルミン溶液に 5 分間浸漬して、培地材料の滅菌を施した区も設けた。このようにして作成した滅菌培地に、シラン(*Bletilla striata*)の種子または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)を植えつけた。シンビジウム PLB 塊切片を培養する培地にはベンジールアデニン(BA)1mg/l とナフタレン酢酸(NAA)0.1mg/l を添加した。

対照区として、同じ容器に家庭用漂白剤の代わりにアンチホルミンを同じ濃度で加用して同様に作成した培地区も設けた。

植え付けの場所は非無菌のオープン条件下とし、植え付け後には、加用した家庭用漂白剤を用いて、有効塩素濃度 0.005%に希釈した液を準備して、培地と植え付け材料の上、容器のフタの内側にスプレー(キャニオン社製スプレー)で噴霧した。噴霧には、500ml 容量のスプレーを用い、400ml の水に対して、家庭用漂白剤 0.4ml を入れて有効塩素濃度 0.005%になるように調整して準備した。噴霧後、ポリエチレン容器は専用のフタで封をした。

上記の実験では、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実験を行った。

植え付けた培養物は、本学環境教育実践センター内の恒温恒湿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%、蛍光灯照明 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。

家庭用漂白剤を加用したハイポネックス液体培地 100ml を、供試したプラスチック容器に分注すると約 10cm の深さとなり、そこに、ガーゼ、キッチンタオル区では 4 重に折り重ねて、濾紙区では 3 枚重ねに、脱脂綿、パーミキュライト区では培養液でそれぞれの材料の表面が覆われるように分注した結果、いずれの区でも、培地材料は培養液に漬かってしまう結果と

なった。そこに、シランの種子を播種した結果、表 2 に示すように、いずれの区でも発芽して苗が生長することは認められたが、汚染する容器が観察された。

シンビジウムの PLB 塊切片を培養した場合、いずれの区でも PLB にある程度の増殖が認められたが、いずれの区でも PLB 塊切片の大部分が沈む状態となった結果、シュートの形成は認められなかった(表 3)。

次に、供試した培地材料のうち、発芽率が高く、汚染率が低かったガーゼ区を選び、培地材料が液体培地表面に少し露出する量を分注する区と培地材料をプラスチック容器に入れる前に有効塩素濃度 0.01%に希釈したアンチホルミン水溶液に 5 分間浸漬してから液体培地を分注する区を設けて、そこに、シラン(*Bletilla striata*)の種子を播種した結果、表 4 に示すように、培地材料が塩素殺菌剤に完全に浸漬していないと、発芽は認められるが、高率で汚染することが観察された。そして、あらかじめ、ガーゼを浸漬して殺菌する処理が有効であることがわかった(写真 1)。

しかし、供試したプラスチック容器は専用のフタがあって密封できるが、フタと容器の間に微少な隙間があって、寒天培地の場合には汚染はほとんど認められなかったが、寒天を用いない液体培地の場合に、本学の湿度を調節している培養室でさえ、培地の蒸発が認められ、培養後 1 ヶ月後には、30ml の分注量の培地では容器の底にわずかに培地が残っている状態となって、汚染する容器が多数認められた。そこで、上記と同様に 5 分間浸漬したガーゼをプラスチック容器に入れた後に液体培地を分注し、シランの種子を播種してフタをした後に、容器全体を市販のポリエチレン袋(25cm × 35cm)に入れて密封して培養したところ、汚染する容器はまったく認められずに、発芽した苗も正常に生長することを認めた(写真 2, 3)。

無菌的にランを培養して増殖しようとする場合に、培地を作成する作業が必要で、従来、寒天培地が主に使われてきたが、寒天を溶かすために培地を熱し、そして、分注後、滅菌処理をして、寒天が固まるまで待つことが必要である。塩素殺菌剤を加用して培地を作成すると、午前中に作成して容器に分注すれば午後には寒天が固まって種子や苗等を植えつけることができる。今回の報告では、培地材料を塩素殺菌剤を加用した液体培地とともに容器に入れて滅菌培地を作ることができることを示しており、寒天を使用しないので、培地を調合してすぐに分注して滅菌培地をつくることのできるという大きな利点があるが、容器によってはフタと容器の隙間から培地が乾きやすいという欠点があるので、ポリエチレン袋で被うことの大

切さと2ヶ月ごとに植え替えをすることが必要である。短時間で培地を作成して実験ができるという点は、限られた時間に作業をしなければならない学校等で役立つ方法であると考えられる。

クリーンベンチを使用せずに、非無菌の条件下で植え付けを行い、その直後に塩素殺菌剤を噴霧して無菌状態を保つ処理はどこでもできる有効な方法で、今回の培地でも、非無菌条件下での植え付けが可能であり、短時間で、培地作成から植えつけといった一連の操作が簡便にできることが示された。しかし、培地が乾燥してくるとということが問題点としてあげられ、培養容器を前報で用いたポリエチレン袋のように密封できるものを用いて培地を作成する等、今後さらに検討することが必要である。

摘要

ランを無菌培養する寒天培地の代わりに、家庭用漂白剤によって殺菌したガーゼ等の身近なものを用い、そこに、家庭用漂白剤を加用したハイポネックス液体培地を入れて滅菌培地を作成した。その培地にシランの種子やシンビジウムのPLB塊を植えつけて培養した結果、これらの培地で発芽して苗が生長することを認め、培地と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利用し、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、ラン種子等を植えつけた直後に、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。供試しているプラスチック容器はふたと容器の隙間からわずかな空気の移動があるので、これまで、培養後2ヶ月目ごろから、汚染する容器がみられたが、今回、容器をポリエチレン袋の中に入れて輪ゴムで封をして培養すると培養後の培地汚染がほとんどみられなかった。この容器を用いて、寒天を用いない液体培地で、ランの無菌培養、無菌増殖を行う方法は、家庭や学校等において、短時間でたいへん簡便に行える有効な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 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* 764:289-298.

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 2009 記録* pp.47-52.

7) 梁川 正・姫野洋子.2010. 家庭用漂白剤を用いたランの簡便な無菌増殖. *名古屋国際蘭会議 2010 記録* pp.21-25.

8) 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.

9) 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
<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

表2 異なる培地材料に 100ml 分注された液体培地に播種されたシランの発芽、生長

培地材料	培養容器数	汚染容器数	発芽容器数	生長苗観察容器数
ガーゼ区	10	3	10	7
脱脂綿区	10	4	8	5
キッチンタオル区	10	5	10	1
濾紙区	10	1	8	1
パーミキュライト区	10	8	2	2

播種後、40 日目の結果

表3 異なる培地材料に 100ml 分注された液体培地に植えつけられたシンビジウム PLB 塊切片の様相

培地材料	培養容器数	汚染容器数	増殖容器数	生長苗観察容器数
ガーゼ区	10	4	5	0
脱脂綿区	10	4	4	0
キッチンタオル区	10	5	4	0
濾紙区	10	2	3	0
パーミキュライト区	10	7	1	0

培養後、40 日目の結果

表 4 30ml 分注された培地材料の液体培地に播種されたシランの発芽、生長

実験区	培養容器数	汚染容器数	発芽容器数	生長苗観察容器数
無浸漬区	10	8	8	2
5 分間浸漬区	10	0	10	5

播種後、20 日目の結果



写真 1 ガーゼを培地材料として、30ml 分注した液体培地にシランの種子を播種した結果(播種後 30 日目の結果)



写真2 ガーゼを培地材料として、30ml 分注した液体培地にシランの種子を播種してポリエチレン袋で被った培地 (播種後 30 日目の結果)



写真3 ポリエチレン袋の有無とシラン種子の播種結果 (播種後 30 日目の結果)