

植物培養における初期設備投資の大幅削減 ～オートクレーブ、クリーンベンチ、培養棚の省略～

○水田洋一（ヴィトロプランツ）

はじめに ヴィトロプランツは熱湯に溶解するのみで滅菌培地が作成できるインスタント培地や外植体に害が少なく効果的な植物用除菌剤などを開発、販売している。これらを用いた温室内のみでの大規模培養完結事例を報告する。

材料及び方法：ハオルチア趣味家の委託を受け、京都市大原野の農家『ことぶき 花園』の育苗温室にて、全ての操作と培養を行った。育苗温室は5月初旬より50%遮光、最低気温は15℃に保温、24℃以上ではパッドアンドファンにより外気温より数度程度低い状態を保った。原水は水道水を使用した。MS、1/2MS、硝酸アンモニウム無添加MSまたは京都、ゲランガム1.4～3g/Lまたは寒天8～15g/L、ショ糖20～40g/L、その他成分を適宜組み合わせた。目的組成のeViP培地シリーズの粉末をカセットコンロで沸騰させた水道水で溶解後、培地1Lあたり0.1mLのvipSupporterを加え、沸騰状態を保ちつつ40mLづつ培養容器に分注した。培養容器は50穴セルトレイに詰め込んだポリエチレン袋（ヘイコーNo.602、0.06mm厚×80mm巾×120mm長）とし、培地分注後、直ちに45Lポリエチレン袋で包装した後にプラスチックコンテナに入れて使用までハウス中に貯蔵した（1か月以内）。貯蔵コンテナから目的とする組成・数の培養容器を取り出しセルトレイに並べ直して使用した。植物材料は*Haworthia cooper*、*H. correcta*、*H. maughanii*、*H. pixa*、*H. truncata*等の軟質葉系ハオルチアを中心とする*Haworthia*属各種の花茎とした。採取後、sirViP 20g/l、vipSupporter 1mL/Lの液（以後、sirViP液）に90分以上浸漬後、さらにケミクロンG 0.7g、vipSupporter 1mL/Lの液（以後、塩素液）に60分以上浸漬後に、目的部位を切り出し外植体とした。外植体をsirViP液に一瞬再浸漬後に1容器あたり1～4置床した（2015年2月1日～4月3日、のべ21日）。1セルトレイ分（30～50容器）を置床後に塩素液を十分に噴霧し、培養容器を熱シールした。その後、ハウス中のベンチ上に紙コップを支えとして積み重ね、最初の3日間はアルミ蒸着シートにより、その後は銀色寒冷紗により75%遮光して培養した。総置床容器数は2365袋であった。微生物汚染を置床2か月後と5か月後に目視で調査した。汚染発見時に袋を押して中の気体が抜けたものは微生物種類にかかわらず熱シールミスとし、その他を細菌、カビ、緑藻に分類した。

結果：カルス、多芽体、小植物の形成および増殖、そしてハイパーハイドリシティ植物および健全植物の分化が培地組成の差で制御できた。また花茎の齢、部位、採取時期、品種間による差異が大きかった（全データ略。公開予定無し）。置床2か月後までに汚染された容器数は総計64容器（2.7%）であった。内訳は熱シールミスが49袋、カビが8袋、細菌が3袋、藻が4袋であった。以上から、その後、5か月後には残り2301容器のうち総計46容器（1.9%）が汚染された。内訳は熱シールミスが15袋、カビが29袋、細菌はなく、藻は2袋であった。空気が抜けた容器はすべて熱シール部分から抜けたことから、袋の瑕疵はほとんど熱シール時の不良であると結論した。

考察：軟質葉系ハオルチアはハイパーハイドリシティを起こしやすい。が、通気性の良いポリエチレン袋容器と高光量の温室の培養環境では培地組成によってはほぼ確実に健全植物を育成できた。袋を押しても気体は抜けないが初発コロニー部に微細な穴が認められる容器があった。熱シールミスを除いた汚染計46容器のうち微細穴は24容器に認められ、再侵入による汚染であろう5か月後調査の熱シールミス15容器を併せ全てがカビ汚染だった。置床時混入菌が多いであろう2か月後調査ではカビ汚染の割合は53%であったが、再侵入がほとんどを占めるであろう5か月後調査では94%と高かった。汚染原因カビは数コロニーを除き容器外で優占していたカビと同一と思われること、熱や薬剤に非常に弱かったこと（データ略）から、汚染の多くを占めるこのカビ汚染は残存菌ではなく再侵入であろう。また、細菌汚染は5か月後調査では認められなかった。つまり、再侵入はカビが多く、次に藻で、細菌は再侵入しなかったと思われた。これは生育における水分活性要求程度とほぼ一致する。つまり、容器外側で繁殖した微生物が微細な隙間から容器内に侵入したと思われた。

以上から、ポリエチレン袋を培養容器とし、ヴィトロプランツ製品を用いることで植物栽培に適した通常の栽培温室内の作業のみで無菌培養を実用的に行うことが確認できた。その場合、容器の封は隙間を残さないよう注意すべきであると思われた。

ヴィトロプランツ

ViPキット シリーズ： どこでも無菌培養！ のオールインワンキット

(培養棚・インキュベータなどの人工気象装置は含みません)

98℃以上の熱湯が得られるならどこでも滅菌培地が作成でき、外植体を置床できます。沸いた湯があれば、培地作成&分注は1分、冷却固化は1時間、置床1分のスピード！

少量の継代なら隙間時間で可能。培養容器もカミソリもワンセット。

もちろん初代培養も可能です。

学生実習、野外遺伝資源探索、ラン播種など趣味や学習にも便利。

eViP培地や、sirViPシリーズのお試し版としてもどうぞ。

eViP培地 シリーズ： 熱湯を注いでかき混ぜるだけ！

pHまで調整済みの滅菌された固形培地ができます！ 殺菌剤のみのmViPシリーズも販売しております)



粉を容器に入れ



98℃以上の熱湯を注いで溶解し
(うっとうしいダマはできません！)



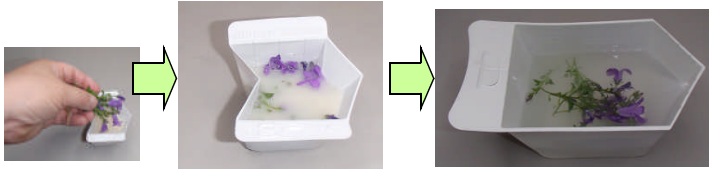
培養容器に分注

冷えて固まれば、置床可能
置床はAMPかクリーンベンチをご使用下さい

sirViP シリーズ： 水道水で溶かして植物を浸けるだけ！

初代の除菌

従来法より植物に低影響&確実に除菌。



植物を大きめに調整し、
sirViP水和液に浸漬

外植体を塩素液に
浸漬

外植体の置床

クリーンベンチなし。ハウスでも台所でも置床可



外植体を置床状態まで
調整し、sirViP水和液に浸漬

外植体を培養容器に投入し、塩素液を噴霧。
その後、結束タイ、熱シールなどで封

温室内での培養事例

植物はハオルチア花茎。当該の同一温室内で全操作。
オートクレーブ、クリーンベンチ、清潔な培養棚の全てが不要

(具体的な培地種類、花茎齢、部位、品種などは守秘事項につき、
お問い合わせ頂いてもお答えできません)



多芽体形成用培地に初代・継代



健全小植物形成用培地に初代・継代



健全植物育成用培地に継代



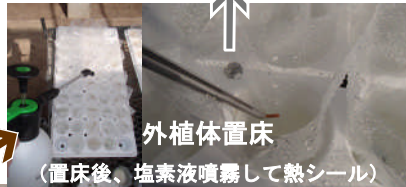
カルス形成用培地に初代・継代



通常温室内の栽培ベンチでの培養風景



小植物再分化



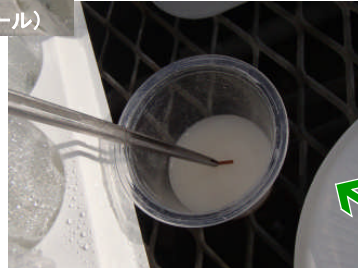
外植体置床

(置床後、塩素液噴霧して熱シール)



(各容器の蓋は開いたまま
すぐ使用可能)

培地貯蔵
(1月以内程度)



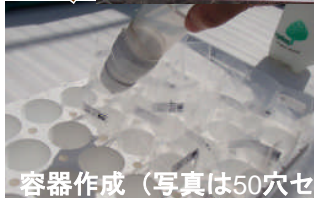
花茎 *vir*ViP



外植体に調整 (継代はここから)



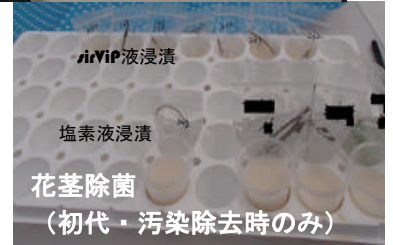
*e*ViP培地作成・分注



容器作成 (写真は50穴セルトレイ+ポリエチレン袋)

培地の流れ

植物の流れ



*vir*ViP液浸漬

塩素液浸漬

花茎除菌
(初代・汚染除去時のみ)