

eViP培地・siViP・mViP hotご使用方法（例）

（植物の培養にオートクレーブもクリーンベンチも、面倒な培地作成やpH調整の手間ももはや不要です）
（www.vitroplantslab.com ヴィトロプランツで検索）。

用意するものの例：（以下、例では培地500mL分（培養容器10～20）、**ヴィトロプランツのvip**キットを使用例の基本として記述し、適宜アレンジしています）
98℃以上の熱湯500mL、常温の水200mL（水道水や蒸留水などの清浄なもの）、植える植物。

- ①培地分注用取手付き漏斗×1、②ポリエチレン袋×1袋（培養容器）、
- ③紙皿×1袋（作業台）、④結束タイ（培養容器のポリエチレン袋結束用）、⑤マドラー×1、
- ⑥計量スプーン（培地分注に望ましい容量。図例は25mL。耐熱80℃以上、金属製不可）×1本、
- ⑦スプーン×1 ⑧プラコップ×1袋（培地分注用、耐熱80℃以上、金属製不可）
- ⑨100mLコスメスプレー（霧が細かいものが望ましい。スプレーガンは望ましくない）×1
- ⑩取っ手と蓋付きPPボトル（培地作成用。耐熱95℃以上、金属製不可。作成培地量の目盛りが必要）、
- ⑪次亜塩素酸カルシウム剤 小袋×1、
- ⑫vip supporter 4mL瓶×1、⑬siViPの小袋と透明小さじを同封した100mLタッパー×1、
- ⑭剃刀の小袋×1（植物調整用）、⑮eViP培地（mViP hotを用いる場合は併せて培地材料やpHメーター）



植物使用例



茎頂培養
→無菌増殖
（カーネーション、キク）



無菌播種
→胚軸切り出し
→カルス
（ダイズ）



切り花の葉片
→無菌鱗片増殖
（ユリ）



無菌播種
（レタス、シュンギク、ニンジン、ダイコン、マリーゴールド、ヒュウガナツ）



立ち木枝→無菌増殖
（ペニカナメ、ヒラドツツジ、ヤクスギ）



鉢花枝→ボトルフラワー
（ロベリア、トコナツ、ペチュニア、アゲラタム）

- ・培養の結果は植物の状態や種類により変わります。必ず器内培養ができることを保証するものではありません。
例：シクラメン（微生物汚染）では器内導入が、セントポーリア・シダ前葉体（薬剤に強い感受性）では継代培養が困難です。
- ・本製品群は植物の器内培養用です。食品・飼料・微生物培地の製造用には使用しないで下さい。
- ・機材はすべて低毒性ですが、お子様やペットが触れないようにお気をつけ下さい。
万が一誤食などの事故が起こった時には、直ちに当該製品すべてを持参して医療機関で診察を受けて下さい。

ヴィトロプランツ

〒607-8442 京都市山科区上野山田4-2

TEL：075-606-1861 Fax：075-501-5174

eViP培地・siViP・mViP hotご使用方法例

最初は本マニュアルの I から順番に番号順に操作することをお勧めします。操作内容把握後は、作成培地量を変更する、培養容器を変更する、培地作成と外植体除菌を別に行うなど適宜アレンジして下さい。

I (塩素液作成)

- ⑪次亜塩素酸カルシウム1粒と
 - ⑫vipSupporterを1~2滴
 - ⑨のコスメスプレーに入れ、水道水で満たす。
- この操作は外植体置床（植物を培養容器に入れること）の30分以上前に行い、作成後3日以内に使用すること。
裏面記載の培地作成直前・直後に行うとよい。



30分程度以降、後の工程での使用前に粒の崩壊を確認した後、攪拌。

(コスメスプレーをよく振る)



II (培養容器作成) :

- 10~20個の⑧プラカップの内側に②ポリエチレン袋を装着。

(写真はわかりやすいように紙コップを使用。市販の紙コップでも問題ありません。耐熱80℃以上のものをご使用下さい)



III (培地作成・分注) :

- ⑮eViP培地500mL分と
- ⑫vipSupporter 1滴を
- ⑩のPPボトルに入れる



98℃以上の熱湯を500mLの線まで入れ、

➡ ⑦付属スプーンでよく攪拌し、完全に溶解。

アドバイス

この段階までにシヨ糖や植物生長調節物質を加えて、培地組成のアレンジができます (その場合はヴィノプランツは結果の責を負いません)。

ただし、果物ジュース投入など培地温度の大幅な低下を招いた場合は、電子レンジなどで再加熱し煮沸して下さい。



アドバイス

培養容器は耐熱90℃以上の清浄な容器と置き換えて、通常は問題有りません (その場合はヴィノプランツは結果の責を負いません)。再利用などで重度の微生物汚染が懸念されるときは容器を200~3000mg/L程度の有効塩素を含む水溶液に一度浸漬後、よく水切りしてからご使用下さい。

なおViPキット付属の②ポチエチレン袋は適度な通気性があり植物毒性が問題にならないことを確認しております。植物培養用でない一般プラスチック・ガラス製品では植物ホルモン様物質が含まれる。ガス透過性が高すぎるもしくは低すぎる。紫外線域の透過性が低い、などで植物の生育に適さないものがあります。

eViP培地ではなく、mViP hotを使用して独自組成の培地を作成する場合

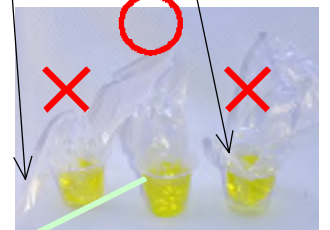


培地を作成し、pH調整し、完全に溶解。その後、培地煮沸し、沸騰させる。鍋などで作成し煮沸しても問題ありません。



培地1Lあたり0.25g (電子天秤がない場合は耳かきorミク로스パーテル一杯)のmViPを加えてよく混合。(多少ダマになります。ダマを完全に溶解して下さい)

仮封時に低い位置で折り曲げると、毛管が繋がって培地が外に流出することがあります。

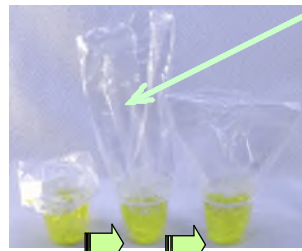


直ちに、IIで作成した培養容器に分注します。培地が冷えてしまった (目安70℃以下) 場合は、分注前に電子レンジなどで再加熱します



(わかりやすいよう、培地を着色。本来はほぼ透明です)

ポリエチレン袋を広げ、上部を伸ばして立て、折り曲げて仮封する。

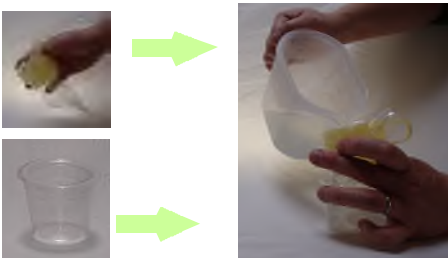


室温で冷却固化



冷えて固まれば、置床できます。目安30分~2時間。置床方法は裏面参照

上記法では培地を分注しにくいときは



①付属漏斗の穴に②ポリエチレン袋を通してかぶせて、袋の底を⑧プラカップに入れて分注

分注培地量を揃えたいときは



⑥計量スプーン (図例ではすじ切り25mL) を用いて分注

各項目での補足事項

I (塩素液作成)

- ・塩素液作成後、使用までの有効期間3日というのは通常のオフィス程度の光量を想定しています。暗黒であれば1週間以上使用可能です。100~50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 程度の窓際やインキュベータ内であれば1日以内に、直射日光が当たる屋外では作成後直ちにご使用下さい。
- ・付属の次亜塩素酸カルシウムで足りなくなった場合は、次亜塩素酸による有効塩素濃度で200~2000mg/Lの水溶液を作成してください。マニュアル通りの作成法であれば300~1000mg/L程度の有効塩素濃度となります。イソシアヌール酸や塩素酸、過塩素酸による有効塩素では結果が異なります。
- ・界面活性剤の添加により効果が上がると思われま。が、界面活性剤の種類や副成分により有効塩素の分解や外植体への影響も起こりますので、**ヴィトロプランツ**は保証いたしません。

II (培養容器作成) :

- ・耐熱性が90℃以上の容器が使用できます。60℃の容器は使用できません。70℃~80℃の容器は各自でテストする必要があります。
- ・軟質ポリエチレン製・軟質塩化ビニル製の透明袋は、いかなるメーカーのどの製品もほぼ使用できます。ガス透過性も適度であり良好な外植体の生育が期待できます。しかし、機械的強度が低いため単独で使用した場合は(例えば⑧コップ(小)に入れない状態)、培養中に高確率で破損します。また、容量が大きいほどピンホールが存在する確率が高くなります。
- ・ポリプロピレン製、ポリスチレン製、ポリカーボネート製、ガラス製などの容器はガス透過性が低いことが多いため、必要に応じて通気フィルムなどをI塩素液に浸漬後ご使用ください。また食品用プラスチック製容器は植物生長調整物質様の影響が認められることがまあり、推奨しません。
- ・微生物汚染容器の再利用や屋外での保管容器など、重度の微生物汚染が予想される容器も使用できます。この場合は、汚れが目視できない程度に洗浄した後、蓋を含めた容器全体を有効塩素100~1000mg/L(付属の次亜塩素酸カルシウム剤であれば水道水1Lあたり2~20粒、アンチホルミンであれば1ml/L程度を溶解)の水溶液に浸漬し、充分水切りしてからご使用ください。容器が濡れた状態で**eViP**培地や**mViP hot**を用いて作成した培地を分注して密閉した場合はクリーンベンチで置床作業ができる程度に容器全体が滅菌されます。

III (培地作成・分注) :

- ・**eViP**培地、**mViP hot**に添加されている殺菌成分は、**ヴィトロプランツ**が把握している限り外植体にほとんど悪影響を及ぼしません。しかし**vipSupporter**の有効成分には感受性である場合があります。オートクレーブ滅菌培地と比較して生育の不良が認められた場合は**vipSupporter**を抜くか濃度を下げてください。

オートクレーブ滅菌培地と比較して生育が良好になる植物、事例は多く認められています。**ヴィトロプランツ**では前記の原因として、①加熱による培地劣化がオートクレーブ滅菌時と比較して少ないこと、②殺菌成分がポリペプチドやステロール類似物質であるため生育促進に働くことがあるためであり、異常では無いと考えています。

- ・培養容器を解放した状態で数日以上、仮封状態で2週間以上の貯蔵が可能です。仮封とは培養容器の開口部をラップで覆ったり、培養袋の口を折り曲げただけなどの状態を指します。長期貯蔵は容器を密封した場合に可能です。**vipSupporter**を添加した場合は例え開放状態でも1か月以上、微生物の増殖はほとんど起きませんが、乾燥・虫害等による変質に注意してください。

- ・ただし、培地分注直後に容器を密封しなかった場合は、クリーンベンチで置床してはいけません。

V (外植体除菌・置床)記載の方法を用いて置床して下さい。これは生きた外植体の置床により培地が微生物が繁殖可能な状態になり、生残した微生物が後に増殖を開始するからです。**V (外植体除菌・置床)**記載の方法には置床時およびそれまでに容器内に再侵入した微生物を殺滅する操作が含まれます。

IV (外植体除菌用*sirViP*液作成)

- ・**sirViP**水和液の有効期間8時間というのは、水の存在下でのキャプタンの半減期が最大8時間であることによっています。つまり**sirViP**粉末は非常に湿度に弱いので、使用しない場合は水に触れさせず、封をきちんとしてください。ちなみに水和液pHが高いほど半減期が短くなります。

eViP培地・siViPご使用方法（例） 最初は本マニュアルのIから順番に操作して下さい。

IV 外植体除菌用siViP液作成）：

入れる植物によっては使わない場合もありますので、作業前にVをお読みください。

⑬の100mLタッパにタッパ内の袋中のsiViPを付属の透明小さじ1杯、⑫vipsupporterを1～2滴、水道水を半ば（約50mL）を入れる。使用するまで蓋をして静置し、使用直前によく攪拌する。

（溶解しません。白濁液。水と混合後、8時間以内に使用すること）



なんで除菌剤が2つ？ siViPは細菌やカビの防御壁である細胞膜を壊す薬や膜の修理を妨害する薬が入っています。その壊れた城壁から入って塩素やvipsupporterの成分が入ります。そして塩素は薬の一部も壊してしまうので一緒にはいれない方がよいのです。

V 外植体除菌・置床）：外植体（容器に入れる部分のみを取り出した植物）を除菌し、容器内に置床します。

とりあえず何でもよいから手近な植物でやってみたいですか？ 最下記の「D:容器外植体」をご覧ください。

キク・ユリ・カーネーション等の生花調製時のあまり部分やユリネ鱗片一枚からの再生や、お気に入りの花の枝（裏の例の花が好適）の一部を切ってきてポトルフラワーに

器内培養をしてみたい対象植物がもう決まっていますか？ 下記の流れ図に従ってください。

アドバイス 対象植物・組織において、外植体除菌方法が確立されているときは、その除菌法を下記の外植体除菌操作部分と置き換えても問題ありません。ラン種子など微小種子も含め種子において確立されている除菌法がある場合は、その方法で除菌することを推奨します。硬実の打破や発芽阻止物質の除去処理などが種子除菌法に含まれていることがあります。

A: 微細種子

ラン種子など

Yes 別紙のラン種子など微小種子播種法を参照（IVのsiViP水和液は使いません）

No

B: 微細組織

茎頂・根端など

Yes 別紙の茎頂・根端など微小組織培養法を参照（IVのsiViP水和液は使いません）

No

C: 無菌植物

（種子を含む）

除菌済みの植物や髄部や形成層、未熟杯、裂果していない果実内部の種子など無菌と見なせる内部組織も含む。

Yes 無菌植物を分割して外植体に調整後、IVのsiViP液に完全に浸漬。浸漬時間は一瞬で充分で、数十分以内が望ましいです。分割・調整には⑭刺刀等や③紙皿を適宜ご使用下さい。

無菌植物は外植体除菌をせずに置床操作のみを行います。



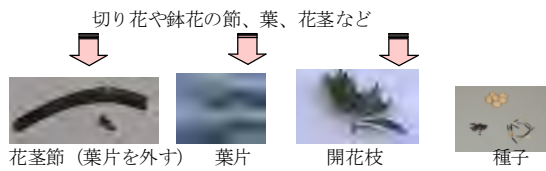
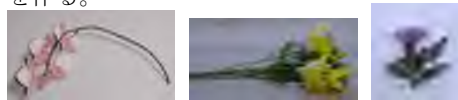
No

D: 容器外植体

（種子を含む）

まず外植体を除菌し、次に置床操作を行います。

Yes 枯死部・病害部・包葉・開花した花などの不要部を取り外し、大きさを調整し、置床する植物（外植体）を作る。



IVのsiViP液に外植体全体を浸漬し、容器の蓋をして数十分間～数時間静置。



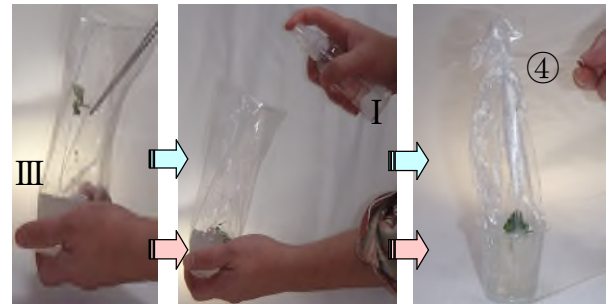
外植体全体が浸漬できない場合は、②のポリエチレン袋にsiViP液と外植体を入れて振ることにより外植体全体を液で濡らします。その後、袋を閉じたまま静置し、時々振ります。



塩素液を置床後にスプレーするのではなく、培養器内面（ポリエチレン袋内）を置床前にI塩素液で濡らしておいても問題ありません。



浸漬した外植体をIII培地表面に置く。（置床操作）その後、Iの塩素液をスプレーし、容器を④結束タイで封ずる。



ピンセットは付属しません。別途ご用意ください。なお素手や箸などでも問題ありません

IVのsiViP液に再度、外植体を完全に浸漬します。浸漬時間は一瞬で充分です。



アドバイス siViP液は作成後8時間以内であれば複数回使用しても問題ありません。

その後外植体のみを取り出し、Iの塩素液と共に②ポリエチレン袋に入れて浸漬し、軽く振ってからさらに10分～1時間程度静置。（ここまで外植体除菌操作）



なお、塩素液は使用後、PPボトルに回収するか、もう一度作成して下さい。

（事前に大量に作成し、使い捨てても問題はありせん）

各項目での補足事項

V 外植体除菌・置床

・**siViP**水和液の対植物毒性は低く、器外・器内植物いずれでも24時間以上の浸漬でも外植体が枯死することは稀です。開放状態24時間の外植体浸漬でも微生物汚染率の上昇は認めておりません。塩素液の対植物毒性は高いですが、容器外植物では1時間以上浸漬しても外植体が枯死することは稀です。下記は**siViP**水和液と塩素液に数分～数時間浸漬した屋外育成ロベリア開花茎を**D:容器外植物**の方法で置床後7日後の例です。浸漬時間の差による見かけ上の生育差はありませんでした。

つまり、**siViP**水和液と塩素液の組み合わせによる外植体除菌は植物に対しきわめてマイルドであり、除菌不良時は浸漬時間を延長することにより対処することをお勧めします。なお、器内植物、微小切片や例外的に薬剤に弱い植物（多くのシダ類やセントポーリア等）はこの限りではありません。



siViP 水和液	1時間	1時間	1時間	1時間	2時間	4時間	4時間
塩素液	10分	30分	1時間	2時間	10分	10分	2時間

浸漬時間（1回目の浸漬）

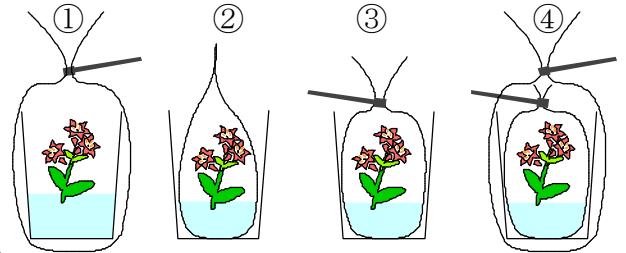
初代培養時、置床前除菌での**siViP**水和液と塩素液への外植体浸漬時間が置床7日後のロベリアに及ぼす影響

・茎頂培養など微細な組織、およびランを含む無菌播種などは確立された除菌方法をご存じの場合はその方法で除菌することをお勧めします。除菌法に硬実打破処理や休眠打破処理などが含まれていることがあります。

・容器を封じ、培養場所に置くときには、

- ① 培地・外植体を入れた容器を袋に入れ結束する
- ② 容器に熱シールした培地・外植体が入った袋を入れる
- ③ 容器に結束した培地・外植体が入った袋を入れる
- ④ 上記③をさらに袋に入れて結束する（2重封）

等が考えられます（③が本マニュアル記載の方法です）。



①～③（1重封）は手軽ですが培養中の微生物の再侵入（ピンホール、シールミス、結束不良）による汚染を無視できません。長期に（2か月以上）培養する場合や微生物汚染が激しい条件で培養する場合は④のように二重に封じてください。従来のマヨネーズ瓶、モルトン栓試験管、アルミフویلで封じた三角フラスコ等でも培養時の再汚染程度は①～③とほぼ同等、もしくはそれ以上です。また培養時の機械的刺激によるピンホール頻度は無視できません。

ビロプランツでの試験例では置床1か月後に微生物汚染されていない20容器づつを選び、2か月間さらに培養した場合、微生物汚染容器数は

風雨が掛かるベランダ : ④0/20 < ②12/20 < ①=③=PPボトル瓶=モルトン栓試験管20/20

屋内の窓際 : ④=③0/20 < PPボトル瓶=モルトン栓試験管2/20 < ①3/20 < ②8/20

湿度80%以上の培養室 : ④=③0/20 < ②2/20 < ①=PPボトル瓶3/20 < モルトン栓試験管7/20

という結果でした。

安定して微生物の再汚染を防ぐには④のように2重に封じる必要があると結論しました。封前に塩素液で濡らすためか②では熱シールミスが多かったです。以上から風雨が直接掛からない限り③（本マニュアル記載方法）の再汚染程度が低いことがわかりました。モルトン栓試験管やPPボトル瓶でもさらに袋に入れた場合は再汚染は生じませんでした。

なお、上記と同じ培養室でも、この実験後、湿度50%以下に下げるとほとんど微生物再汚染を生じなくなりました。その間に清掃などは行っていません。培養室の湿度を必要以上に高めないことは微生物再汚染防止に重要です。



熱シールミス例

窓際で培養約3か月後：微生物汚染はまだ生じていない

eViP培地・iViPご使用方法 (例) 最初は本マニュアルのIから順番に操作して下さい。

ラン種子や茎頂・根端などの微細組織の置床：初代培養 (通常の容器外植物は別紙V 外植体除菌・置床)を参照)

ラン種子など微小種子や茎頂・根端など顕微鏡下でないと操作できないような微細組織はそれぞれ除菌方法が植物種・部位によって異なります。専門書などでお調べの上、下記の操作と合わせて下さい。なおiViP水和液は使用しません。

(図中において顕微鏡・シリンジ・メスなど本キットに含まれない物があります。これらは別途ご用意ください。なお外植体調整用に剃刀は付属しています)。

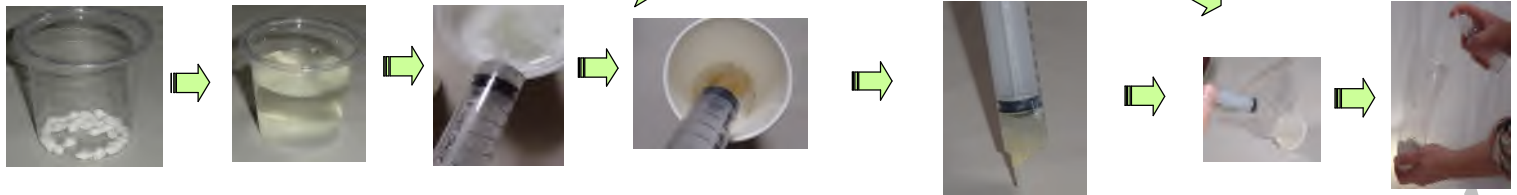
A :ランなど微細種子無菌播種 (例はコショウラン種子)



交配後3か月以上経過した朔から適当な容器 (写真では紙コップ) に種子粉を掻き出して入れる。

なお、写真では朔は開朔しているが、開朔前が望ましい。

培地作成は別紙IIIを参照

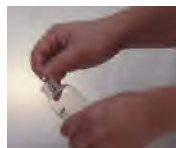


⑧次亜塩素酸カルシウム約30~45粒 (3g)を⑧プラカップ (50mL) に入れ水道水で満たす。静置して粒が全て崩壊したら攪拌し、さらに静置。上に澄んだ黄色液ができたならその部分をシリンジやスポイトで採取する。

種子粉を入れた容器の中で黄色液を出し入れすることで種子とよく混合しなるべく多くの種子をシリンジ中に吸い込んでからシリンジを立てて5分静置。

種子が下部に沈殿するのでその部分を培地表面に1~2滴つつ落とす。その後コスメスプレーでI塩素液を噴霧して容器を封じる。

別紙I (塩素液作成)と同じ

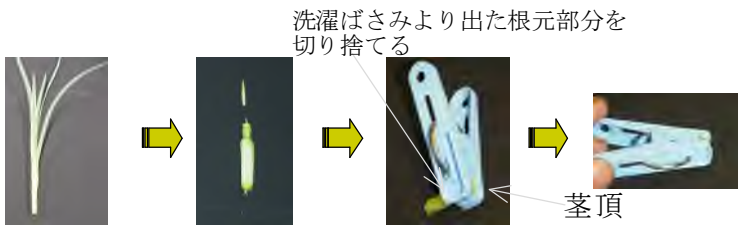


⑪次亜塩素酸カルシウム1粒を⑨のコスメスプレー (100mL) に、入れ水道水で満たす。この操作は外植体置床 (植物を培養容器に入れること) の30分以上前に行い、作成後3日以内に使用してください。



30分程度以降に粒の崩壊を確認した後、攪拌。(コスメスプレーをよく振る)

B :茎頂・根端部などの微細組織 (例はカーネーション茎頂、茎頂摘出・培養共に比較的楽かつ栽培も容易で練習に適します)



洗濯ばさみより出た根元部分を切り捨てる

肉眼と素手で取り除ける葉を全て取り除く

洗濯ばさみに茎頂部につら面を合わせて夾み、下部はつら面に合わせて切り落とす。

洗濯ばさみが強すぎて茎が潰れる場合は、夾み面に茎径程度の縦穴を開けておく

茎頂

実体顕微鏡下で茎頂を摘出し茎頂部を切り取ってメス先上に乗せる。



メス先で培地を切るような感じで培地上に茎頂部を乗せる。(よく見れば肉眼で乗ったことが確認できる)

その後、すぐに容器を封ずる。次亜塩素酸カルシウム液の噴霧はしない

培地作成は別紙IIIを参照



⑪次亜塩素酸カルシウム約1粒 (0.06~0.1g)を⑩PPボトルに入れ水道水を1Lまで入れる。静置して粒が全て崩壊したらよく攪拌し、さらに倍に薄める。

培地容器に次亜塩素酸カルシウム液を入れ、液を捨てる。(容器内全てを濡らす) この時、培地面を指で押さえるなどしてなるべく余剰液を残さないようにする。

オートクレーブレス、クリーンベンチレス事例集 (本キットでできるとは限りません)



ボトルフラワー？

(ロベリア、トコナツ、ペチュニア、ナデシコ)
培地 : eVIP 培地1/2 M S ゲランガム1.4 シヨ糖4.0
置床方法 : D : 容器外植物
植物 : 市販園芸用ポット苗枝 (培養約1か月)



ボトルフラワー事例

左・中 : ポリエチレンシートの通気により継続的に開花
右 : スチロール容器とコーキングによる封。花芽枯死。通気不良によると思われる)
(ロベリア、ペチュニア、ナデシコ、ニチニチソウ、アゲラタム)
培地 : eVIP 培地1/2 M S ゲランガム1.4 シヨ糖6.0 N A A 0.1 B A 0.1
置床方法 : D : 容器外植物
植物 : 市販園芸用ポット苗枝 (左から培養1か月、2週間、2か月)



立ち木枝→無菌増殖

(ベニカナメ、ヒラドツツジ、ヤクスギ)

培地 : eVIP 培地1/2 M S ゲランガム1.4 シヨ糖2.0 N A A 0.2
置床方法 : D : 容器外植物
植物 : 路地立ち樹新枝 (培養約2か月)



無菌播種

(レタス、シュンギク、ニンジン、ダイコン、マリーゴールド、ヒュウガナツ)

培地 : eVIP 培地1/2 M S ゲランガム1.4 シヨ糖2.0
置床方法 : D : 容器外植物
植物 : 市販園芸用感想種子。ヒュウガナツのみ果実中種子を取り出し、湿潤保存2日後に播種



無菌播種→胚軸切り出し→カルス
(ダイズ)

培地 : 初代はeVIP 培地1/2 M S ゲランガム1.4 シヨ糖2.0
継代はeVIP 培地1/2 M S ゲランガム1.4 シヨ糖2.0 B A 0.2
置床方法 : 初代はD : 容器外植物、継代はC : 無菌植物継代
植物 : 市販食用種子 (培養合計 約1.5か月)



孢子囊培養 : 前葉体
(クジャクシダ)

培地 : eVIP 培地1/2 M S ゲランガム1.4 シヨ糖2.0 MS—硝安を使うと孢子体=シダが出ます)
置床方法 : 初代はD : 容器外植物、継代はクリーンベンチが必要
植物 : 京都大学育成株の未開裂の成熟孢子囊をもつ小葉



茎頂培養→無菌増殖

(カーネーション、キク、ジャガイモ、サトイモ)
培地 : eVIP 培地1/2 M S ゲランガム1.4 シヨ糖2.0
置床方法 : 初代はB : 微細組織、継代はC : 無菌植物継代
植物 : 京都大学育成株の茎頂部 (最終継代後約1~2か月)



切り花の葉片→無菌鱗片増殖
(ユリ)

培地 : eVIP 培地1/2 M S ゲランガム1.4 シヨ糖2.0 B A 0.2
置床方法 : 初代はD : 容器外植物、継代はC : 無菌植物継代
植物 : 市販切り花葉片 (最終継代後約1か月)