

塩素殺菌剤を用いた草花の簡便な無菌的挿し木育苗

嶋谷 円¹⁾・梁川 正¹⁾

Simple Sterile Cutting and Raising Rooted Cuttings on Sterile Media by Direct Application of Chlorine Disinfectants for Ornamental Plants

Madoka SHIMATANI and Tadashi YANAGAWA

抄 録：特別な設備を用いずにできる簡便な無菌培養法（Yanagawa ら, 1995）をハボタン等の草花の挿し木に適用した。塩素殺菌剤を加用して、熱に弱いポリ塩化ビニル容器に分注したパーミキュライト培地およびハイポネックス寒天培地（Kano,1965）に、無菌苗から採取した頂芽を含む挿し穂や節切片を、非無菌条件下で挿して、直後に、殺菌のために0.05%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を培地面と挿し穂とふたに噴霧してふたをして培養することによって無菌的な挿し木を図ったところ、発根して新葉の展開がみられて苗を得て、継代培養をすることができた。この方法では約40日間同一容器での育苗が可能であり、灌水の必要もないことから、定期的に管理が必要な挿し木育苗とは異なる新しい試みであるといえる。

また、非無菌の植物についてもエタノールによる消毒と次亜塩素酸カルシウム水溶液への浸漬によって、挿し穂を殺菌し、挿し木後に塩素殺菌剤を噴霧することによって発根させ、新葉が展開する無菌苗を生産することができた。

これらの方法は特別な機材を用いずに簡便に実施でき、増殖の経過の観察も容易であるので生物の育成環境を調節して検討する方法の一つになり得ると考えられた。

キーワード：無菌的挿し木育苗, 塩素殺菌剤, 草花

緒言

平成20年に学習指導要領の改訂が発表され、よりよい環境を創造するため環境教育の推進の一部として中学校技術科において生物育成が必修化された（文部科学省, 2008）。生物の育成環境と育成技術を新たに学習するための提案として、筆者らは、塩素殺菌剤の加用による培地の簡便な滅菌、室内の非無菌の条件下におけるランの無菌播種や幼苗の移植後の塩素殺菌剤の噴霧による無菌培養法（Yanagawa ら, 1995）を応用して、ラン以外の種々の草花の簡便な無菌的播種育苗について検討し、特別な実験設備を持たない学校等で実施できる可能性を示した（嶋谷・梁川, 2009）。種々の草花の無菌植物は生長に応じて適宜挿し木による継代培養を行い、保存する必要がある。

本稿では、一般に無菌環境を準備する設備として用いられるクリーンベンチを使わず、非無

1) 京都教育大学

菌の条件下での挿し木操作による無菌的培養を試みるとともに、非無菌の植物についてもエタノールによる消毒と次亜塩素酸カルシウム水溶液への浸漬によって、殺菌した挿し穂を、滅菌培地に挿し木後に塩素殺菌剤を噴霧することによって、無菌苗を育成する方法を確立することを目的とした。

材料および方法

寒天を用いたハイポネックス培地の対照区としてパーミキュライト培地による培養を試行した。パーミキュライトは、排水性・保水性・通気性が良く、播種や挿し木に利用されるほか配合土素材としても用いられ、清潔であるので本実験で用いた。梁川ら（2007）が無菌増殖に使用できることを示したポリ塩化ビニル容器（リスパック社製フタ付き、耐熱温度 60℃、底直径 125mm × 高さ 100mm）にパーミキュライトを 300 ml 入れ（密度約 200g / l）、蒸留水 150ml にハイポネックスを 3g / l 溶かした培養液において、20g / l のショ糖の添加の有無と殺菌のための次亜塩素酸ナトリウム溶液（アンチホルミン）（有効塩素濃度 8.5~13.5%）の加用濃度 0.01%、0.005%（供試したアンチホルミンの濃度を 10%とみなして希釈）の区を設けた。供試材料には、無菌的播種によって育苗した無菌苗のハボタン（*Brassica oleracea*, Acephala group）‘大阪丸葉系雪錦’を用いた。閉め切った室内の非無菌の条件下で、約 3 cm の頂芽を採取し、70% エタノールをスプレーで噴霧して消毒したシャーレ上で 2~3 枚の本葉を残して調整して挿し穂を準備した。挿し穂は 1 容器に 3~4 本ずつ挿し、直後に容器内部の培地面と植物体とふたに 0.05% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液（約 5ml）を噴霧してすぐにフタをした。挿し木をした容器は、温度条件 25 ± 1℃、家庭用の白色蛍光灯を用いた光条件 3000 ルックス、16 時間日長に制御した培養室において培養した。

次に、蒸留水にハイポネックス（N:P:K=6.5:6:19）を 3g / l 加えたハイポネックス寒天培地（Kano,1965）にショ糖 20g / l、寒天 8g / l を添加し、Yanagawa ら（1995）の用いた方法に準じて塩素殺菌剤である 0.01%、0.005% 次亜塩素酸ナトリウム溶液を加用して、pH を 5.8 に調整して培地を沸騰させ、培地の温度が 65℃ に低下してから同様の容器に 250ml ずつ分注して直ちにフタをして滅菌培地を作成した。供試材料は、上記の実験で用いたハボタンを用い、頂芽をつけた挿し穂は上記と同様に採取して挿し木を行い、その他、頂芽の先端を切除して、茎の 2~3 節と 2 枚の本葉を残して調整した節切片を挿し穂として用いた。1 容器に 3~4 本挿し木をして、挿し木直後に 0.5%、0.05% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を噴霧してフタをして上記と同様の条件で培養した。

次に、無菌的播種によって得た種々の草花でも同様の培養が可能かどうかを試みるためにショ糖 20g / l、寒天 8g / l を添加し 0.005、0.01% 次亜塩素酸ナトリウム溶液を加用したハイポネックス寒天培地に、無菌的播種によって得た無菌苗オジギソウ（*Mimosa pudica*）、カーネーション（*Dianthus caryophyllus*）‘スカーレットリリポット’、キキョウ（*Platycodon grandiflorus*）‘センチメンタルブルー’、ニチニチソウ（*Catharanthus roseus*）‘トロピカーナローズ’の頂芽を用いた挿し穂と頂芽を除いた節切片を挿し穂として用いて挿し木を行い、直後に殺菌のために 0.5%、0.05% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を噴霧してフタをして上記と同様の条件

で培養した。

さらに、上述のハイポネックス寒天培地を用いて非無菌の植物から無菌の挿し木苗を得ることを試みるため、温室内で栽培しているカーネーション (*Dianthus caryophyllus*) ‘スカーレットトリリポット’、カランコエ (*Kalanchoe blossfeldiana Poelln*) ‘ブロッسفエルディアーナ’、バーベナ (*Verbena tenera*) ‘ロマンズスカーレット’、マーガレット (*Argyranthemum frutescens*) の株から頂芽 5cm の枝を採取して流水で洗浄後、70%エタノールで消毒し、次亜塩素酸カルシウム 10g を 100ml に添加してよく振って得た飽和水溶液を濾過した液に 10 分間浸漬し殺菌後茎の 2～3 節と 2 枚の本葉を残して約 3cm に調整して、再び 5% 次亜塩素酸カルシウム水溶液に 5 分間浸漬した後、容器内の寒天培地に挿し木し、0.05% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を噴霧しフタをして上記と同様の条件で培養した。

培養後の容器を観察してカビ等が発生してくる汚染については、汚染率 (汚染容器数 / 供試容器数 × 100) で示し、汚染しても生存した株を示すために生存率 (生存挿し穂数 / 挿し穂数 × 100) で示した。本葉数は、1 株当たりの平均本葉数、側芽数も平均側芽数で示し、その後正常に生長した苗については、苗獲得率 (苗獲得数 / 挿し穂数 × 100) で示した。

結果と考察

1. バーミキュライト培地に挿し木したハボタンの挿し穂

挿し木後の容器内と植物体を殺菌するために用いた次亜塩素酸ナトリウム水溶液の噴霧による植物体への葉害がみられ、切片に残った葉は脱色してやがて枯れ落ちた。ショ糖を添加した区ではその後新葉による生長がみられ、苗を獲得できたが、無糖区では脱色したまま新葉はみられず、生育しなかった。これは、挿し木操作後に行った次亜塩素酸ナトリウム水溶液の噴霧の影響と考えられた (第 1 表)。一般には、水分のみを含ませたバーミキュライト培地で発根させるが、本実験では無菌的な育苗に着目しているため、次亜塩素酸ナトリウム水溶液を噴霧するためにはショ糖の添加が不可欠であることが示された。

第 1 表 バーミキュライト培地に添加した糖と塩素殺菌剤がハボタンの頂芽をつけた挿し穂の生育に及ぼす影響

| 糖濃度 (g/l) | 次亜塩素酸ナトリウム 培地加用濃度 (%) | 汚染率 (%) | 生存率 (%) | 本葉数 (枚) | 苗獲得率 (%) |
|--------------|--------------------------|------------|------------|------------|-------------|
| 0 | 0.005 | 0 | 10 | 6.0 | 10b |
| 0 | 0.01 | 0 | 0 | 0 | 0b |
| 20 | 0.005 | 0 | 100 | 8.6 | 100a |
| 20 | 0.01 | 33 | 90 | 8.1 | 77a |

各区 3 個のポリ塩化ビニル容器に非無菌条件下で 10 本の挿し木を行い、直後に 0.05% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を噴霧し、35 日目の結果、同一英小文字を付した数値間には Z 検定による有意差なし (5% レベル)

2. 塩素殺菌剤を加用した寒天培地に挿し木したハボタンの挿し穂

挿し木後の次亜塩素酸ナトリウム水溶液の噴霧により、数分で葉が白く脱色する葉害がみられた。しかし、いずれの区でも 1 週間が経過すると発根して、新葉が観察できた。頂芽を用いた挿し穂では、展開葉数は 0.05% の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を噴霧した区の方が 0.5% に比べて多くなった (第 2 表)。頂芽をつけない節切片の挿し穂では、側芽が観察でき、本葉が展開した (第 3 表)。検定結果からは苗獲得率に有意な差は得られなかったが、次亜塩素酸ナトリウムの噴霧については、0.05% の濃度でも殺菌力は認められ、無菌の挿し木苗を得ることができたので、ハボタンには噴霧濃度 0.05% が適当であると判断できた。一方、培地に加用した濃度が高い区で葉が小さく薄い黄緑色になったのがみられたので、播種用培地と同じ濃度の 0.005% 次亜塩素酸ナトリウムを加用するものを基本として用いることとした。

第 2 表 寒天培地に加用して噴霧した塩素殺菌剤がハボタンの頂芽をつけた挿し穂の生育に及ぼす影響

| 次亜塩素酸ナトリウム | | 汚染率 (%) | 生存率 (%) | 苗獲得率 (%) | 本葉数 (枚) |
|------------|----------|------------|------------|-------------|------------|
| 培地加用濃度 (%) | 噴霧濃度 (%) | | | | |
| 0.005 | 0.05 | 0 | 100 | 100 | 10.8 |
| 0.005 | 0.5 | 0 | 100 | 100 | 9.1 |
| 0.01 | 0.05 | 33 | 100 | 100 | 10.2 |
| 0.01 | 0.5 | 0 | 100 | 100 | 8.5 |

各区 3 個のポリ塩化ビニル容器に非無菌条件下で 10 本の挿し木を行い、直後に 0.05% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を噴霧し、35 日目の結果、Z 検定による有意差なし (5% レベル)

第 3 表 寒天培地に加用して噴霧した塩素殺菌剤がハボタンの頂芽を含まない挿し穂の生育に及ぼす影響

| 次亜塩素酸ナトリウム | | 汚染率 (%) | 生存率 (%) | 苗獲得率 (%) | 本葉数 (枚) | 側芽数 (個) |
|------------|----------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 培地加用濃度 (%) | 噴霧濃度 (%) | | | | | |
| 0.005 | 0.05 | 0 | 100 | 100 | 17.2 | 1.6 |
| 0.005 | 0.5 | 0 | 80 | 80 | 12.7 | 1.6 |
| 0.01 | 0.05 | 67 | 80 | 80 | 7.9 | 2.1 |
| 0.01 | 0.5 | 0 | 80 | 80 | 8.5 | 1.8 |

各区 3 個のポリ塩化ビニル容器に非無菌条件下で 10 本の挿し木を行い、直後に次亜塩素酸ナトリウム水溶液を噴霧し、35 日目の結果、Z 検定による有意差なし (5% レベル)

3. 塩素殺菌剤を加用した寒天培地に挿し木した種々の草花の挿し穂

挿し木後に噴霧する次亜塩素酸ナトリウム水溶液の影響は、ハボタンと同様にキキョウ、カーネーションでは脱色し、オジギソウは葉がしおれ、ニチニチソウでは褐色化した。次亜塩素酸ナトリウム水溶液の噴霧濃度が高いほど脱色が葉全体に広がった。噴霧濃度によってオジギソウとキキョウでは生存率への影響がみられ、カーネーション、ニチニチソウでは葉数に差がみられた。しかし、いずれの区でも側芽の生長がみられ、増殖が可能であった (第 4 表) (第 5 表)。

第4表 塩素殺菌剤の噴霧濃度が種々の草花の頂芽を含む挿し穂の生育に及ぼす影響

| 供試植物 | 噴霧濃度 (%) | 汚染率 (%) | 生存率 (%) | 苗獲得率 (%) | 本葉数 (枚) |
|---------|----------|---------|---------|----------|---------|
| オジギソウ | 0.05 | 0 | 100 | 100 | 7.2 |
| | 0.5 | 0 | 67 | 67 | 6.5 |
| カーネーション | 0.05 | 50 | 50 | 33 | 28 |
| | 0.5 | 0 | 100 | 50 | 18 |
| キキョウ | 0.05 | 0 | 100 | 0 | 10.8 |
| | 0.5 | 0 | 67 | 0 | 10.8 |
| ニチニチソウ | 0.05 | 0 | 100 | 50 | 14.3 |
| | 0.5 | 0 | 100 | 83 | 13.2 |

各区2個のポリ塩化ビニル容器に非無菌条件下で計6本の挿し木を行い、直後に次亜塩素酸ナトリウム水溶液を噴霧し、53日目の結果

第5表 寒天培地に加用して噴霧した塩素殺菌剤が種々の草花の頂芽を含まない挿し穂の生育に及ぼす影響

| 供試植物 | 次亜塩素酸ナトリウム | | 汚染率 (%) | 生存率 (%) | 苗獲得率 (%) | 本葉数 (枚) |
|---------|------------|----------|---------|---------|----------|---------|
| | 培地加用濃度 (%) | 噴霧濃度 (%) | | | | |
| オジギソウ | 0.005 | 0.05 | 0 | 90 | 30 | 5.4 |
| | 0.005 | 0.5 | 0 | 80 | 40 | 4.8 |
| | 0.01 | 0.05 | 0 | 100 | 50 | 5.3 |
| | 0.01 | 0.5 | 0 | 70 | 20 | 3.7 |
| カーネーション | 0.005 | 0.05 | 100 | 60 | 90 | 18.3 |
| | 0.005 | 0.5 | 0 | 70 | 50 | 14.6 |
| | 0.01 | 0.05 | 0 | 70 | 90 | 17.6 |
| | 0.01 | 0.5 | 0 | 40 | 50 | 12.0 |
| キキョウ | 0.005 | 0.05 | 0 | 100 | 0 | 10.5 |
| | 0.005 | 0.5 | 0 | 40 | 0 | 14.0 |
| | 0.01 | 0.05 | 0 | 90 | 0 | 12.3 |
| | 0.01 | 0.5 | 0 | 60 | 0 | 6.1 |
| ニチニチソウ | 0.005 | 0.05 | 0 | 90 | 30 | 12.2 |
| | 0.005 | 0.5 | 0 | 40 | 0 | 8.3 |
| | 0.01 | 0.05 | 0 | 80 | 60 | 15.5 |
| | 0.01 | 0.5 | 0 | 20 | 0 | 8.5 |

各区3個のポリ塩化ビニル容器に非無菌条件下で10本の挿し木を行い、直後に次亜塩素酸ナトリウム水溶液を噴霧し、53日目の結果

4. 数種の草花の非無菌株から採取した挿し穂の塩素殺菌剤を加用した寒天培地への挿し木

温室株から採取した頂芽をつけた挿し穂は、次亜塩素酸カルシウム水溶液にその植物体を浸漬して殺菌したので薬害による枯死が懸念されたが、葉のすべてが脱色することはなく、部分的な脱色に留まった。しかし、挿し木後の次亜塩素酸ナトリウム水溶液の噴霧による葉への薬害がみられた。バーベナ、マーガレット、カーネーションでは容易に無菌化ができたが、カラコエでは汚染が妨げなかった（第6表）。原因としては植物体の形状が挙げられる。植物の種類によってはこの方法によって完全に無菌化することが難しい植物のあることがわかった。

本報告の手法は、無菌苗の生産のためだけでなく、特別な設備を持たない学校教育の現場で環境調節による植物への影響を簡便に行うための手法としても用いることができる。また、園芸療法の現場等でも草花の無菌的苗生産を継続して実施することを可能にする。今後は培養条件や培養期間についても検討し、利用の拡大につなげたい。

第6表 非無菌株から採取した頂芽を含む挿し穂の挿し木後の生育に及ぼす次亜塩素酸ナトリウムの影響

| 供試植物 | 供試数 (個) | 容器数 (個) | 汚染率 (%) | 生存率 (%) | 苗獲得率 (%) | 本葉数 (枚) |
|---------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| カーネーション | 12 | 4 | 0 | 100 | 100 | 6.3 |
| カラコエ | 10 | 5 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| バーベナ | 9 | 3 | 22 | 78 | 78 | 1.7 |
| マーガレット | 10 | 5 | 60 | 40 | 40 | 4.0 |

流水で洗浄後 70%エタノールで殺菌し、次亜塩素酸カルシウム水溶液に 10 分間浸漬し殺菌後調整して、再び 5%次亜塩素酸カルシウム水溶液に 5 分間浸漬した後、挿し木をし 0.05% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を噴霧し、14 日目の結果

引用文献

- 文部科学省 . 2008. 中学校学習指導要領解説技術・家庭編 . 教育図書 . 東京 . pp. 3-10.
- Yanagawa, T., M. Nagai, T. Ogino and R. Maeguchi .1995.Application of disinfectants to orchids seeds, plantlet and media as a means to prevent in vitro contamination. *Lindeleyana* 10:33-36.
- 嶋谷円・梁川正 . 2009. 塩素殺菌剤を用いた草花の簡便な無菌的播種育苗 . 日本農業教育学会誌 40(2) : 115-120.
- 梁川正・三木裕子・片平香織 . 2007. 塩素殺菌剤処理による熱に弱いプラスチック容器を用いた花卉種苗の無菌増殖 . 園芸学研究 6 別 2. p. 304.
- Kano, K. 1965. Studies on the media for orchid seed germination. *Mem. Fac. Agric. Kagawa Univ.* 20:1-68.