

次氯酸降解試驗及其在滅菌細本山葡萄莖節培植體之應用

蕭翌柱^{1*} 陸明德² 林宗俊³

摘要

蕭翌柱、陸明德、林宗俊。2024。次氯酸降解試驗及其在滅菌細本山葡萄莖節培植體之應用。台灣農業研究 73(1):25–36。

次氯酸 (HOCl) 具有強氧化力且能破壞微生物細胞膜通透性達到消毒滅菌的成效，本試驗之主要目的，在於檢測不同光照強度或高溫高壓滅菌後對 HOCl 濃度降解的影響；此外，探討含不同濃度 HOCl 溶液外部消毒處理，對於降低細本山葡萄 (*Vitis thunbergii* Sieb. & Zucc.) 莖節培植體汙染率的影響。結果顯示，將含 HOCl 濃度為 $198.3 \pm 3.4 \text{ mg L}^{-1}$ 的溶液盛裝於深褐色血清瓶，並放置在室內、常溫且避免陽光直射的環境，可維持其穩定性達 5 d 以上；另經高溫高壓滅菌後的 HOCl 含量變化不大。使用 0.6% (w/v) 次氯酸鈉 (NaOCl) 溶液進行細本山葡萄莖節外部消毒 20 min 之培植體汙染率為 $82.2 \pm 1.6\%$ (對照組)，顯著高於使用 150 與 200 mg L^{-1} HOCl 溶液消毒的處理組 ($61.1 \pm 5.7\%$ & $57.8 \pm 4.2\%$)，且經 21 d 培養後也未見 HOCl 影響莖節正常生長。因此，培植體在外部消毒處理時，以 HOCl 取代 NaOCl 的構想具可行性。

關鍵詞：高壓滅菌、光照度、微生物汙染、組織培養。

前言

植物組織培養係選用草本或木本植物的根、莖節、幼葉、頂芽、腋芽、種子及體胚等器官、組織或細胞為標的，經過一系列外部消毒程序後，作為營養繁殖或癒合組織培養之起始材料，此類材料統稱為「培植體」(explant)。若將無菌的「培植體」培養於透光容器內，並提供無機營養鹽類、碳水化合物、維生素、胺基酸或其他有機成分與生長調節物質，在控制適當溫度與光線等環境因子下，促進其生長分化與「再生作用」(regeneration)，即可誘導發育成為獨立的小苗株。因此，植物組織培養技術也是一種「體外培養技術」(*in vitro* technology) (Ma & Shii 1992)。自田間或野外採集而來的植物材料，欲成功應用組織培養技術建立無菌培植體之首要步驟，即需依序進行材料的外部清洗、預處理及消毒等程序，避免培植體

接種於含糖培養基後，受到細菌或真菌類微生物的汙染；有些學者甚至建議在完成培植體消毒程序後，另在培養基內添加適量的抑菌劑，如植物防腐混合液 (plant preservative mixture; PPM)，以降低培養後期因微生物導致的高汙染率 (Rihan *et al.* 2012)。

一般用於植物組織培養材料外部消毒的殺菌劑種類頗多，較常見的有次氯酸鈉 (NaOCl)、二氯異氰尿酸鈉 (sodium dichloroisocyanurate; NaDCC)、乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)、次氯酸鈣 ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$)、氯化汞 (HgCl_2)、硝酸銀 (AgNO_3)、過氧化氫 (H_2O_2) 及二氧化氯 (ClO_2) 等 (Morgenthau *et al.* 2012; Mihaljević *et al.* 2013; Silva *et al.* 2015; Boonrattanakij *et al.* 2021)。在前述各種消毒劑中，又以乙醇與 NaOCl 溶液較早被廣泛應用於植物莖節培植體之外部消毒，且對於細菌與真菌類滋生有一定的抑制效

投稿日期：2023 年 10 月 23 日；接受日期：2023 年 12 月 7 日。

* 通訊作者：yjshiau@tari.gov.tw

¹ 農業部農業試驗所遺傳資源及生物技術組副研究員。臺灣 臺中市。

² 農業部農業試驗所作物組副研究員。臺灣 臺中市。

³ 農業部農業試驗所植物病理組副研究員。臺灣 臺中市。

果，但是，NaOCl 濃度過高或接觸時間太久皆可能造成操作人員嚴重皮膚灼傷，且遇鹼性水質容易形成三鹵化合物，對水生生物毒性甚大 (Emmanuel *et al.* 2004; Small *et al.* 2007; Gomes *et al.* 2010; De Santana *et al.* 2011)；HgCl₂ 滅活真菌與抑制微生物滋生的能力，雖優於其他殺菌劑，然後續回收的廢液倘處理不當，極易造成環境汙染與毒害動、植物，其對人體神經、腎臟、呼吸、免疫、皮膚、生殖及發育等方面皆有不良影響 (Hashim *et al.* 2021)。NaDCC 是一種含氯強氧化劑，當預製成白色片劑或溶液時，在室溫下可維持穩定性質 (Shetty & Narasimhan 2021)；使用 NaDCC 仍需注意其用量並避免直接接觸身體皮膚與黏膜等處；不過，進行植物外部消毒與廢液處理時，對於培植體與環境的不良影響相對較小 (Morgenthau *et al.* 2012)，且研究結果顯示，在高濃度 (5,000 mg L⁻¹) 時比市售 NaOCl 殺菌力更佳，若在低濃度 (300 mg L⁻¹) 的情形下，仍能應用於較長時間的幼嫩莖節消毒 (Parkinson *et al.* 1996)。

NaDCC 溶解於水中後，會水解產生次氯酸 (HOCl)，此種 HOCl 即是具備強氧化力且能破壞微生物細胞膜通透性，導致其 DNA、RNA 及 ATP 等遺傳物質洩漏，進而達到滅菌效果的化合物 (Hao *et al.* 2017; Shetty & Narasimhan 2021)，HOCl 也因此可作為研製安全傷口護理敷料的一種添加劑 (Rubinsky *et al.* 2016)。在全世界 COVID-19 疫情流行期間，由添加 HOCl 研製而成的新型噴霧式酸性氧化溶液，也被用來檢測對嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒 (SARS-CoV-2) 的殺病毒效果，以及評估對人體鼻腔與口腔粘膜的耐受性，結果發現此種製劑具有降低上呼吸道病毒載量的潛在治療作用 (Giarratana *et al.* 2021)。美國環境保護協會 (Environmental Protection Association US; EPAUS) 允許 HOCl 應用於研發智慧型預防消毒室 (smart prefabricated sanitising chamber; SPSC)，以防止 SARS-CoV-2 的傳染，試驗顯示採用噴霧方式進行 60 s，有效濃度設定在 20 mg L⁻¹ 且粒徑小於 200 μm 時，可增加與病原體接觸面積並達到充分消毒的目標 (Nguyen *et al.* 2021)。

雖有學者研究指出，以培養皿盛裝 HOCl 溶液並放置在較高溫度 (≥ 25°C) 或日照環境下，易使其發生解離並失去殺菌活性 (Ishihara *et al.* 2017)，不過，該篇報導並未檢測試驗當時之光照強度；另外，未來考量應用植物組織培養技術建立無菌培植體的過程中，可能使用經高溫高壓 (121°C、1.05 kg cm⁻²) 滅菌處理的 HOCl 溶液進行培植體清洗作業。因此，本試驗之主要目的，在於檢測以血清瓶盛裝的 HOCl 溶液，經不同光照強度或高溫高壓滅菌處理後的 HOCl 含量變化；另選取植株根部具有清熱利濕與解毒消腫等功效之保健植物-細本山葡萄 (*Vitis thunbergii* Sieb. & Zucc.) (Chiu & Chang 1995) 莖節作為材料，探討含不同濃度 HOCl 溶液進行外部消毒處理，對於建立無菌培植體與降低微生物汙染的效用，試驗所得結果，能夠提供以 HOCl 取代一般常見 NaOCl 消毒法的可行性評估，從而減少 NaOCl 的使用量並降低其對自然環境造成的不良影響。

材料與方法

供試材料與預處理

材料來源

本試驗使用的細本山葡萄 (品系編號 B-11)，係自 2017 年開始栽種於農業部農業試驗所作物組位於南溫室的種原圃，每一棵植株單獨種植於盛裝泥炭土的 15 吋花盆中，株齡約達 6 年；栽培管理模式為每隔 3 mo 酌量施用複合性化學肥料 1 次，平日採用滴灌管定時給水。本年度在 2 月份進行修剪，至 7 月份時，選取當年生健壯枝條作為供試材料。

不同濃度 HOCl 溶液之製備

本試驗所需之 HOCl 溶液係採用家庭型微酸性次氯酸水生成機 (HOCL 0.2t, 衛康商貿股份有限公司, 臺灣桃園市) 搭配 G-MAT 稀鹽酸電解輔助液製備而成。HOCl 溶液生成量為 0.40–0.42 L min⁻¹；另因製備完成含 HOCl 原液濃度約為 200 mg L⁻¹，故取每包含 0.12 g 粉狀 HOCl 檢測試劑 (SIBATA AQ-102, 柴田科

學株式會社，日本東京都) 溶解於 10 mL HOCl 原液後，使用數位型 HOCl 檢測儀 (SIBATA AQ-202P，柴田科學株式會社，日本東京都) 測定 HOCl 實際濃度，再將原液混合純水稀釋，調配符合各處理組所需之供試濃度。

材料外部清洗與預處理

自種原圃採集到的細本山葡萄枝條，先以乾淨清水充分沖洗去除外部附著的塵土，再將藤蔓狀枝條用整枝剪裁成長度相近的莖段，每一莖段依據節間長度之不同，約含有 5–10 個節位。在室內將這些莖段隨機分成 5 組，將基部分別插入盛裝有純水 (對照組)、50、100、150 及 200 mg L⁻¹ 等不同濃度 HOCl 溶液的深褐色血清瓶中靜置 3 d。由於 HOCl 的莫耳質量為 52.46 g mol⁻¹，若將含有濃度分別為 50、100、150 及 200 mg L⁻¹ 的 HOCl 溶液，換算成可供參照的體積毫莫耳濃度 (millimolar; mM) 時，則依序為 0.95、1.91、2.86 及 3.81 mM。

不同盛裝容器與光照處理對 HOCl 濃度降解的影響

試驗前，先檢測微酸性次氯酸水生成機製備的原液含 HOCl 濃度為 198.3 ± 3.4 mg L⁻¹ (對照組)；另外，設計 5 個不同的處理組進行 HOCl 濃度降解試驗，分別為：(1) 以透明玻璃血清瓶盛裝原液，置入不見光的暗櫃處理 (dark cabinet, transparent glass bottled; DCT)；(2) 以透明血清瓶盛裝再置於室外陽光下照射處理 (outdoor, transparent glass bottled; OT)；(3) 以深褐色血清瓶盛裝再置於室外陽光下照射處理 (outdoor, brown glass bottled; OB)；(4) 以透明玻璃血清瓶盛裝再置於光照度 PPFD 為 4.5–10.8 μmol m⁻² s⁻¹ 的室內處理 (indoor, transparent glass bottled; IT)；以及 (5) 以深褐色玻璃血清瓶盛裝再置於光照度 PPFD 為 4.5–10.8 μmol m⁻² s⁻¹ 的室內處理 (indoor, brown glass bottled; IB)。上述每一種處理包含 3 瓶原液，且在試驗期間，每 1 d 檢測瓶內溶液之 HOCl 濃度 1 次，連續檢測 5 d，藉此瞭解各處理組溶液的 HOCl 濃度降解趨勢。為進一步量測 OT 與 OB 處理組在夏季

7 月置於室外陽光下照射處理時之光照度，故每天設定 3 個量測時間點 (上午 8 點、中午 12 點及下午 4 點)，用數位式照度計 (BENETECH GM1010，標智儀表公司，中國深圳市) 測量當時單位面積 (m²) 的流明度 (Lux)，再依據 Lux 與太陽光譜的光合成光子流量密度 (photosynthetic photon flux density; PPFD) 換算公式：1 Lux = 0.0185 μmol m⁻² s⁻¹ PPFD 進行單位轉換。

殺菌釜高溫高壓滅菌後對 HOCl 濃度降解之影響

使用殺菌釜消毒之前，先檢測供試原液含 HOCl 的平均濃度為 198.3 ± 3.4 mg L⁻¹ (before autoclaved; BA，對照組)；另以透明血清瓶盛裝，再置入殺菌釜中以 121°C、1.05 kg cm⁻² 高溫高壓條件滅菌 15 min (after autoclaved; AA)，待供試溶液冷卻至常溫後，立即檢測其 HOCl 濃度 (AA-day 0)；此後，將溶液置於密閉不透光的殺菌釜中 4 d，在存放期間每隔 1 d 依序檢測 1 次 HOCl 濃度之變化 (AA-day 1、AA-day 2、AA-day 3 及 AA-day 4)。

細本山葡萄枝條插入不同濃度 HOCl 溶液 3 d 後對幼芽與葉片外觀之影響

如先前材料外部清洗與預處理所述之步驟，將種原圃採集到的細本山葡萄枝條，以清水沖洗後，裁切成含有 5–10 個節位的莖段。將這些莖段分成 5 組，再將基部分別插入盛裝有純水 (對照組)、50、100、150 及 200 mg L⁻¹ 等不同濃度 HOCl 溶液的深褐色血清瓶中，靜置於光照度 PPFD 為 4.5–10.8 μmol m⁻² s⁻¹ 的室內 3 d；此後，觀察比較不同濃度的 HOCl 溶液對細本山葡萄幼芽與葉片生育及顏色變化之影響。

不同濃度的 HOCl 溶液消毒處理對細本山葡萄莖節培植體汙染率之影響

取枝條基部插入盛裝有純水 (對照組)、50、100、150 及 200 mg L⁻¹ 等不同濃度 HOCl 溶液 3 d，初步完成第一階段預處理後之細本山葡萄插枝 (每枝含有 5–10 個莖節)，先用整枝剪去除葉片，再將枝條基部各自浸漬於與

原預處理時相同 HOCl 濃度的新製備溶液中，以柔韌拭鏡紙 (ZEISS LENS WIPES, 卡爾蔡司股份有限公司, 臺灣新竹縣) 擦洗著生有緻密絨毛的莖段表面進行第二階段外部消毒；此後，將各組插枝分別截切成 2–3 cm 長度的莖節培植體備用。對照組莖節培植體首先以 75% (v/v) 酒精浸漬震盪 1 min，再用 0.6% (w/v) NaOCl 溶液消毒 20 min 後，在無菌操作臺上以無菌水清洗 3 次，完成第三階段消毒程序；其餘各處理組之第三階段消毒程序，則是在使用 75% (v/v) 酒精浸漬震盪 1 min 後，於無菌操作臺上各自以含有 50、100、150 或 200 mg L⁻¹ 等不同濃度的 HOCl 溶液浸漬消毒 20 min，且消毒完成後不再使用無菌水清洗。

經過第三階段消毒程序後之各處理組莖段，以解剖刀切取長約 1.5–2 cm 的培植體，接種於含 MS (Murashige & Skoog 1962) 基本鹽類、0.2 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BA)、30 g L⁻¹ 蔗糖及 0.8% (w/v) Difco 洋菜粉，pH 值為 5.7 的固體培養基，再置於恆溫 23°C、光照度 PPFD 為 38–40 μmol m⁻² s⁻¹ 及光週期 10 h 的培養室 7 d，調查各處理組受到真菌類或細菌類微生物污染的比率與褐化死亡率。

試驗統計分析

以上試驗除日照強度之檢測與枝條基部插入不同濃度 HOCl 溶液 3 d 後之外表觀察外，其餘每一處理皆重複 3 次，每一重複調查 3 瓶血清瓶盛裝的 HOCl 溶液或接種 30 支試管 (每支試管接種 1 個莖節培植體)，以獲得的數據資料計算其算術平均值與標準差 (standard deviation; SD)；另以 CoStat 6.311 統計軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，在 5% 顯著性水準下以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD test) 檢定各處理間差異的顯著性。

結果

不同盛裝容器與光照處理對 HOCl 濃度降解的影響

表 1 結果顯示，試驗採用的 HOCl 水生成機製造的原始溶液，經檢測含 HOCl 平均濃度

為 198.3 ± 3.4 mg L⁻¹ (對照組)，以透明玻璃血清瓶盛裝的 HOCl 溶液，置入不見光的暗櫃處理 (DCT)，經過 1 d 後檢測瓶中溶液含 HOCl 平均濃度為 198.7 ± 1.9 mg L⁻¹，與對照組比較後並無顯著差異；以透明玻璃血清瓶盛裝再置於陽光下照射者 (OT)，經 1 d 後瓶中溶液之 HOCl 平均濃度驟降為 8.0 ± 1.4 mg L⁻¹，顯著低於對照組與其他處理組；若以深褐色血清瓶盛裝再置於陽光下照射者 (OB)，則經過 1 d 後之溶液，其 HOCl 平均濃度降為 177.0 ± 5.4 mg L⁻¹，仍顯著低於對照組；至於，以透明玻璃血清瓶盛裝再置於光照度 PPFD 為 4.5–10.8 μmol m⁻² s⁻¹ 的室內 1 d 之處理者 (IT)，瓶中溶液的 HOCl 平均濃度為 197.7 ± 1.3 mg L⁻¹，同樣環境條件但使用深褐色血清瓶盛裝之處理組 (IB)，其測得之 HOCl 平均濃度為 199.0 ± 1.4 mg L⁻¹，二者皆與對照組無顯著差異。前述各處理組，依序處理 2、3、4 及 5 d 後，所獲得的 HOCl 濃度降解趨勢，與處理 1 d 的結果相似，但 OT 組在第 2 天後已未檢測到 HOCl 含量，儀器顯示之濃度為 0 mg L⁻¹；OB 組在陽光照射第 2、3、4 及 5 天後之濃度顯現逐日降低，分別為 155.7 ± 9.8、127.7 ± 12.3、106.0 ± 13.4 及 98.7 ± 12.4 mg L⁻¹，皆顯著低於同一天相較之對照組或 DCT (200.0 ± 0.8、195.0 ± 2.9、197.0 ± 1.4 及 197.0 ± 2.8 mg L⁻¹)、IT (201.3 ± 2.4、197.7 ± 0.9、191.0 ± 2.5 及 191.7 ± 2.6 mg L⁻¹) 及 IB (201.7 ± 2.6、199.3 ± 0.9、195.7 ± 0.9 及 194.7 ± 2.9 mg L⁻¹) 等處理組。本試驗進行中，也量測收集 OT 與 OB 處理組血清瓶在夏季 7 月置於陽光下照射處理時之光照度供參考 (附錄)，第 1 天 3 個檢測時間點 (上午 8 點、中午 12 點及下午 4 點) 的光照度 PPFD 分別為 1,295、2,868 及 925 μmol m⁻² s⁻¹；第 2 天分別為 1,321、2,462 及 1,367 μmol m⁻² s⁻¹；第 3 天分別為 1,800、2,544 及 916 μmol m⁻² s⁻¹；第 4 天上午 8 點與中午 12 點檢測光照度 PPFD 分別為 1,804 與 2,424 μmol m⁻² s⁻¹，但下午 4 點遇夏季午後雷陣雨天氣，當時檢測僅有 43 μmol m⁻² s⁻¹；至於，第 5 天中午以後仍受多雲時陰天氣影響。因此，3 個檢測時間點光照度 PPFD 分別為 1,615、356 及 581 μmol m⁻² s⁻¹。

表 1. 盛裝次氯酸 (HOCl) 容器與光照處理對次氯酸濃度變化之影響。

Table 1. Effects of containers containing hypochlorous acid (HOCl) and lighting treatments on changes in HOCl concentration.

| Treatments ^z | Days of lighting treatment and HOCl concentrations (mg L ⁻¹) | | | | |
|-------------------------|--|---------------|----------------|----------------|---------------|
| | Day 1 | Day 2 | Day 3 | Day 4 | Day 5 |
| Control | 198.3 ± 3.4 a ^y | 198.3 ± 3.4 a | 198.3 ± 3.4 a | 198.3 ± 3.4 a | 198.3 ± 3.4 a |
| DCT | 198.7 ± 1.9 a | 200.0 ± 0.8 a | 195.0 ± 2.9 a | 197.0 ± 1.4 a | 197.0 ± 2.8 a |
| OT | 8.0 ± 1.4 c | 0.0 c | 0.0 c | 0.0 c | 0.0 c |
| OB | 177.0 ± 5.4 b | 155.7 ± 9.8 b | 127.7 ± 12.3 b | 106.0 ± 13.4 b | 98.7 ± 12.4 b |
| IT | 197.7 ± 1.3 a | 201.3 ± 2.4 a | 197.7 ± 0.9 a | 191.0 ± 2.5 a | 191.7 ± 2.6 a |
| IB | 199.0 ± 1.4 a | 201.7 ± 2.6 a | 199.3 ± 0.9 a | 195.7 ± 0.9 a | 194.7 ± 2.9 a |

^z Control: The original concentration of hypochlorous acid. Indoor illumination: 4.5–10.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD. Outdoor sun illumination: Refer to Appendix for daily detection values. DCT: dark cabinet, transparent glass bottled; OT: outdoor, transparent glass bottled; OB outdoor, brown glass bottled; IT: indoor, transparent glass bottled; IB: indoor, brown glass bottled.

^y Means and standard deviation within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's protected least significance difference (LSD) test ($n = 3$).

殺菌釜高溫高壓滅菌後對 HOCl 濃度之影響

圖 1 結果顯示，將含有平均濃度為 $198.3 \pm 3.4 \text{ mg L}^{-1}$ 的 HOCl 溶液 (BA; 對照組) 以透明玻璃血清瓶盛裝，再置入殺菌釜中以 121°C 、 1.05 kg cm^{-2} 高溫高壓條件消毒 15 min，待供試溶液冷卻至常溫後，立即檢測其 HOCl 平均含量為 $191.7 \pm 0.9 \text{ mg L}^{-1}$ (AA-day 0)，略低於未經高溫高壓滅菌前之對照組，二者比較後並無顯著差異；若是高溫高壓滅菌且冷卻至常溫後，再靜置於密閉不透光的殺菌釜中 1 d (AA-day 1)，檢測血清瓶內供試溶液的 HOCl 平均含量為 $192.3 \pm 1.7 \text{ mg L}^{-1}$ ，與對照組比較後仍無顯著差異；如繼續在殺菌釜中存放第 2 天 (AA-day 2) 與第 3 天 (AA-day 3)，檢測供試溶液 HOCl 平均含量分別為 188.3 ± 3.9 與 $184.7 \pm 4.5 \text{ mg L}^{-1}$ ，二者與對照組 ($198.3 \pm 3.4 \text{ mg L}^{-1}$) 比較已有顯著降低；至於，供試溶液在殺菌釜中存放第 5 天 (AA-day 5)，其 HOCl 平均含量與先前檢測的數據相較，也顯著降低至 $177.7 \pm 2.9 \text{ mg L}^{-1}$ 。

細本山葡萄枝條插入不同濃度 HOCl 溶液 3 d 後對幼芽與葉片外觀之影響

自細本山葡萄種原圃修剪採集的藤蔓狀枝條，截切成每段包含 5 個莖節的插枝，再分別將基部插入盛裝有純水 (對照組)、50、100、

150 及 200 mg L^{-1} HOCl 溶液的深褐色血清瓶中 3 d，觀察結果顯示，3 d 後各處理組的插枝皆能維持一定的含水量且呈現正常生育狀態，未見枝葉萎凋或褐化死亡；即使基部浸漬於含 200 mg L^{-1} HOCl 溶液之枝條幼芽與葉片，不論在葉色或外部性狀與其他處理組相互觀察比較，也無明顯之差異。

不同濃度的 HOCl 溶液消毒處理對細本山葡萄莖節培植體汙染率之影響

經過 3 階段消毒程序之細本山葡萄各處理組莖節培植體，接種於培養基中培養 7 d 後，結果顯示，一般常用的 0.6% (w/v) NaOCl 消毒方法 (對照組)，平均有 $82.2 \pm 1.6\%$ 受到微生物的汙染 (表 2)；全程使用含 50 mg L^{-1} HOCl 溶液消毒的處理組，平均仍有 $74.4 \pm 4.2\%$ 高汙染率，其與對照組比較並無顯著差異；全程使用含 100 mg L^{-1} HOCl 溶液消毒的處理組，汙染率略降至 $66.7 \pm 5.4\%$ ，其與使用 50 mg L^{-1} HOCl 溶液消毒的處理組比較雖無顯著差異，但已顯著低於對照組 ($82.2 \pm 1.6\%$)；若使用含 150 或 200 mg L^{-1} HOCl 溶液進行全程消毒之處理組，在莖節培植體接種 7 d 後之汙染率分別降低為 $61.1 \pm 5.7\%$ 與 $57.8 \pm 4.2\%$ ，皆顯著低於對照組或使用 50 mg L^{-1} HOCl 溶液消毒之處理組。調查對照組與使用不同濃度的 HOCl 溶液進行消毒後，造成莖節培植體褐化死亡的比率，則結果顯示，使用含

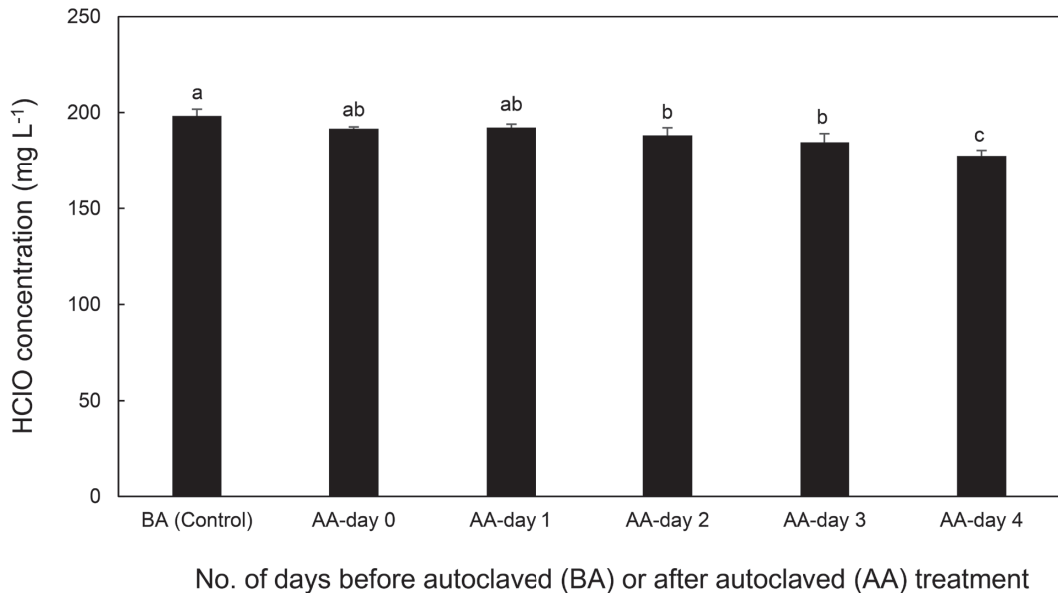


圖 1. 次氯酸 (HOCl) 溶液在殺菌釜高壓滅菌前 (BA) 或高壓滅菌後 (AA) 逐日之濃度變化。

Fig. 1. Daily concentration changes of hypochlorous acid (HOCl) solution before autoclaved (BA) or after autoclaved (AA). Vertical bars indicate standard deviation ($n = 3$). Mean values with the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's protected least significance difference (LSD) test ($n = 3$).

表 2. 含不同濃度的次氯酸 (HOCl) 溶液滅菌處理對細本山葡萄莖節培植體汙染率之影響。

Table 2. Effects of different concentrations of hypochlorous acid (HOCl) solution disinfection treatments on the contamination rates of *Vitis thunbergii* Sieb. & Zucc. stem node explants.

| HOCl concentration (mg L ⁻¹) | Stem explants after cultured for 7 d | |
|--|--------------------------------------|-------------------|
| | Contamination rate (%) | Browning rate (%) |
| 0 (control) ^z | 82.2 ± 1.6 a ^y | 2.2 ± 1.6 a |
| 50 | 74.4 ± 4.2 ab | 1.1 ± 1.6 a |
| 100 | 66.7 ± 5.4 bc | 0.0 a |
| 150 | 61.1 ± 5.7 c | 1.1 ± 1.6 a |
| 200 | 57.8 ± 4.2 c | 2.2 ± 1.6 a |

^z The stem node explants were surface-disinfected in 75% (v/v) ethanol solution for 60 s, followed by 0.6% (w/v) sodium hypochlorite solution with 2 drops of Tween 20[®] per 100 mL under ultrasonic vibration for 20 min and rinsed 3 times with sterile distilled water.

^y Means and standard deviation within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's protected least significance difference (LSD) test ($n = 3$).

50、100、150 及 200 mg L⁻¹ 等不同濃度 HOCl 溶液之處理組，莖節培植體平均褐化死亡率均介於 0–2.2%，與使用 0.6% (w/v) NaOCl 消毒的對照組 (2.2%) 比較後，彼此間均無顯著差異。

討論

HOCl 的合成或製備有許多種方法，例如，

可由 NaDCC 水溶液在水解過程中產生，也能在人類或其他哺乳類動物的血液嗜中性白血球中，自行藉由含血紅素酵素 (heme enzyme) 的髓過氧化物酶 (myeloperoxidase; MPO) 作用，將體內氯化物 (Cl⁻) 與過氧化氫 (H₂O₂) 進行轉化與合成，再進一步與牛磺酸反應生成低毒性的牛磺酸氯胺 (TauCl) 抗發炎物質，用來抵禦與消滅入侵體內的病原菌 (Pekoe *et al.* 1982;

Wang *et al.* 2007; Maitra *et al.* 2013)；此外，透過電解 0.85% (w/v) 食鹽 (NaCl) 稀釋液 (Kim *et al.* 2008; Kubota *et al.* 2009)，或是利用非隔膜電解池電解 6% (v/v) 鹽酸 (HCl) 稀釋液，也能生產出濃度約為 40 mg L⁻¹ HOCl 的微酸性電解水 (Jafry *et al.* 2017)。本試驗製備的 HOCl 溶液應用前述類似技術，藉由次氯酸水生成機電解稀釋鹽酸溶液而成，此一設備在控制出水量為 0.4–0.42 L min⁻¹ 條件下，可產製出含 HOCl 濃度約為 200 mg L⁻¹ 的原液。

HOCl 雖是一種可供培植體外部消毒之強氧化劑，卻可能因溶液酸鹼值 (pH) 升高、盛裝容器氣密性不足或長期曝露於日光或紫外光照射環境下，使溶液內多數的 HOCl 降解變成氫離子 (H⁺) 與次氯酸根離子 (OCl⁻)，或產生氧化還原反應生成氯氣進而散失在空氣中，使得 HOCl 濃度降低影響殺菌功效 (Wang *et al.* 2007; Morgenthau *et al.* 2012)；本試驗係採用透明或深褐色玻璃血清瓶盛裝 HOCl 溶液並加蓋密封，因此較無氯氣散失等問題。經檢測得知，以透明血清瓶盛裝的處理組 (OT) 曝曬於夏季自然光照下 8 h 後，溶液中 HOCl 平均濃度即自 198.3 ± 3.4 mg L⁻¹ 驟降為 8.0 ± 1.4 mg L⁻¹，顯著低於原液濃度 (對照組) 與放置於室內或暗櫃中的處理組 (表 1)；若使用深褐色血清瓶盛裝者，則能阻擋大部分的光線照射量，故 HOCl 平均濃度仍有 177.0 ± 5.4 mg L⁻¹，此結果與 Ishihara *et al.* (2017) 的報導相似，顯示高光照強度與紫外線易使 HOCl 產生降解作用；至於，HOCl 溶液經滅菌釜以 121°C、1.05 kg cm⁻² 高溫高壓條件消毒 15 min 後，其 HOCl 平均濃度仍有 191.7 ± 0.9 mg L⁻¹ (AA-day 0)，雖略低於對照組的 198.3 ± 3.4 mg L⁻¹，但二者比較並無顯著差異 (圖 1)，只是隨著靜置天數的增加，瓶內 HOCl 的濃度才逐漸解離，顯示高溫高壓處理雖對 HOCl 降解略有影響，但不及高光照強度的影響大。

為測試含 HOCl 溶液對細本山葡萄枝條正常生育是否產生影響，並作為後續培植體外部消毒與組織培養試驗時之參考，故將採集自露天種原圃的藤蔓狀枝條，截切成每段包含 5 個莖節的插枝，再分別插入盛裝有純水 (對照組)、50、100、150 或 200 mg L⁻¹ HOCl 溶液

的深褐色血清瓶中 3 d，觀察結果得知，即使基部浸漬於最高濃度含 200 mg L⁻¹ HOCl 溶液之枝條葉片與幼嫩新芽並無萎凋或褐化死亡，不論葉色或外部性狀與其他處理組比較也無明顯差異，此與 Parkinson *et al.* (1996) 所述論點相似，即使用 300 mg L⁻¹ 的 NaDCC 進行嫩枝消毒 24–48 h，與使用 HgCl₂ 及 Ca(ClO)₂ 消毒效果相當，且對植物體的毒性不高。已知 NaDCC 莫耳質量為 220 g M⁻¹，溶解於水中會水解產生 2 莫耳質量的 HOCl，因 HOCl 每莫耳質量為 52.46 g M⁻¹，據此換算濃度 300 mg L⁻¹ NaDCC 的溶液中，約含有 143 mg L⁻¹ HOCl。

應用植物組織培養技術建立無菌培植體時，首先面臨的難題，即是如何進行培植體的外部消毒與有效防止真菌或細菌微生物的污染，一般取得較便利且較常被使用的消毒劑為酒精與 NaOCl (Pereira *et al.* 2011)；De Mello *et al.* (2020) 曾報導指出，在猴鉢樹 (*Lecythis pisonis* Cambess) 莖節消毒試驗中，單獨使用 3% 或 5% (w/v) NaOCl 溶液消毒培植體之污染率均高達 93.25%；若使用 3% (w/v) NaOCl 溶液搭配 500 或 1,000 mg L⁻¹ 阿莫西林 (amoxicillin) 抗生素消毒 20 min，則分別能降低培植體污染率至 46.75% 與 33.25%，但培養基中若添加阿莫西林抗生素 21 d 後，會對培植體產生毒化作用導致芽體生長異常。在一項香波樹 (*Stelechocarpus burahol*) 種胚消毒研究中，學者們先自果實中取出種子，再依序採用 2 g L⁻¹ 洗滌劑浸漬 10 min、2 g L⁻¹ 殺菌劑浸漬 60 min 及 2 g L⁻¹ 殺真菌劑浸漬 60 min 等方法進行預滅菌處理，這些種子經無菌水清洗 3 次後，以 70% (v/v) 酒精消毒 3 s，最終切取種胚作為供試材料。此後，種胚分別以不同濃度 NaOCl (5%、10%，w/v)，浸漬消毒 5 min 或 10 min，經接種於培養基 60 d 後，結果以 5% (w/v) NaOCl 溶液消毒 5 min 之處理方法最佳，培植體未發現有污染情形，且存活率為 88.89%，不過，種胚褐化死亡率達 11.11% (Handayani *et al.* 2022)，顯示培植體預滅菌處理有助於降低微生物污染率，但後續使用消毒液所含 NaOCl 濃度仍不宜過高，以免傷害幼嫩的培植體。

本研究將細本山葡萄插枝基部分別插入盛裝有不同濃度 HOCl 溶液的血清瓶 3 d，以期藉由導管組織的輸導作用，讓 HOCl 先去除植物體中的病毒與內生菌；此後，在各處理組插枝剪去葉片後，重新浸漬於與原處理組有相同 HOCl 濃度的新製備溶液，以拭鏡紙擦洗著生細密絨毛的莖段進行預消毒，此種供試材料經 75% (v/v) 酒精浸漬 1 min，再用含 0.6% (w/v) NaOCl 溶液消毒 20 min (對照組)，發現培植體接種 7 d 後受微生物污染比率仍高達 $82.2 \pm 1.6\%$ (表 2)，這些污染微生物菌種經進一步分離與鑑別，則多數屬於真菌類如 *Lasiodiplodia theobromae*，少數為革蘭氏陰性桿菌如 *Methylobacterium radiotolerans* 等 (作者未發表資料)；本試驗雖受限於家庭型次氯酸水生成機僅能製造出最高濃度約含 200 mg L^{-1} HOCl 溶液，但取此原液進行培植體外部消毒，進而省略再以無菌水清洗的繁瑣程序，最終仍可顯著降低微生物污染率至 $57.8 \pm 4.2\%$ ，且未受污染的莖節經培養 21 d 後依然正常發芽生長，未見 HOCl 有毒害培植體的現

象產生 (圖 2)。根據學者們報導指出，微酸性 HOCl 對動、植物的毒性較低。因此，兼具環保與安全的 NaDCC 水解產生之 HOCl 可作為培植體主要的殺菌劑，或將其添加在植物組織培養用的培養基中替代其他抗菌物質 (Shetty & Narasimhan 2021)；另有研究發現，HOCl 對大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 及仙人掌芽孢桿菌 (*Bacillus cereus*) 等細菌類或酵母菌微生物皆有抑菌作用 (Niedz & Bausher 2002; Bonvilain *et al.* 2011; Forghani *et al.* 2015; Quan *et al.* 2017)，此也與本試驗檢視受微生物污染的莖節培植體樣本中，屬於細菌類污染者比例較少，而大多數為真菌類污染的結果相符合 (作者未發表資料)。因此，開發應用物理方法或化學殺菌劑以有效抑制真菌類滋生並降低培植體污染率的技術，仍值得繼續探討與研究。

結論

綜合以上各項試驗結果所得結論，HOCl

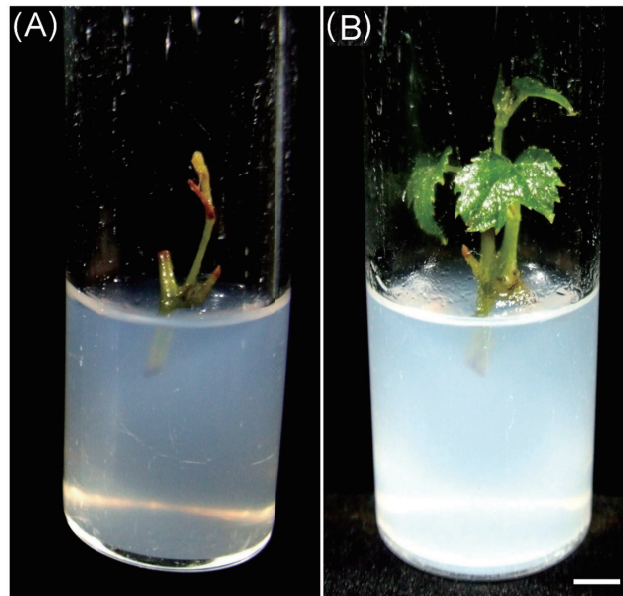


圖 2. (A) 細本山葡萄莖節以 200 mg L^{-1} 次氯酸 (HOCl) 滅菌後，再接種於培養基 7 d 的培植體外觀；(B) 一些莖節培植體在培養 21 d 後，已有新葉與幼芽發育生長。

Fig. 2. (A) The growth appearance of *Vitis thunbergii* Sieb. & Zucc. stem node segment after being disinfected with 200 mg L^{-1} hypochlorous acid (HOCl) and inoculated into the culture medium for 7 d; and (B) after 21 d of cultivation, new leaves and buds have developed from some stem node explant. (Scale bar = 0.5 cm)

溶液盛裝於深褐色血清瓶，並放置在室內、常溫且避免陽光直射的環境，可維持其穩定性達 5 d 以上；應用組織培養技術建立細本山葡萄無菌培植體時，使用 150–200 mg L⁻¹ HOCl 溶液進行外部消毒的莖節培植體污染率，顯著低於使用一般 NaOCl 消毒之對照組，在消毒過程中不但省去無菌水清洗程序，且經長期觀察也未影響培植體正常發育。因此，應用 HOCl 取代 NaOCl 進行滅菌與消毒的可行性甚高，對於呼應永續維護潔淨的自然環境，並逐步減少 NaOCl 使用量的倡議將有正面助益。

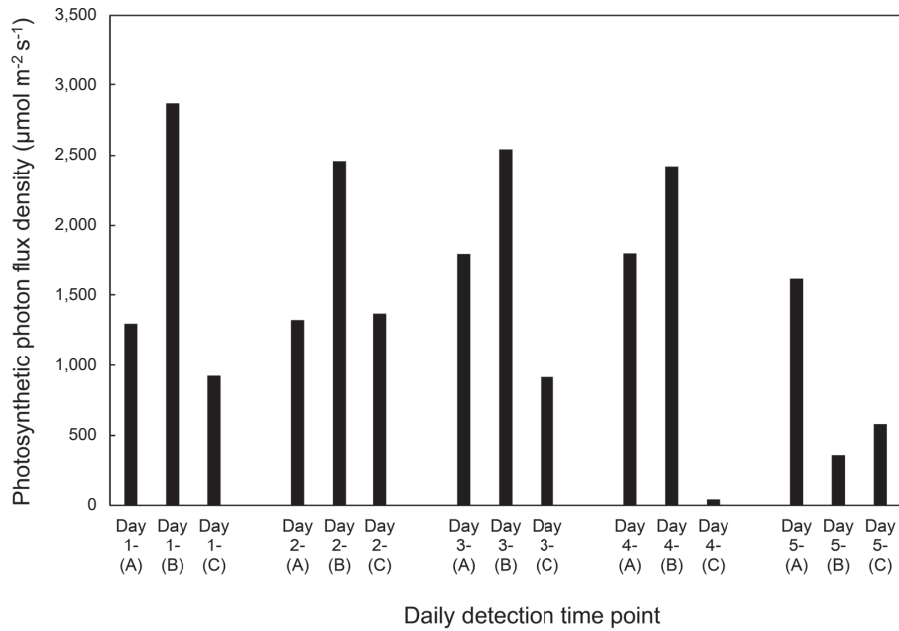
誌謝

本試驗承農業部主管科技計畫經費補助(112 農科-4.6.1-農-C2)；另有部分試驗數據由國立中興大學農藝學系詹佳麗、師欣薇、楊蕾，以及園藝學系古亦翔等 4 位同學，在暑假實習期間協助收集，特此一併申謝。

引用文獻

- Bonvillain, R. W., R. G. Painter, E. M. Ledet, and G. Wang. 2011. Comparisons of resistance of CF and non-CF pathogens to hydrogen peroxide and hypochlorous acid oxidants *in vitro*. BMC Microbiol. 11:112. doi:10.1186/1471-2180-11-112
- Boonrattanakij, N., S. Yomchinda, F. J. Lin, L. M. Belotindos, and M. C. Lu. 2021. Investigation and disinfection of bacteria and fungi in sports fitness center. Environ. Sci. Pollut. Res. 28:52576–52586. doi:10.1007/s11356-021-14323-5
- Chiu, N. Y. and K. H. Chang. 1995. Hsiao-pen shan-p'u-t'ao. p.147–148. *in*: The Illustrated Medicinal Plants of Taiwan. Vol. 4. SMC Publishing Inc. Taipei, Taiwan. 319 pp. (in Chinese)
- De Mello, T., E. de Oliveira Gonçalves, R. S. Alexandre, E. R. Schimdt, and W. C. Otoni. 2020. Establishment and *in vitro* morphogenesis of sapucaia explants (Lecythidaceae). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 56:882–893. doi:10.1007/s11627-020-10091-y
- De Santana, J. R. F., R. Paiva, A. V. de Souza, and L. M. de Oliveira. 2011. Effect of different carbon sources on the *in vitro* multiplication of *Annona* sp. Ciênc. Agrotec. 35:487–493. doi:10.1590/S1413-70542011005000002
- Emmanuel, E., G. Keck, J. M. Blanchard, P. Vermande, and Y. Perrodin. 2004. Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. Environ. Int. 30:891–900. doi:10.1016/j.envint.2004.02.004
- Forghani, F., M. Eskandari, and D. H. Oh. 2015. Application of slightly acidic electrolyzed water and ultrasound for microbial decontamination of kashk. Food Sci. Biotechnol. 24:1011–1016. doi:10.1007/s10068-015-0129-5
- Giarratana, N., B. Rajan, K. Kamala, M. Mendenhall, and G. Reiner. 2021. A sprayable Acid-Oxidizing solution containing hypochlorous acid (AOS2020) efficiently and safely inactivates SARS-Cov-2: A new potential solution for upper respiratory tract hygiene. Eur. Arch. Oto-Rhino-L. 278:3099–3103. doi:10.1007/s00405-021-06644-5
- Gomes, G. A. C., R. Paiva, R. C. Herrera, and P. D. de Oliveira Paiva. 2010. Micropropagation of *Maclura tinctoria* L.: An endangered woody species. Rev. Árvore. 34:25–30. doi:10.1590/S0100-67622010000100003
- Handayani, E., M. B. Irsyadi, R. L. M. N. Alawiyah, and I. Aris. 2022. Effect of explants sterilization and plant growth regulators on embryo culture of kepel (*Stelechocarpus burahol*). 4th ICoSA 2021 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 985:012016. doi:10.1088/1755-1315/985/1/012016
- Hao, J., T. Wu, H. Li, and H. Liu. 2017. Differences of bactericidal efficacy on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis* of slightly and strongly acidic electrolyzed water. Food Bioproc. Tech. 10:155–164. doi:10.1007/s11947-016-1801-3
- Hashim, S. N., S. Z. Ghazali, N. J. Sidik, C. C. Tay, and A. Saleh. 2021. Surface sterilization method for reducing contamination of *Clinacanthus nutans* nodal explants intended for *in-vitro* culture. E3S Web Conf. 306:01004. doi:10.1051/e3sconf/202130601004
- Ishihara, M., K. Murakami, K. Fukuda, S. Nakamura, M. Kuwabara, H. Hattori, ... H. Yokoe. 2017. Stability of weakly acidic hypochlorous acid solution with microbicidal activity. Biocontrol Sci. 22:223–227. doi:10.4265/bio.22.223
- Jafry, A. T., C. Lee, D. Kim, G. Han, W. K. Sung, and J. Lee. 2017. Development of high concentrated slightly acidic hypochlorous acid generator for food safety. J. Mech. Sci. Technol. 31:4541–4547. doi:10.1007/s12206-017-0854-1
- Kim, H. J., J. G. Lee, J. W. Kang, H. J. Cho, H. S. Kim, H. K. Byeon, and J. H. Yoon. 2008. Effects of a low concentration hypochlorous acid nasal irrigation solution on bacteria, fungi, and virus. Laryngoscope 118:1862–1867. doi:10.1097/MLG.0b013e31817f4d34
- Kubota, A., K. Nose, T. Yonekura, T. Kosumi, K. Yam-

- auchi, and H. Oyanagi. 2009. Effect of electrolyzed strong acid water on peritoneal irrigation of experimental perforated peritonitis. *Surg. Today* 39:514–517. doi:10.1007/s00595-008-3914-4
- Ma, S. X. and C. T. Shii. 1992. Overview of the development of plant tissue culture. p.11–14. *in*: Tissue Culture Technology in Horticultural Crops. Harvest farm magazine. Taipei, Taiwan. 120 pp. (in Chinese)
- Maitra, D., F. Shaeib, I. Abdulhamid, R. M. Abdulridha, G. M. Saed, M. P. Diamond, ... H. M. Abu-Soud. 2013. Myeloperoxidase acts as a source of free iron during steady-state catalysis by a feedback inhibitory pathway. *Free Radic. Biol. Med.* 63:90–98. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.009
- Mihaljević, I., K. Dugalić, V. Tomaš, M. Viljevac, A. Pranjčić, Z. Čmelik, ... Z. Jurković. 2013. *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of ‘Oblačinska’ sour cherry. *J. Agric. Sci.* 58:117–126. doi:10.2298/JAS1302117M
- Morgenthau, A., A. M. Nicolae, A. E. Laursen, D. A. Foucher, G. M. Wolfaardt, and M. Hausner. 2012. Assessment of the working range and effect of sodium dichloroisocyanurate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and planktonic cells. *Biofouling* 28:111–120. doi:10.1080/08927014.2011.654335
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nguyen, K., D. Bui, M. Hashemi, D. M. Hocking, P. Mendis, R. A. Strugnell, and S. C. Dharmage. 2021. The potential use of hypochlorous acid and a smart prefabricated sanitising chamber to reduce occupation-related COVID-19 exposure. *Risk Manag. Healthc. Policy* 14:247–252. doi:10.2147/RMHP.S284897
- Niedz, R. P. and M. G. Bausher. 2002. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38:468–471. doi:10.1079/IVP2002316
- Parkinson, M., M. Prendergast, and A. J. Sayegh. 1996. Sterilisation of explants and cultures with sodium dichloroisocyanurate. *Plant Growth Regul.* 20:61–66. doi:10.1007/BF00024060
- Pekoe, G., K. V. Dyke, H. Mengoli, D. Peden, and D. English. 1982. Comparison of the effects of antioxidant non-steroidal anti-inflammatory drugs against myeloperoxidase and hypochlorous acid luminol-enhanced chemiluminescence. *Agents Actions* 12:232–238. doi:10.1007/BF01965152
- Pereira, G. A., L. de Souza Corrêa, and A. C. Boliani. 2011. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira ‘Grande naine’ em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. *Rev. Bras. Frutic.* 33:222–226. doi:10.1590/S0100-29452011000500026
- Quan, Y., H. Y. Kim, and I. S. Shin. 2017. Bactericidal activity of strong acidic hypochlorous water against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in biofilms attached to stainless steel. *Food Sci. Biotechnol.* 26:841–846. doi:10.1007/s10068-017-0086-2
- Rihan, H. Z., M. Al-Issawi, F. Al-swedi, and M. P. Fuller. 2012. The effect of using PPM (plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. *Sci. Hortic.* 141:47–52. doi:10.1016/j.scienta.2012.03.018
- Rubinsky, L., B. Patrick, P. Mikus, and B. Rubinsky. 2016. Germicide wound pad with active, *in situ*, electrolytically produced hypochlorous acid. *Biomed. Microdevices* 18:26. doi:10.1007/s10544-016-0052-4
- Shetty, S. C. and S. Narasimhan. 2021. Sodium dichloroisocyanurate: An eco-friendly chemical alternative for media autoclaving and explant sterilisation in plant tissue culture. *Intl. J. Res. Pharm. Sci.* 12:107–112.
- Silva, L. C., R. Paiva, D. P. Vargas, D. P. Corrêa da Silva, S. Barbosa, and R. C. Herrera. 2015. Decontaminant solution on *in vitro* growth of *Byrsonima intermedia* seedlings. *Cienc. Rural.* 45:674–679. doi:10.1590/0103-8478cr20120078
- Small, D. A., W. Chang, F. Toghrol, and W. E. Bentley. 2007. Toxicogenomic analysis of sodium hypochlorite antimicrobial mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:176–185. doi:10.1007/s00253-006-0644-7
- Wang, L., M. Bassiri, R. Najafi, K. Najafi, J. Yang, B. Khosrovi, ... M. C. Robson. 2007. Hypochlorous acid as a potential wound care agent. Part I. Stabilized hypochlorous acid: A component of the inorganic armamentarium of innate immunity. *J. Burns Wounds* 6:e5.



附錄. 次氯酸 (HOCl) 溶液在室外全日照處理時之每日檢測時間點光合成光子流量密度 (PPFD)。(A) 上午 8 點；(B) 中午 12 點；(C) 下午 4 點。

Appendix. The photosynthetic photon flux density (PPFD) of daily detection time points when the hypochlorous acid (HOCl) solutions were exposed to full sunlight outdoors. (A) 8 am; (B) 12 pm; and (C) 4 pm.

Degradation Test of Hypochlorous Acid and Its Application in the Disinfection of *Vitis thunbergii* Sieb. & Zucc. Stem Node Explants

Yih-Juh Shiau^{1,*}, Ming-Te Lu², and Tsung-Chun Lin³

Abstract

Shiau, Y. J., M. T. Lu, and T. C. Lin. 2024. Degradation test of hypochlorous acid and its application in the disinfection of *Vitis thunbergii* Sieb. & Zucc. stem node explants. *J. Taiwan Agric. Res.* 73(1):25–36.

Hypochlorous acid (HOCl) possesses potent oxidative capabilities and can disrupt the permeability of microbial cell membranes, thereby achieving sterilization. The main purpose of this study was to determine the impact of different light illuminations or high-temperature autoclaved sterilization on the degradation of HOCl. Furthermore, the study explored the effects of external disinfection treatments with different concentrations of HOCl on reducing the contamination rate of *Vitis thunbergii* Sieb. & Zucc stem node explants. The results showed that the stability of the solution containing $198.3 \pm 3.4 \text{ mg L}^{-1}$ of HOCl could be maintained for more than 5 d if it was placed in brown glass bottled indoors at room temperature in the shade. Minimal alteration in the HOCl content was observed after autoclaving. When 0.6% (w/v) sodium hypochlorite (NaOCl) solution was used for external disinfection of *Vitis thunbergii* Sieb. & Zucc stem nodes for 20 min, the explant contamination rate was $82.2 \pm 1.6\%$ (Control), which was significantly higher than the treatments using 150 and 200 mg L^{-1} HOCl solutions ($61.1 \pm 5.7\%$ & $57.8 \pm 4.2\%$). After a 21-day culture period, HOCl demonstrated no adverse effects on the normal growth of stem nodes. Thus, replacing NaOCl with HOCl for external disinfection of explants appears to be a viable alternative.

Key words: Autoclaving, Light illumination, Microbial contamination, Tissue culture.

Received: October 23, 2023; Accepted: December 7, 2023.

* Corresponding author, e-mail: yjshiau@tari.gov.gov.tw

¹ Associate Research Fellow, Crop Genetic Resources and Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

² Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

³ Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.