世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 **A01H 4/00**	**A1**	(11) 国際公開番号	**WO97/14295**
		(43) 国際公開日	1997年4月24日(24.04.97)

(21) 国際出願番号 PCT/JP96/02998

(22) 国際出願日 1996年10月16日(16.10.96)

(30) 優先権データ
特願平7/293329 1995年10月17日(17.10.95) JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
サッポロビール株式会社
(SAPPORO BREWERIES LIMITED)[JP/JP]
〒150 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番1号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
周 天甦(Zhou Tian Su)[CN/JP]
〒370-03 群馬県新田郡新田町木崎37-1
サッポロビール株式会社 アグリ事業部 群馬センター内
Gunma, (JP)
田中道雄(TANAKA, Michio)[JP/JP]
〒761-07 香川県木田郡三木町平木644-2 Kagawa, (JP)

(74) 代理人
弁理士 久保田藤郎，外(KUBOTA, Fujio et al.)
〒103 東京都中央区日本橋三丁目3番12号 E-1ビル Tokyo, (JP)

(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: **PROCESS FOR CLONING PAPHIOPEDILA**

(54)発明の名称 パフィオペディルムのクローン増殖法

(57) Abstract

A process for cloning paphiopedila by splitting surface-sterilized apical buds of the scapes or axillary shoots of a paphiopedilum or sterile shoots thereof obtained by sterile culture into fragments and culturing the same in a medium containing plant hormones. It is possible to form multishoots by splitting sterile shoots containing numerous axillary buds into fragments and culturing the same and also to effectively prevent withering caused by the browning of plant tissues by using a liquid medium containing solid supports such as rock wool or filter paper for the culture. Further it is possible to realize mass production of paphiopedila according to cloning techniques by sterilizing flower buds before flowering or by optimizing the composition of the medium and the conditions of the culture.

（５７）要約

本発明は、パフィオペディルムの株の花茎頂芽もしくは腋生シュートを表面殺菌したもの、あるいは無菌培養で得られた無菌シュートを横断切片に分割し、植物ホルモンを含む培地で培養することを特徴とするパフィオペディルムのクローン増殖法を提供するものである。

多数の腋芽を含んだ無菌的なシュートを横断切片とし、培養することによってマルチシュートの形成が実現される。また、培養に際して、ロックウールや濾紙等の固体支持体を含む液体培地を用いることよって組織の褐変による枯死を有効に防止することができる。

さらに、開花前のつぼみを材料とした殺菌方法や培地組成および培養条件の最適化によって、パフィオペディルムのクローン増殖技術による大量生産の実用化が可能となる。

情報としての用途のみ

ＰＣＴに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にＰＣＴ加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BB	バルバドス	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BE	ベルギー	GH	ガーナ	MD	モルドバ	SL	シエラレオネ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TD	チャード
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IN	インド	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴー	IT	イタリー	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CH	スイス	JP	日本	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	US	米国
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド	VN	ヴィエトナム
CS	チェッコ共和国	KR	大韓民国	PT	ポルトガル	YU	ユーゴスラビア
CZ	チェッコ共和国	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン				
DK	デンマーク	LK	スリランカ				

明 細 書

パフィオペディルムのクローン増殖法

技術分野

本発明は、パフィオペディルムのクローン苗を大量に生産する方法に関する。

背景技術

パフィオペディルムは、ラン科植物の中で最も注目されている園芸植物の一つである。これまで、パフィオペディルムのクローン増殖技術を確立するために、花茎頂芽培養法（河瀬　晃四郎、1988、パフィオペディルムの組織培養による増殖、園芸要旨、昭63春：376-377）、腋生シュート培養法（L.C.Huang, 1988、A Procedure for Asexual for Multiplication of Paphiopedilums in Vitro. American Orchid Society Bulletin, 57: 274-278）、プロトコーム培養法(B.F. Mark, 1991、Tissue Culture Method for The Genus Paphiopedilum. Australian Orchid Review, Feb.: 4-10)、茎頂培養法（安木　三郎ら、１９９５、パフィオペディルムの茎頂培養によるメリクローン苗形成、園学雑64別１：516-517)の研究が行われてきた。

しかし、これらの方法を用いて、パフィオペディルムのクローン増殖を行っても、増殖率が低かったり、増殖できない場合がある。そのため、現在に至るまで、いずれの方法もパフィオペディルムのクローン増殖技術として実用化されていない。

これらの主な原因として、培養時に組織の褐変による枯死と、クローン増殖に相応しい培養材料と培養環境の組み合わせが選ばれていないことが考えられる。

発明の開示

本発明の目的は、パフィオペディルムのクローン苗を実用的に生産できる方法を提供することである。

本発明は第１に、パフィオペディルムの株の花茎頂芽もしくは腋生シュートを表面殺菌したもの、あるいは無菌培養で得られた無菌シュートを横断切片に分割し、植物ホルモンを含む培地で培養することを特徴とするパフィオペディルムのクローン増殖法である。

本発明は第２に、上記の横断切片を培養する培地として、培養物より生成されるポリフェノール等の高分子の増殖阻害物質を拡散もしくは吸着することが可能な固形支持体を含む液体培地を用いることを特徴とするパフィオペディルムのクローン増殖法である。

図面の簡単な説明

図１は、実生苗からの横断切片の調製を示したものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法では、材料として開花株または開花前のつぼみに由来する花茎頂芽や若い腋生シュートなどが用いられる。パフィオペディルム株の花茎頂芽培養は、常温（通常２３～２７℃、好ましくは約２５℃）で連続もしくは１６時間の照明下で行う通常の条件で実施すればよい。この花茎頂芽培養は無菌的に行うことが望ましい。無菌培養でない方法で得られた花茎頂芽もしくは腋生シュートは表面殺菌して用いる。

なお、開花前のつぼみ内の花茎頂芽を材料として選択すると、表面殺菌後の生存率が高いので、好ましい。この場合、パフィオペディルム株からつぼみを採取し、含水エタノール、好ましくは７０％エタノールで数回洗浄した後、５～１０分間、好ましくは約１０分

間含水エタノール、好ましくは７０％エタノール中に浸漬し、次いで界面活性剤、例えば約０．１％のツイーン２０を含んだWilson液のような塩素系殺菌剤中で約１０分間振盪して表面殺菌し、次に滅菌水で数回洗うことによって雑菌等による汚染率を最小限に抑えることができる。

上記の如く、無菌培養でない方法で得られた花茎頂芽もしくは腋生シュートは表面殺菌した後に材料として用い、また無菌培養で得られた無菌シュートはそのまま材料として用いる。これらを培地に置床して培養する。なお、殺菌されたつぼみの内から取り出した花茎頂芽を用いる場合は、その基部より０．５～１．０ｃｍの花茎を残すように調整した方が、褐変による枯死の防止に有効である。

本発明に用いる花茎頂芽や腋生シュートの培養では、培養物より生成されるポリフェノール等の高分子の増殖阻害物質を拡散もしくは吸着することが可能な材料を固形支持体として用いる。固形支持体としては、例えばロックウールや濾紙（ペーパーヴィック）等が好適である。さらに、通常はジェランガム等のゲル化剤も支持体として用いられ、所望により、吸着材料としてポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）等を培地に加えることができ、ＰＶＰの添加は褐変抑制に有効である。

培地は、ＭＳ培地，１／２ＭＳ培地等の植物組織培養用基本培地に、植物ホルモンを加えたものを使用する。植物ホルモンとしては、ナフタレン酢酸などのオーキシン類が好ましく、通常はこれにカイネチンまたはベンジルアデニンのようなサイトカイニン類を組み合わせる。

植物ホルモンを含む培地の具体例について述べると、ナフタレン酢酸（ＮＡＡ）のようなオーキシン類を０．１～１．０ｍｇ／リットル、好ましくは０．５ｍｇ／リットル、ベンジルアデニン（ＢＡ）

のようなサイトカイニン類を０．３～１０ｍｇ／リットル、好ましくは３ｍｇ／リットルおよび蔗糖２０ｇ／リットルを添加し、その他にアデニンを約１０．０ｍｇ／リットル、ココナツウォーターを１０～１５％、ＰＶＰを６００～１，０００ｐｐｍ、好ましくは約８００ｐｐｍ等を添加してもよい。

培地にＮＡＡやＢＡを加えることにより、シュートがより速く成長するようになり、またＰＶＰの添加によって培養時の褐変による枯死が防止できる。

本発明の方法では、横断切片は上記の花茎頂芽や腋生シュート培養から得られた無菌的なシュートから作成できる。例えば、上記の培地で３～５ヶ月間２３～２７℃、好ましくは２５℃で、１０００～４０００ルクス、好ましくは１７００クスの１２～２４時間、好ましくは１６時間照明下の条件で培養して得た３～５葉を有する無菌シュートを用いる。

この無菌シュートを除根してから、基部より厚さ約２ｍｍの輪切り切片を４～６切片に調整し、これを横断切片として切片培養用培地に置床する。

本発明の方法では、切片培養用培地の支持体として通常ジェランガム等のゲル化剤を用いる。さらに、培養物より生成されるポリフェノール等の高分子の増殖阻害物質を拡散もしくは吸着することが可能な材料を固形支持体として用いる。固形支持体としては、例えばロックウールや濾紙（ペーパーヴィック）等があり、さらに所望により培地に吸着材料として前述のＰＶＰ等を加えると、褐変抑制に有効である。なお、ジェランガムの添加量は０．２～０．４％が適当であり、ロックウールなどは液体培地の液面より約１ｃｍ高いものを作成して用いる。

切片培養に使用する培地はＭＳ培地，１／２ＭＳ培地等の植物組

織培養用基本培地に、ナフタレン酢酸（ＮＡＡ）のようなオーキシン類を0.１～３．０ｍｇ／リットル、カイネチンのようなサイトカイニン類を１～１０ｍｇ／リットルおよび蔗糖１５ｇ／リットルを添加したもので、その他にアデニンを約１０．０ｍｇ／リットル、ココナツウォーターを１０～１５％、ＰＶＰを６００～１０００ｐｐｍ、好ましくは約８００ｐｐｍ等を添加してもよい。

培地中の植物ホルモンの濃度が低いと、十分な効果が得られず、高すぎると、逆効果となるので好ましくない。

横断切片を上記の培地に置床し、２３～２７℃、好ましくは２５℃で１０００～４０００ルクス、好ましくは１７００ルクスの１２～２４時間、好ましくは１６時間照明下で培養する。

このような状態で約３ヶ月培養することによって、各切片からマルチシュートが形成される。

形成されたマルチシュートを３～５葉になるまで成長させた後、これより横断切片を作成し、繰返し横断切片の培養を行う。このようにすることにより、パフィオペディルムのクローン苗の大量増殖が可能となる。

次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

実施例１

パフィオ・シャルメイン(Paphiopedilums Sharmain) の開花株の花茎頂芽および開花前株のつぼみを採取し、７０％エタノールで３回表面を洗浄した後、１０分間７０％エタノール中に浸漬した。次に、０．１％のツイーン２０を含んだWilson液中で約１０分間振盪して表面殺菌した後、滅菌水で３回洗った。

このようにして殺菌された開花株の花茎頂芽および開花前株のつぼみの内から花茎頂芽を取り出し、花茎頂芽の基部より０．５ｃｍの花茎を残すように調整した。

次に、ジェランガム０．２％およびロックウール（２．０φ（ｃｍ）×３ｃｍ（長さ）のロックウール支持体）を支持体とした１／２ＭＳ培地にＮＡＡを０．５ｍｇ／リットル、ＢＡを３ｍｇ／リットル、蔗糖２０ｇ／リットルを添加し、その他にアデニンを約１０．０ｍｇ／リットル、ココナツウォーターを１５％、ＰＶＰを約８００ｐｐｍを添加した液体培地８ｍｌを入れた２．５φ（ｃｍ）×１５ｃｍ（深さ）の培養用試験管内に上記の開花株の花茎頂芽および開花前株のつぼみの内から花茎頂芽を置床した。

次いで、２５℃で１７００ルクスの１６時間照明下で培養を行った。３ヶ月後にシュートの形成について調査した結果を第１表に示した。

第１表

ステージ	支持体	供試数	シュート数	褐変死数	汚染数
開花	ジェランガム	２２	３	１６	３
	ロックウール	２２	１４	４	３
開花前	ジェランガム	１９	１１	８	０
	ロックウール	１９	１２	６	１

表から明らかなように、開花前の花茎頂芽はジェランガム，ロックウールのいずれの支持体でも同様のシュート形成数を示したが、開花株の花茎頂芽はロックウールを支持体とした方が褐変が少なく、多数のシュート形成数を示した。

実施例２

無菌シュートの横断切片培養において、無菌培養で育成した交配

株（品種パフィオ・ネッティと品種パフィオ・マウディアエとを交配したもの）の３～５葉を展葉した実生苗（無菌シュートと同等）を材料とし、除根した後、基部より厚さ約２ｍｍの輪切り横断切片を苗当り５切片に調整した（図１参照）。

次に、寒天０．６％、ジェランガム０．２％、濾紙および液体培地を支持体として、１／２ＭＳ培地にＮＡＡを１．０ｍｇ／リットル、カイネチンを３ｍｇ／リットル、蔗糖１５ｇ／リットルを添加し、その他にアデニンを１０．０ｍｇ／リットル、ココナツウォーターを１５％、ＰＶＰを約８００ｐｐｍを添加した培地に上記の横断切片を置床した。

その後、２５℃で１７００ルクスの１６時間照明下で培養を行った。３ヶ月後にシュートの形成について調査した結果を第２表に示した。表中のシュート形成切片数は、培養した切片のうち、シュートを形成した切片の数を、シュート形成総数は、培養した切片から形成されたシュートの数を示す。

なお、濾紙の場合はペーパーヴイック法（２．５φ（ｃｍ）×１５ｃｍ（深さ）の培養用試験管内にＷｈａｔｍａｎ　Ｎｏ．２濾紙で２．０φ（ｃｍ）×３ｃｍ（長さ）の円筒状ペーパーヴイックを形成し、８ｍｌの液体培地を入れる）によって行った。また、液体培地の場合は２ｒｐｍの回転培養を実施した。

第２表

支持体	切片総数	シュート形成切片数	シュート形成総数	シュート数／苗
寒天	５０	4	4	０．４
ジェランガム	５０	3	5	０．５
濾紙	５０	２６	２８	２．８
液体培地	５０	1	1	０．１

産業上の利用可能性

本発明によれば、多数の腋芽を含んだ無菌的なシュートを横断切片とし、培養することによってマルチシュートの形成が実現される。

また、花茎頂芽培養およびシュート横断切片培養において、ロックウールや濾紙を固体支持体として用い、植物ホルモンを含有する液体培地との組合せによって組織の褐変による枯死を有効に防止することができる。

さらに、開花前のつぼみを材料とした殺菌方法や培地組成および培養条件の最適化によって、パフィオペディルムのクローン増殖技術による大量生産の実用化が可能である。

請 求 の 範 囲

（１） パフィオペディルムの株の花茎頂芽もしくは腋生シュートを表面殺菌したもの、あるいは無菌培養で得られた無菌シュートを横断切片に分割し、植物ホルモンを含む培地で培養することを特徴とするパフィオペディルムのクローン増殖法。

（２） 請求項１記載の横断切片を培養する培地として、培養物より生成されるポリフェノール等の高分子の増殖阻害物質を拡散もしくは吸着することが可能な固形支持体を含む液体培地を用いることを特徴とするパフィオペディルムのクローン増殖法。

（３） 請求項１記載の花茎頂芽が開花株および／または開花前株のつぼみに由来するものである請求項１記載の増殖法。

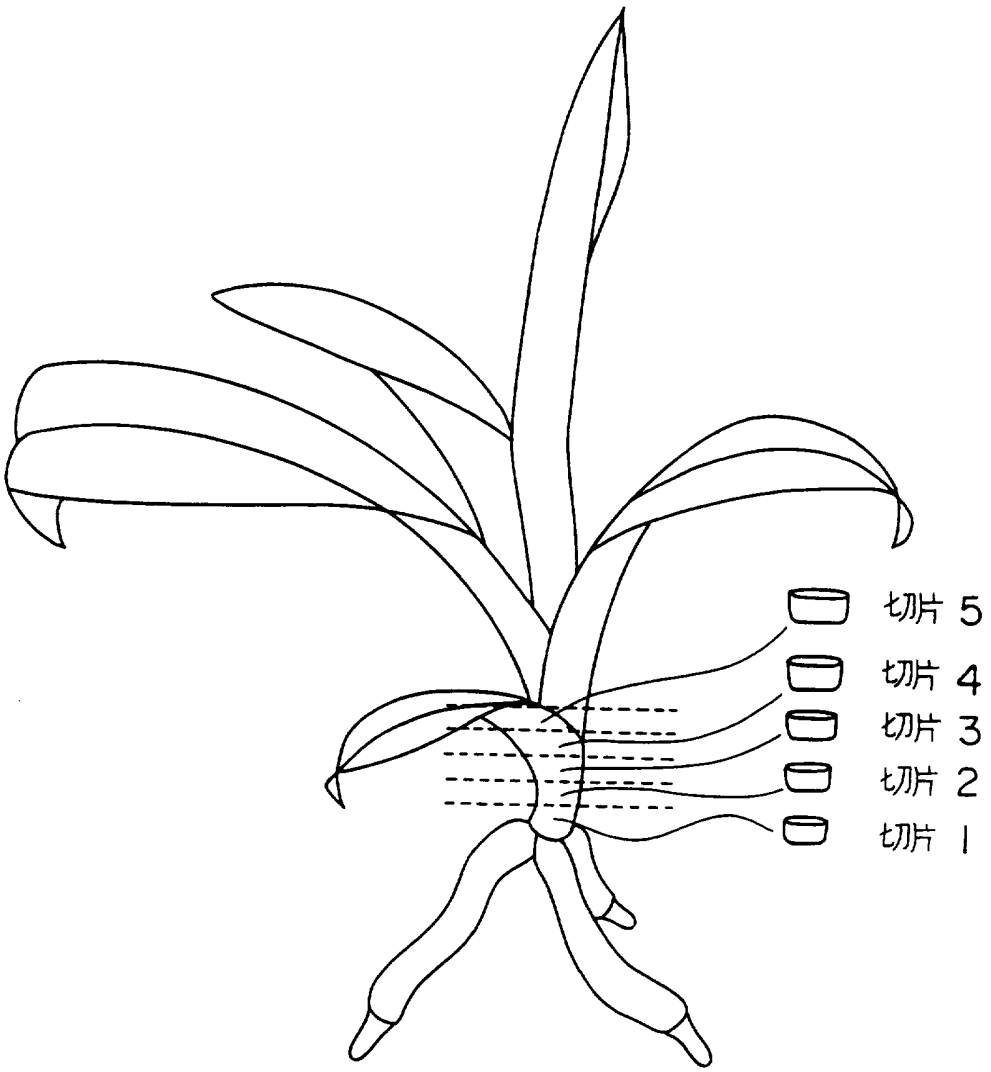
（４） 無菌シュートが３～５葉を展葉した苗である請求項１記載の増殖法。

（５） 培地が植物ホルモンとしてナフタレン酢酸とカイネチンまたはベンジルアデニンを含有するものである請求項１記載の増殖法。

（６） 培地が植物ホルモンと共にポリビニルピロリドンを含むものである請求項１記載の増殖法。

（７） 固形支持体がロックウールおよび濾紙のいずれかである請求項２記載の増殖法。

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP96/02998

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl^6 A01H4/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl^6 A01H4/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922 - 1992
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971 - 1992
Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1992 - 1996

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	B. F. Mark, Australian Orchid Review, February 1991, p. 4-10	1 - 7
A	Lee-Jiuan Tay, Kiyotoshi Takeno and Yutaka Hori, J. Japan. Soc. Hort. Sci. 57(2) 1988, p. 243-249	1 - 7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
December 26, 1996 (26. 12. 96)	January 14, 1997 (14. 01. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号　PCT／JP96／02998

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl[6]　A01H4／00

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl[6]　A01H4／00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
日本国実用新案公報　　1922－1992年
日本国登録実用新案公報　1992－1996年
日本国公開実用新案公報　1971－1992年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
BIOSIS PREVIEWS
JICST科学技術文献ファイル

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	B.F.MARK, Australian orchid review, february 1991, p.4-10	1－7
A	LEE-JIUAN TAY, KIYOTOSHI TAKENO AND YUTAKA HORI, J.Japan. Soc. Hort. Sci.57(2) 1988, p.243-249	1－7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
26．12．96	14.01.97

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）		
日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	郡山　順 電話番号　03－3581－1101　内線　3236	2B	8502

様式PCT／ISA／210（第2ページ）（1992年7月）