

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6601724号
(P6601724)

(45) 発行日 令和1年11月6日(2019.11.6)

(24) 登録日 令和1年10月18日(2019.10.18)

(51) Int. Cl.	F I	
AO 1 N 37/10 (2006.01)	AO 1 N 37/10	
AO 1 N 37/30 (2006.01)	AO 1 N 37/30	
AO 1 N 37/40 (2006.01)	AO 1 N 37/40	
AO 1 N 37/42 (2006.01)	AO 1 N 37/42	
AO 1 N 43/653 (2006.01)	AO 1 N 43/653	
	C	
	請求項の数 4 (全 8 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-196787 (P2015-196787)	(73) 特許権者	504150461 国立大学法人鳥取大学 鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地
(22) 出願日	平成27年10月2日(2015.10.2)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(65) 公開番号	特開2017-66118 (P2017-66118A)	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(43) 公開日	平成29年4月6日(2017.4.6)	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
審査請求日	平成30年5月25日(2018.5.25)	(72) 発明者	上中 弘典 鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地 国立大学法人鳥取大学内
		(72) 発明者	三浦 千裕 鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地 国立大学法人鳥取大学内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ラン科植物の発芽と共生を促進する技術

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ジベレリン阻害剤およびサリチル酸からなる群より選択される物質を含む、ラン科植物の発芽を促進するための剤。

【請求項2】

ジベレリン阻害剤およびサリチル酸からなる群より選択される物質を含む、ラン科植物の共生菌との共生を促進するための剤。

【請求項3】

ジベレリン阻害剤およびサリチル酸からなる群より選択される物質をラン科植物に適用することを特徴とする、ラン科植物の発芽を促進する方法。

【請求項4】

ジベレリン阻害剤およびサリチル酸からなる群より選択される物質をラン科植物に適用することを特徴とする、ラン科植物の共生菌との共生を促進する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ラン科植物の発芽および/または共生菌との共生を促進させるための剤および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ラン科植物は独自の形態や多様性から鑑賞価値の高いものが多く、愛好家も多い。そのため栽培や品種改良が進められている。一方で、野生のラン科植物は植物の中でも最も絶滅に瀕している。その最も大きな要因には、自然環境下では発芽と初期成長における共生菌との共生による養分補給が必須であることが挙げられる。共生菌を必要としない人工培地を用いた無菌発芽系も開発されているが（非特許文献1等参照）、絶滅危惧種の多くには適用できない。絶滅危惧種に指定されている地生ランには潜在的に園芸価値の高いものも多く、その発芽や共生、および成長の促進技術の確立については多くの研究者が取り組んできたが、実際に利用できる技術・知見は全く無いのが現状である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】「ラン科植物の種子形成と無菌培養」鳥潟博高 編、誠文堂新光社、（1976年）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の解決課題は、人工栽培が難しいラン科植物や絶滅危惧種であるラン科植物の人工栽培を容易にすることであった。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、上記課題を解決せんと鋭意研究を重ね、植物ホルモンであるジベレリンの阻害剤、サリチル酸、またはその誘導体での処理により、ラン科植物の発芽および/または共生菌との共生（菌根共生）が劇的に促進されるという、これまでに全く報告されていない知見を得て、本発明を完成するに至った。

【0006】

したがって、本発明は、

（1）ジベレリン阻害剤、サリチル酸、およびサリチル酸誘導体からなる群より選択される物質を含む、ラン科植物の発芽を促進するための剤、

（2）ジベレリン阻害剤、サリチル酸、およびサリチル酸誘導体からなる群より選択される物質を含む、ラン科植物の共生菌との共生を促進するための剤、

（3）ジベレリン阻害剤、サリチル酸、およびサリチル酸誘導体からなる群より選択される物質をラン科植物に適用することを特徴とする、ラン科植物の発芽を促進する方法、ならびに

（4）ジベレリン阻害剤、サリチル酸、およびサリチル酸誘導体からなる群より選択される物質をラン科植物に適用することを特徴とする、ラン科植物の共生菌との共生を促進する方法

を提供するものである。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、人工栽培が難しいラン科植物や絶滅危惧種であるラン科植物の人工栽培を容易かつ効率的に行うことができる。したがって、本発明は、絶滅危惧種に多い難発芽性の野生ランを対象にした発芽と共生、および成長促進による保全だけでなく、潜在的に園芸価値の高いこれらの野生ランの人工栽培技術の確立を可能にするものである。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、本発明で用いた地生ランの無菌発芽系および共生発芽系の模式図である。

【図2】図2は、本発明の無菌発芽系および共生発芽系におけるシランの発芽を経時的に示す写真である。

【図3】図3は、シランの無菌発芽系を用いた植物ホルモンおよび植物ホルモン阻害剤の

10

20

30

40

50

発芽への影響を評価した結果を示すグラフである。

【図4】図4は、シランの共生発芽系を用いた植物ホルモンおよび植物ホルモン阻害剤の発芽への影響を評価した結果を示すグラフである。

【図5】図5は、シランの無菌発芽系において種類の異なるジベレリン阻害剤が発芽に及ぼす影響について調べた結果を示すグラフである。

【図6】図6は、野生の地生ランを用いた植物ホルモンおよび植物ホルモン阻害剤による発芽促進効果の検証結果を示す写真である。

【図7】図7は、共生発芽系におけるペロトンの状態を指標にした共生度の評価手法を説明する図である。

【図8】図8は、共生発芽系においてペロトンの状態を指標にしてシランの共生度を定量した結果を示すグラフである。 10

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明の剤および方法は、いずれのラン科植物に対しても適用可能であるが、人工発芽・栽培が困難なラン科植物、とりわけ地生ランに適用できるという点で画期的である。

【0010】

ラン科植物の種子は未成熟な胚のみであり、自然環境下では発芽と初期成長には共生菌との共生による養分供給が必須である。ラン科植物のほとんどが着生ランであり、人工栽培できるものが多い。着生ランの例としては、コチョウラン、シンビジウム、デンドロビューム、カトレア、オンシジウム、バンダなどが挙げられる。その一方、希少種や絶滅危惧種のほとんどは地生ランであり、これらの園芸価値は潜在的に高い。しかし、多くの地生ランの種子発芽は難しく、共生菌への依存度も高いことから、人工発芽・栽培が難しい。地生ランの例としては、シラン、サギソウ、ツチアケビ、キンラン、ギンラン、ネジバナ、オオミヤマウスラ、キバナノアツモリソウ、エビネ、アマミトンボ、ハマカキラン、ヤツシロランなどが挙げられる。 20

【0011】

本発明の剤および方法に用いる物質は、サリチル酸、サリチル酸誘導体およびジベレリン阻害剤からなる群より選択される1の物質または2以上の物質の組み合わせである。

【0012】

ジベレリン阻害剤は、植物におけるジベレリンの生合成を阻害する物質、および植物においてジベレリンの作用を阻害する物質を包含する。ここで、阻害とは、ジベレリンの生合成やジベレリンの作用を通常よりも低下させること、ならびにジベレリンの生合成やジベレリンの作用をなくすことを包含する。ジベレリンは発芽や生長の促進作用を有する植物ホルモンとして公知である。その阻害剤がラン科植物の発芽および/または共生菌との共生を促進することは、これまで知られておらず、全く意外なことであった。本発明の剤および方法に用いられるジベレリン阻害剤としては、ダミノジド、パクロブトラゾール、プロヘキサジオンカルシウム、メピコートクロリド、トリネキサパックエチル、クロルメコートなどが例示されるが、これらに限らない。また、本発明の剤および方法に用いられるジベレリン阻害剤として市販されているものとしては、ウニコナゾールP、ビーナイン、スマレクト、スミセブンP、バウンティ、ビビフル(フロアブル)、(理研)ピオロック、ボンザイ、セリダード、ロミカ、フラスター、プリモマックス、サイコセルなどが例示されるが、これらに限らない。 30 40

【0013】

サリチル酸はベンゼン環上のオルト位にカルボキシル基とヒドロキシル基を有する物質で、鎮痛・解熱作用などの薬理作用を有する。サリチル酸は自然界に広く存在し、植物においては病害応答反応に関わる植物ホルモンとされている。しかしながら、サリチル酸がラン科植物の発芽および/または共生菌との共生を促進することは知られていなかった。本発明にて用いられるサリチル酸は、遊離形態であってもよく、塩の形態であってもよい。

【0014】

本発明において、サリチル酸の誘導体も本発明の剤および方法に用いることができる。サリチル酸の誘導体がラン科植物の発芽および/または共生菌との共生を促進することは知られていなかった。サリチル酸の誘導体としては、そのカルボキシル基が炭素数1~6個のアルキル基にてエステル化されているもの、あるいはその水酸基が炭素数1~6個のアルキル基にてエーテル化されているものが例示される。あるいはサリチル酸の誘導体としては、そのベンゼン環の水素が水酸基、ハロゲン、炭素数1~6個のアルキル基、NH₂、COOH等で置換されたものが例示される。サリチル酸の誘導体は塩の形態であってもよい。サリチル酸の誘導体は上記のものに限定されないことはいうまでもない。ただし、本発明に用いるサリチル酸の誘導体は、サリチル酸と同様のラン科植物の発芽および/または共生菌との共生を促進するものである。本発明に使用可能なサリチル酸誘導体の具体例としては、プロベナゾール、チアジニル、イソチアニル、アシベンゾラルSメチルなどが例示されるが、これらに限らない。

【0015】

ジベレリン阻害剤は農薬として安価に市販されている。サリチル酸やサリチル酸誘導体も容易に入手することができる。そのため、本発明は、コスト面でも非常に有利である。

【0016】

本発明において、「発芽を促進する」とは、ラン科植物の種子の発芽を早めること、および/または発芽率を向上させることを意味する。該用語は、自然環境および/または人工環境において発芽が困難あるいは発芽が認められなかったラン科植物の種子を発芽させることも意味する。

【0017】

本発明において、「共生菌との共生を促進する」とは、ラン科植物の共生菌との共生の程度を高めることのほか、共生菌と共生しないラン科植物を共生菌と共生させることも意味する。共生菌は、ラン科植物と共生し、ラン科植物に栄養供給するものであればいずれの菌であってもよい。一般に、共生菌はラン科植物体内にペロトンと呼ばれる形態で共生する。これまで様々なラン科植物から様々な共生菌が共生、同定されている。当業者は、本発明を実施するにあたり、ラン科植物の種類に応じて共生菌を選択し、共生菌を土壌や培地に混合することができる。

【0018】

本発明の剤はいずれの形態であってもよく、液状、粉末、顆粒などであってもよい。本発明の剤のラン科植物への適用方法については特に限定されない。適用方法の具体例としては、ラン科植物が自生している土壌、あるいはラン科植物を人工的に栽培（発芽および生長を包含）するための土壌や培地に本発明の剤を混合することが挙げられる。本発明の剤をラン科植物の種子に直接接触させてもよい。

【0019】

以下に実施例を示して本発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、実施例は本発明を限定するものではない。

【実施例1】

【0020】

実施例1. 植物ホルモンおよびその阻害剤がラン科植物の種子の発芽に及ぼす影響
ラン科植物であるシラン（紫蘭）（*Bletilla striata* cv. 'Murasaki Shikibu'）を用いて、人工培地を用いた無菌発芽系および共生菌を用いた共生発芽系において、発芽に対する植物ホルモンおよびその阻害剤の影響を調べた（図1に両系の概要を示す）。両発芽系により、同調的に発芽後の幼植物体が得られた（図2）。

【0021】

（1）無菌発芽系での結果

市販のハイポネックスを用いたハイポネックス寒天培地を用いた。ジベレリン（10 μM）、ジベレリン阻害剤（ピピフルフロアブル、10 μM）を添加したハイポネックス寒天培地に、シランの種子を無菌的に播種し、25℃暗下で1週間培養し、発芽状況を調べた。コントロール系は、上記植物ホルモンおよびその阻害剤を添加しない系であった。結

果を図3に示す。ジベレリン阻害剤で発芽が促進された。ジベレリン添加系では発芽が抑制された。

【0022】

(2) 共生発芽系での結果

シランの共生菌として知られるツラスネラ属の菌 (*Turasnella* sp. HR1 1株) を用い、植物が直接栄養分を利用できないオートミール寒天培地を用いて共生発芽系を独自に構築した。ジベレリン ($10 \mu\text{M}$)、ジベレリン阻害剤 (ピピフルフロアブル、 $10 \mu\text{M}$) を添加したオートミール寒天培地に、シランの種子を無菌的に播種し、25℃ 暗下で1週間培養し、発芽状況を調べた。コントロール系は、上記植物ホルモンおよびその阻害剤を添加しない系であった。結果を図4に示す。ジベレリン阻害剤添加系で発芽が促進された。ジベレリン添加系では発芽が抑制された。

10

【0023】

(3) ピピフルフロアブル以外のジベレリン阻害剤がラン科植物の発芽に及ぼす影響

発芽系は実施例1の(1)で説明した無菌発芽系を用いた。培地にはビーナイン (10ppb)、バウンティ (10ppb)、理研バイオロック (10ppb)、スミセブンP (10ppb) を添加した。25℃ 暗下で2週間培養し、発芽状況を調べた。コントロール系は、上記ジベレリン阻害剤を添加しない系であった。結果を図5に示す。ビーナイン、バウンティ、理研バイオロック、スミセブンP添加系で発芽が促進された。このように、本発明の効果がピピフルフロアブル以外のジベレリン阻害剤でも確認されたことから、本発明はジベレリンの生合成を阻害する物質、およびジベレリンの作用を阻害する物質を包含する剤で広く適用可能であると考えられる。

20

【0024】

無菌発芽系および共生発芽系において、ジベレリン阻害剤に代えてサリチル酸 ($10 \mu\text{M}$) を用いた場合にも発芽促進効果が確認された。

【実施例2】

【0025】

実施例2. 植物ホルモンおよびその阻害剤が野生の地生ランの種子の発芽に及ぼす影響

地生ランであるキバナノアツモリソウ、ネジバナ、オオミヤマウツラの種子を用いた。発芽系は実施例1の(1)で説明した無菌発芽系を用いた。キバナノアツモリソウの種子の場合は、培地にジベレリン阻害剤 (ピピフルフロアブル、 $10 \mu\text{M}$) を培地に添加した。ネジバナおよびオオミヤマウツラの種子の場合は、培地にジベレリン阻害剤 (LウニコナゾールP、 0.5mg/L) を添加した。播種後一定期間経過した種子の形態等を観察し、薬剤の転化効果を評価した。結果を図6に示す。キバナノアツモリソウにジベレリン阻害剤処理を行うことにより、胚の発達などの発芽の徴候が観察された (白矢印)。ジベレリン阻害剤処理により、ネジバナとオオミヤマウツラの発芽が観察された (白矢印)。コントロール系では発芽および発芽の徴候は観察されなかった。このように、本発明の効果がシランとは属が異なる地生ランであるキバナノアツモリソウ、ネジバナ、オオミヤマウツラでも確認されたことから、本発明はラン科植物で広く適用可能であると考えられる。

30

40

【0026】

ジベレリン阻害剤に代えてサリチル酸 ($10 \mu\text{M}$) を用いて上記実験を行った場合にも発芽促進効果が確認された。

【実施例3】

【0027】

実施例3. 植物ホルモンとその阻害剤がラン科植物の共生菌との共生に及ぼす影響

ラン科植物としてシランを用いた。植物ホルモンおよびその阻害剤は、ジベレリン (1mg/L)、ジベレリン阻害剤 (LウニコナゾールP、 0.5mg/L) であった。実施例1の(2)で説明した共生発芽系を用いて得られたプロトコームにおける共生細胞数を定量した (実験の概要については図7参照)。結果を図8に示す。後期ステージではペロ

50

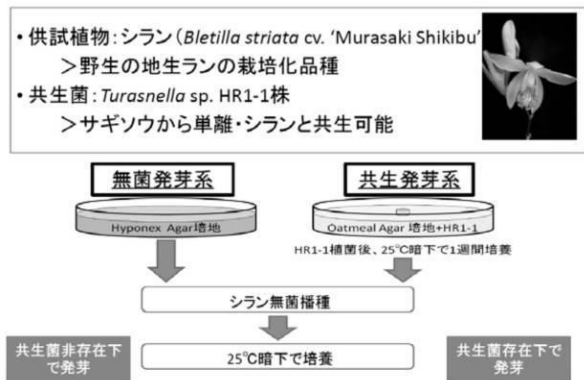
トンが分解して共生菌が細胞から消失しているの、後期ステージでの共生細胞数は示していない。前期ステージおよび中期ステージの共生細胞数の増減を指標に共生度を定量的に評価した結果、ジベレリン阻害剤処理により共生が促進され、ジベレリン処理により共生が抑制された。

【産業上の利用可能性】

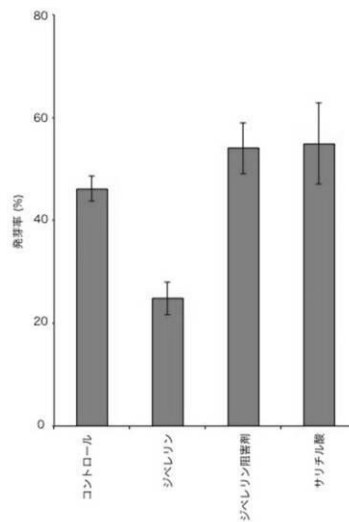
【0028】

本発明は、安価で入手容易な農薬等を用いるものであり、また、既存の農薬の新たな用途を開拓するものである。さらに、本発明は、近年高まりを見せている環境保護のニーズにも応えるものである。したがって、本発明は、園芸分野、農薬分野、環境事業の分野、植物の研究分野等の幅広い産業分野において利用することができる。

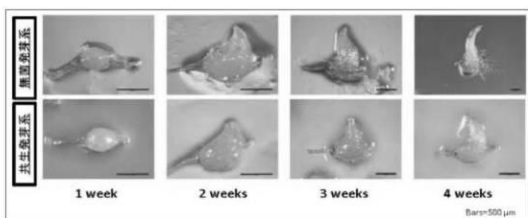
【図1】



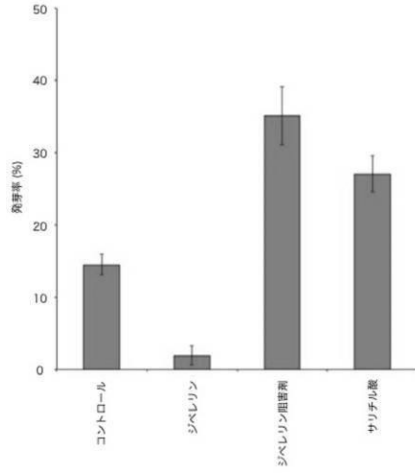
【図3】



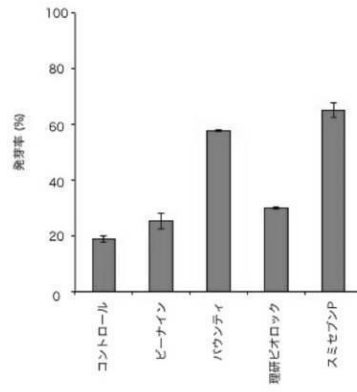
【図2】



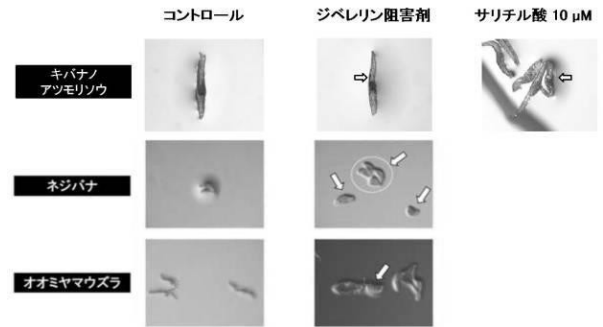
【 図 4 】



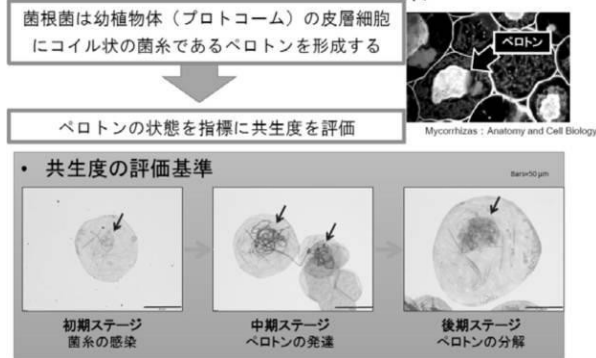
【 図 5 】



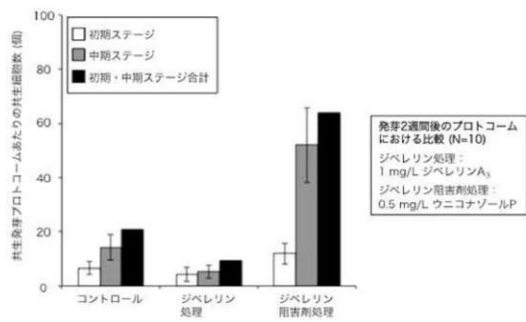
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 0 1 P	21/00	(2006.01)	A 0 1 N	43/653	H
A 0 1 C	1/00	(2006.01)	A 0 1 P	21/00	
A 0 1 G	7/00	(2006.01)	A 0 1 C	1/00	F
A 0 1 G	7/06	(2006.01)	A 0 1 G	7/00	6 0 5 Z
			A 0 1 G	7/06	A

(72)発明者 山本 樹稀
鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地 国立大学法人鳥取大学内

(72)発明者 古井 佑樹
鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地 国立大学法人鳥取大学内

審査官 阿久津 江梨子

(56)参考文献 特開平5 - 2 8 6 8 1 2 (J P , A)
特開平5 - 3 7 2 6 (J P , A)
特開2 0 1 7 - 3 8 5 6 2 (J P , A)
特開2 0 0 5 - 2 4 5 3 3 3 (J P , A)
土と微生物, 1 9 9 4 年, No.44, pp.43 52

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 0 1 N 3 7 / 1 0
A 0 1 C 1 / 0 0
A 0 1 G 7 / 0 0
A 0 1 G 7 / 0 6
A 0 1 N 3 7 / 3 0
A 0 1 N 3 7 / 4 2
A 0 1 N 4 3 / 6 5 3
A 0 1 P 2 1 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
J S T C h i n a (J D r e a m I I I)