

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02007/100162

発行日 平成21年7月23日(2009.7.23)

(43) 国際公開日 平成19年9月7日(2007.9.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 1/20 (2006.01)	C12N 1/20 ZNAA	2B030
AO1H 17/00 (2006.01)	AO1H 17/00	4B065
AO1N 63/00 (2006.01)	C12N 1/20 E	4H011
AO1P 3/00 (2006.01)	AO1N 63/00 F	
AO1H 5/00 (2006.01)	AO1P 3/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2008-502889 (P2008-502889)	(71) 出願人	000148357 株式会社前川製作所 東京都江東区牡丹3丁目14番15号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2007/054624	(71) 出願人	503359821 独立行政法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(22) 国際出願日	平成19年3月2日(2007.3.2)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	特願2006-58483 (P2006-58483)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(32) 優先日	平成18年3月3日(2006.3.3)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100101904 弁理士 島村 直己
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】新規細菌及びそれを用いた植物病害の防除方法

(57) 【要約】

本発明は農業上有用な植物に、病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する抵抗性を付与する手段を提供することを目的とする。

本発明は、Azospirillum属又はHerbaspirillum属に属し、植物体内に共生して宿主植物に病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を付与する能力を有する細菌、該細菌を用いた植物病害の防除方法、並びに該方法により作出された植物に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

Azospirillum属又はHerbaspirillum属に属し、植物体内に共生して宿主植物に病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を付与する能力を有する細菌を、植物に人為的に感染させる工程を含む、植物における病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害の防除方法。

【請求項 2】

前記細菌がAzospirillum属新規細菌（受託番号NITE BP-194）、及びHerbaspirillum属新規細菌（受託番号NITE BP-193）、並びにそれらの変異株からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項1記載の方法。

10

【請求項 3】

前記植物がイネ科又はアブラナ科に属する植物である、請求項1又は2記載の方法。

【請求項 4】

細菌の植物への感染が植物の栄養成長期に行われる、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5】

Azospirillum属又はHerbaspirillum属に属し、植物体内に共生して宿主植物に病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を付与する能力を有する細菌を有効成分として含有する、植物における病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害の防除剤。

20

【請求項 6】

前記細菌がAzospirillum属新規細菌（受託番号NITE BP-194）、及びHerbaspirillum属新規細菌（受託番号NITE BP-193）、並びにそれらの変異株からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項5記載の防除剤。

【請求項 7】

Azospirillum属新規細菌（受託番号NITE BP-194）又はその変異株であって植物体内に共生して宿主植物に病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を付与する能力を有する変異株。

30

【請求項 8】

Herbaspirillum属新規細菌（受託番号NITE BP-193）又はその変異株であって植物体内に共生して宿主植物に病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を付与する能力を有する変異株。

【請求項 9】

Azospirillum属新規細菌（受託番号NITE BP-194）、及びHerbaspirillum属新規細菌（受託番号NITE BP-193）、並びにこれらの変異株であって植物体内に共生して宿主植物に病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を付与する能力を有する変異株からなる群から選択される少なくとも1種が人為的に感染された、病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を有する植物。

40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、新規細菌エンドファイト、それを用いた植物における病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害の防除方法、並びにこの方法により作出された植物に関する。

【背景技術】**【0002】**

これまでの化学農薬を中心とした病虫害防除技術は、効率的な食糧確保に貢献してきた

50

。ところが近年、栽培の効率性だけでなく、安心・安全といった領域を含めた無農薬、減農薬による環境保全型農業が望まれ、それに適合した病害虫防除技術（例えば微生物農薬）が必要とされている。

【発明の開示】

【0003】

本発明は農業上有用な植物に、病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する抵抗性を付与する手段を提供することを目的とする。

本発明は以下の発明を包含する。

(1) *Azospirillum*属又は*Herbaspirillum*属に属し、植物体内に共生して宿主植物に病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を付与する能力を有する細菌を、植物に人為的に感染させる工程を含む、植物における病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害の防除方法。

(2) 前記細菌が*Azospirillum*属新規細菌（受託番号NITE BP-194）、及び*Herbaspirillum*属新規細菌（受託番号NITE BP-193）、並びにそれらの変異株からなる群から選択される少なくとも1種である、(1)記載の方法。

(3) 前記植物がイネ科又はアブラナ科に属する植物である、(1)又は(2)記載の方法。

(4) 細菌の植物への感染が植物の育苗期に行われる、(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

(5) *Azospirillum*属又は*Herbaspirillum*属に属し、植物体内に共生して宿主植物に病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を付与する能力を有する細菌を有効成分として含有する、植物における病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害の防除剤。

(6) 前記細菌が*Azospirillum*属新規細菌（受託番号NITE BP-194）、及び*Herbaspirillum*属新規細菌（受託番号NITE BP-193）、並びにそれらの変異株からなる群から選択される少なくとも1種である、(5)記載の防除剤。

(7) *Azospirillum*属新規細菌（受託番号NITE BP-194）又はその変異株であって植物体内に共生して宿主植物に病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を付与する能力を有する変異株。

(8) *Herbaspirillum*属新規細菌（受託番号NITE BP-193）又はその変異株であって植物体内に共生して宿主植物に病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を付与する能力を有する変異株。

(9) *Azospirillum*属新規細菌（受託番号NITE BP-194）、及び*Herbaspirillum*属新規細菌（受託番号NITE BP-193）、並びにこれらの変異株であって植物体内に共生して宿主植物に病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を付与する能力を有する変異株からなる群から選択される少なくとも1種が人為的に感染された、病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を有する植物。

本明細書において「*Azospirillum*属新規細菌」とは、実施例1で単離同定された、受託番号NITE BP-194が付与された*Azospirillum*属に属する細菌を指す。

本明細書において「*Herbaspirillum*属新規細菌」とは、実施例2で単離同定された、受託番号NITE BP-193が付与された*Herbaspirillum*属に属する細菌を指す。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2006-58483号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0004】

10

20

30

40

50

図1-1は、*Azospirillum*属新規細菌と*Azospirillum* sp. Arm2-2株 (Accession No. AF521650)との16S rDNAの比較結果を示す(図1-2に続く)。

図1-2は、*Azospirillum*属新規細菌と*Azospirillum* sp. Arm2-2株 (Accession No. AF521650)との16S rDNAの比較結果を示す(図1-3に続く)。

図1-3は、*Azospirillum*属新規細菌と*Azospirillum* sp. Arm2-2株 (Accession No. AF521650)との16S rDNAの比較結果を示す。

図2-1は、*Herbaspirillum*属新規細菌と*Herbaspirillum rubrisbalbicans* (Accession No. AF137508)との16S rDNAの比較結果との16S rDNAの比較結果を示す(図2-2に続く)。

図2-2は、*Herbaspirillum*属新規細菌と*Herbaspirillum rubrisbalbicans* (Accession No. AF137508)との16S rDNAの比較結果との16S rDNAの比較結果を示す(図2-3に続く)。

図2-3は、*Herbaspirillum*属新規細菌と*Herbaspirillum rubrisbalbicans* (Accession No. AF137508)との16S rDNAの比較結果との16S rDNAの比較結果を示す。

図3は、ITS領域とnested PCRプライマーとの位置関係を示す。

図4は、*Azospirillum*属新規細菌によるシロイヌナズナにおける細菌性病害の防除効果を示す写真である。

図5は、*Azospirillum*属新規細菌及び*Herbaspirillum*属新規細菌によるシロイヌナズナにおける細菌性病害の防除効果を示す写真である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

本発明の細菌の感染により、病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性が付与される植物としては、イネ科植物又はアブラナ科植物が挙げられる。イネ科植物としては、特にイネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、ライコムギ、ハトムギ、ソルガム、エンバク、トウモロコシ、サトウキビ、アワ、ヒエなどの穀類が挙げられる。イネ科植物としてはさらに、シバ、バッファローグラス、パミュダグラス、ウィーピンググラス、センチピードグラス、カーベットグラス、ダリスグラス、キクユグラス、セントオーガスチングラスなどの飼料または牧草が挙げられる。アブラナ科植物としては、特にアブラナ、カブ、チンゲンサイ、ノザワナ、カラシナ、タカナ、コブタカナ、水菜、コールラビー、ルッコラ、クレソン、タアサイ、カリフラワー、キャベツ、ケール、ハクサイ、コマツナ、ダイコン、ハツカダイコン、ブロッコリー、メキャベツ、ワサビ、セイヨウワサビが挙げられる。

本発明はまた、本発明の細菌が人為的に感染された、病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を有する上記植物に関する。

本発明により防除され得る病原性糸状菌による植物病害としては、イネいもち病(病原糸状菌: *Magnaporthe grisea*)、イネゴマ葉枯病(病原糸状菌: *Bipolaris leersiae*)、イネばか苗病(病原糸状菌: *Gibberella fujikuroi*)、イネ紋枯病(病原糸状菌: *Thanatephorus cucumuris*)、イネ黄化萎縮病菌(病原糸状菌: *Sclerophthora macrospora*)、イネ疑似紋枯病(病原糸状菌: *Rhizoctonia solani*)、コムギ麦角病(病原糸状菌: *Claviceps purpurea*)、コムギ裸黒穂病(病原糸状菌: *Ustilago tritici*)、オオムギ裸黒穂病(病原糸状菌: *Ustilago nuda*)、ライムギ雪腐褐色小粒菌核病(病原糸状菌: *Typhula incarnata*)、ライムギ斑点病(病原糸状菌: *Cochli*

10

20

30

40

50

obolus sativus) イネ、エンバク、コムギ、オオムギ、ライムギの立枯病 (病原糸状菌: *Gaeumannomyces graminis*)、トウモロコシすす紋病 (病原糸状菌: *Setosphaeria turcica*)、アブラナ科野菜根こぶ病 (病原糸状菌: *Plamodiophora brassicae*)、アブラナ科野菜立枯病 (病原糸状菌: *Thanatephorus cucumeris*)、ハクサイ黄化病 (病原糸状菌: *Verticillium albo-atrum*)、ダイコン萎黄病 (病原糸状菌: *Fusarium oxysporum* f. sp. *Raphani*)、ダイコン白さび病 (病原糸状菌: *Albugo macrospora*)、コマツナ白さび病 (病原糸状菌: *Albugo macrospora*) が挙げられる。

本発明により防除され得る病原性細菌による植物病害としては、イネ白葉枯れ病 (病原細菌: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、イネもみ枯細菌病 (病原細菌: *Pseudomonas glumae*) ハクサイ、アブラナ科野菜に重大な被害をもたらす野菜類軟腐病 (病原細菌: *Erwinia carotovora*)、キャベツ黒腐病 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)、が挙げられる。

本明細書に開示する実施例では、本発明に係る細菌が、病原性糸状菌による植物病害の防除に有効であること、並びに病原性細菌による植物病害の防除に有効であることが示されている。このことから、本発明に係る細菌は、宿主植物自身の病害抵抗性を高めていることがわかる。よって、本発明に係る細菌は、病原性糸状菌又は病原性細菌による植物病害の防除に有効であるだけでなく、病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる植物病害の防除においても有効である。

本発明により防除され得る病原性ウイルスによる植物病害としては、イネ萎縮病 *Rice dwarf reovirus*、イネ縞葉枯病 *Rice stripe tenuivirus*、イネ黒すじ萎縮病 *Rice black-streaked dwarf reovirus*、イネえそモザイク病 *Rice necrosis mosaic potyvirus*、イネわい化病 *Rice waika virus*、コムギ縞萎縮病 *Wheat yellow mosaic virus*、オオムギ縞萎縮病 *Barley yellow mosaic virus*、オオムギ斑葉モザイクウイルス *Barley stripe hordeivirus*、ダイコン、カブ、コマツナのウイルス病としてキュウリモザイクウイルス、カブモザイクポティウイルス、ダイコンひだ葉モザイクコモウイルス、ソラマメウルトファウイルスが挙げられる。

本発明に用いることができる細菌としては、*Azospirillum* 属又は *Herbaspirillum* 属に属し、植物体内に共生して宿主植物に病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を付与する能力を有する細菌であれば特に限定されない。具体例を挙げれば、*Azospirillum* 属新規細菌 (受託番号 NITE BP-194)、及び *Herbaspirillum* 属新規細菌 (受託番号 NITE BP-193) が挙げられる。また、*Azospirillum* 属新規細菌 (受託番号 NITE BP-194)、又は *Herbaspirillum* 属新規細菌 (受託番号 NITE BP-193) と同等の能力を有する細菌、例えば、*Azospirillum* 属に属し、実施例 1 に示す *Azospirillum* 属新規細菌と同一の炭素源の資化能力を有する細菌や、*Azospirillum* 属に属し、配列番号 1 に示す塩基配列を少なくとも一部分に含む 16S rDNA を有する細菌や、*Herbaspirillum* 属に属し、実施例 2 に示す *Herbaspirillum* 属新規細菌と同一の炭素源の資化能力を有する細菌や、*Herbaspirillum* 属に属し、配列番号 2 に示す塩基配列を少なくとも一部分に含む 16S rDNA を有する細菌が挙げられるがこれらには限定されない。更にまた、*Azospirillum* 属新規細菌 (受託番号 NITE BP-194)、又は *Herbaspirillum* 属新規細菌 (受託番号 NITE BP-193) が変異誘発処理されて作出された変異株であって、植物体内に共生して宿主植物に病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を付与する能力を有する変異株もまた、本発明に好適に使用することができる。このような変異株の

10

20

30

40

50

なかでも、*Azospirillum*属に属し、実施例1に示す*Azospirillum*属新規細菌と同一の炭素源の資化能力を有する細菌や、*Azospirillum*属に属し、配列番号1に示す塩基配列を少なくとも一部分に含む16S rDNAを有する細菌や、*Herbaspirillum*属に属し、実施例2に示す*Herbaspirillum*属新規細菌と同一の炭素源の資化能力を有する細菌や、*Herbaspirillum*属に属し、配列番号2に示す塩基配列を少なくとも一部分に含む16S rDNAを有する細菌が好ましい。変異誘発処理は任意の適当な変異原を用いて行われ得る。ここで、「変異原」なる語は広義の意味を有し、例えば変異原効果を有する薬剤のみならずUV照射のごとき変異原効果を有する処理をも含むものと理解すべきである。適当な変異原の例としてエチルメタンスルホネート、UV照射、N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、プロモウラシルのようなヌクレオチド塩基類似体及びアクリジン類が挙げられるが、他の任意の効果的な変異原もまた使用され得る。

10

本発明に用いられる細菌は、振とう培養等の通常の培養法により、通常の条件下で培養されうる。培養に用いる培地としては炭素源としてグルコース、シュークロース、デンプン、デキストリンなどの糖類を、窒素源として硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム等のアンモニウム塩、硝酸塩等の無機窒素源、または、酵母エキス、コーン・スティーブ・リーカー、肉エキス、小麦胚芽、ポリペプトン、サトウキビ絞り粕（バカス）、ビールカス、大豆粉、米糠、魚粉等の有機窒素源を、無機塩としてリン酸一カリ、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸第一鉄等の、リン、カリウム、マンガン、マグネシウム、鉄等を含む塩類を、それぞれ含有する合成または天然の培地が挙げられる。

20

本発明はまた、本発明の細菌を有効成分として含有する、植物における病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害の防除剤に関する。当該植物病害防除剤としては、本発明の細菌の培養液をそのまま使用することができるが、細菌の培養液を膜分離、遠心分離、濾過分離等の方法により分離した、本発明の細菌の高濃度物を用いることもできる。

本発明の植物病害防除剤としてはまた、本発明の細菌の培養液を乾燥させたものを使用することができる。また、本発明の細菌の培養液を活性炭粉末、珪藻土、タルク等の多孔吸着体に吸着させ乾燥させたものを使用することができる。乾燥方法は通常の方法でよく、例えば凍結乾燥、減圧乾燥でよい。これらの乾燥物は乾燥後さらにボールミル等の粉碎手段で粉碎されてもよい。

30

本発明の細菌は上述の培養液、高濃度物または乾燥物としてそれ自体単独で本発明に用いることができるが、更なる他の任意成分と組み合わせて通常の微生物製剤と同様の形態（例えば粉剤、水和剤、乳剤、液剤、フロアブル剤、塗布剤等の形態）に製剤化して、植物病害防除用組成物として提供されてもよい。組み合わせて使用することができる任意成分としては例えば固体担体、補助剤のような植物への適用が許容される材料が挙げられる。

本発明の細菌の植物への感染は、植物の栄養成長期に行われることが好ましい。

本発明の細菌またはそれを含有する組成物の植物への施用方法としては、噴霧、灌注、どぶ漬け、植物体への塗布、人為的に付けた傷への接触、シリンジによる注入、土壌への混合、水耕液への混入、砂等へ混合してサンドブラストのように吹きつける方法などが考えられる。本発明の細菌を懸濁してなる懸濁液を植物に灌注処理する場合には、懸濁液中の本発明の細菌の濃度は $10^4 \sim 10^{12}$ CFU/mlが好ましい。

40

【実施例1】

【0006】

*Azospirillum*属新規細菌の単離と同定

栽培イネ日本晴 (*Oryza sativa* cv. *Nipponbare*) の茎を3cm程とり、70%エタノールと1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面殺菌した。それを滅菌した乳鉢で、滅菌した0.85%食塩水と海砂を加えながら磨砕した。窒素固定菌が窒素固定活性を発現可能な、Rennie培地が知られている (Rennie, R. J. 1981. *Can. J. Microbiol.* 27: 8-14)。磨砕液の上清を、試験

50

管の R e n n i e 半流動培地に接種し培養した。アセチレン還元活性のあった試験管から、N u t r i e n t A g a r 培地に植菌して、シングルコロニーを単離した。

単離したシングルコロニーの菌株を栽培イネに接種し、いもち病に対する抵抗性評価試験を実施した。その結果、イネに病害抵抗性を付与する細菌の菌株を選抜した。

当該菌株を N u t r i e n t B r o t h で培養し、菌体からゲノム DNA を単離した。単離した DNA を鋳型に、16 S r D N A 領域のほぼ全長の塩基配列を d y e プライマー法で決定した（配列番号 1）。相同性検索プログラム F A S T A を利用し、決定した塩基配列と、D D B J / E M B L / G e n B a n k 国際塩基配列データベースとの相同性検索を行った。

当該菌株は *A z o s p i r i l l u m* s p . A r m 2 - 2 株（A c c e s s i o n N o . A F 5 2 1 6 5 0）と、98.5% 相同であった（図 1）。当該菌株の 16 S r D N A は既存の種の 16 S r D N A と一致しなかった。

当該菌株の基質資化能を検討したところ、表 1 に示す結果が確認された。

【表 1】

表 1

実施例 1 で選抜された菌株による資化が確認された基質	
グリセロール	
L-アラビノース	
リボース	
D-キシロース	10
ガラクトース	
グルコース (嫌気条件)	
フルクトース (嫌気条件)	
イノシトール	
マンニトール	
ソルビトール	
エスクリン	
D-マンノース	20
N-アセチル-D-グルコサミン	
グルコン酸カリウム	
n-カプリン酸	
DL-リンゴ酸	
クエン酸ナトリウム	
実施例 1 で選抜された菌株による資化が確認されなかった基質	
エリスリトール	30
D-アラビノース	
L-キシロース	
アドニトール	
β -メチル-D-キシロース	
マンノース	
ソルボース	
ラムノース	40
ズルシトール	
α -メチル-D-マンノース	
α -メチル-D-グルコース	
N-アセチルグルコサミン	
アミグダリン	
アルブチン	

サリシン	
セロビオース	
マルトース	
乳糖	
メリビオース	
白糖	
トレハロース	10
イヌリン	
メレチトース	
ラフィノース	
澱粉	
グリコーゲン	
キシリトール	
ゲンチオビオース	20
D-ツラノース	
D-リキソース	
D-タガトース	
D-フコース	
L-フコース	
D-アラビトール	
L-アラビトール	
グルコネート	30
2-ケトグルコン酸	
5-ケトグルコン酸	
アビジン酸	
酢酸フェニル	

以上の結果から、選抜された菌株は *Azospirillum* 属に属する細菌の新規株であると結論づけた。

本発明者らは、*Azospirillum* 属新規細菌を独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に2006年2月10日付で受託番号NITE BP-194として寄託した。

【実施例2】

【0007】

Herbaspirillum 属新規細菌の単離と同定

日本に保存されている野生イネ (*Oryza barthii* W1407) の葉身を3cm程とり、70%エタノールと1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面殺菌した。それを滅菌した乳鉢で、滅菌した0.85%食塩水と海砂を加えながら磨砕した。窒素固定菌が窒素固定活性を発現可能な、Rennie培地が知られている (Rennie, R. J. 1981. Can. J. Microbiol. 27: 8-14)。磨砕液の上清を、試験管のRennie半流動培地に接種し培養した。アセチレン還元活性のあった試験管が

ら、Nutrient Agar培地に植菌して、シングルコロニーを単離した。

単離したシングルコロニーの菌株を栽培イネに接種し、いもち病に対する抵抗性評価試験を実施した。その結果、イネに病害抵抗性を付与する細菌の菌株を選抜した。

当該菌株をNutrient Brothで培養し、菌体からゲノムDNAを単離した。単離したDNAを鋳型に、16S rDNA領域のほぼ全長の塩基配列をdyeプライマー法で決定した(配列番号2)。相同性検索プログラムFASTAを利用し、決定した塩基配列と、DDBJ/EMBL/GenBank国際塩基配列データベースとの相同性検索を行った。

当該菌株はHerbaspirillum rubrisubalbicans (Accession No. AF137508)と99.6%相同であった(図2)。当該菌株の16S rDNAは既存の種の16S rDNAと一致しなかった。

当該菌株の基質資化能を検討した。16S rDNA塩基配列の相同性検索において相同製が高かった、Herbaspirillum rubrisubalbicansのATCC 19308株と基質資化能を比較した。比較結果を表2に示す。表中丸印は資化可能であったことを示し、バツ印は資化不能であったことを示す。

【表2】

表2

実施例2で選抜された菌株とHerbaspirillum rubrisubalbicans ATCC 19308 株の
基質資可能の比較

基質	実施例2で 選抜された菌株	Herbaspirillum rubrisubalbicans (ATCC 19308)
N-アセチル-D-グルコサミン	×	×
L-アラビノース	×	○
α-D-グルコース	×	○
m-イノシトール	×	×
マルトース	×	×
D-マンニトール	×	○
D-マンノース	×	○
L-ラムノース	○	×
スクロース	×	×
クエン酸	×	○

また選抜された菌株はL-ラムノース以外にもケトグルタル酸ナトリウム、m-エリスリトール、セバシン酸2アンモニウムを資化する能力を有することがわかった。

また選抜された菌株は表に示した基質以外にもグルコン酸カリウム、n-カプリン酸、アジピン酸、DL-リンゴ酸、クエン酸ナトリウム、酢酸フェニル、白糖を資化することができなかった。

以上の結果から、選抜された菌株はHerbaspirillum属に属する細菌の新規株であると結論づけた。

本発明者らはHerbaspirillum属新規細菌を、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に2006年2月10日付で受託番号NITE BP-193として寄託した。

【実施例 3】

【0008】

Nested-PCR法を用いたAzospirillum属新規細菌及びHerbaspirillum属新規細菌の検出

Azospirillum属新規細菌又はHerbaspirillum属新規細菌が感染しているか否かが不明の植物において、これらの菌の感染の有無を検出する方法を検討した。そして、以下に示す通り、Nested-PCR法が有効であることが明らかとなった。

Azospirillum属新規細菌及びHerbaspirillum属新規細菌で、16SrDNAと23SrDNA間のITS領域の塩基配列を決定した。Azospirillum属新規細菌のITS領域の塩基配列を配列番号3に、Herbaspirillum属新規細菌のITS領域の塩基配列を配列番号4にそれぞれ示す。

各菌株のITS領域の塩基配列と、DDBJ/EMBL/GenBank国際塩基配列データベースに登録されている近縁及び遠縁の6~7細菌のITS領域塩基配列とを多重整列プログラムClustalWを利用して比較し、ITS領域を増幅させるプライマー2セットを、他の細菌と相同性の低い領域で作製した(図3、表3)。

Azospirillum属新規細菌接種植物、又はHerbaspirillum属新規細菌接種植物の、成長点付近を取り、生理食塩水を加え、乳鉢、又はビーズによる細胞破碎装置で出来る限り細かく破碎した。その破碎液からDNAを抽出した。DNA溶液を鋳型とし表4及び5に示した条件で、プライマーセット1によるPCR(第1のPCR)、次にそのPCR溶液を鋳型とした、更に内側のプライマーセット2によるPCR(第2のPCR)を行い、目的DNA断片の検出を検討した。

Azospirillum属新規細菌接種植物では、プライマーセット1によるPCR増幅断片のサイズは484bpであり、プライマーセット2によるPCR増幅断片のサイズは298bpであった。Herbaspirillum属新規細菌接種植物では、プライマーセット1によるPCR増幅断片のサイズは356bpであり、プライマーセット2によるPCR増幅断片のサイズは241bpであった。

以上の結果から、検査対象の植物体からの試料に対して表3に示すプライマーセットを用いたNested-PCR法を行い上記サイズの増幅断片が得られた場合に、増幅断片サイズに対応するエンドファイト(Azospirillum属新規細菌又はHerbaspirillum属新規細菌)が感染していると結論づけることができることが明らかとなった。

【表3】

表3

PCR primers		塩基配列		Tm	Length	
Azospirillum	nest 1	5'-	TTGAGGGTCCCGCATCAG	-3'	67.45	18
	nest 2	5'-	TCAGGAAGTCCGTATGGCGTT	-3'	67.65	21
	nest 3	5'-	CGTCCCTCGACACCAGCAC	-3'	69.52	19
	nest 4	5'-	GTCGCCTTGTGGGCTTGC	-3'	69.35	18
Herbaspirillum	nest 1	5'-	GCGGTCCGTGACACAA	-3'	63.34	16
	nest 2	5'-	CAAGTCACTGACTGGCTACTG	-3'	63.76	22
	nest 3	5'-	CACTACGTCTTGCCTTTTGTG	-3'	63.20	21
	nest 4	5'-	CGCAAGAACCGAAGTCCT	-3'	62.99	18

【表 4】

表 4

Azospirillum属新規細菌の第1のPCRの条件

温度 (°C)	時間 (秒)	サイクル数
94	30	1
94	30	40
68	30	
72	15	
16	∞	

10

Azospirillum属新規細菌の第2のPCRの条件

温度 (°C)	時間 (秒)	サイクル数
94	10	1
94	10	40
69	10	
72	10	
16	∞	

20

【表 5】

表 5

Herbaspirillum属新規細菌の第1のPCRの条件

温度 (°C)	時間 (秒)	サイクル数
94	30	1
94	30	40
66	20	
72	12	
16	∞	

30

Herbaspirillum属新規細菌の第2のPCRの条件

温度 (°C)	時間 (秒)	サイクル数
94	10	1
94	10	40
66	10	
72	8	
16	∞	

40

【実施例 4】

【0009】

ELISA法を用いたAzospirillum属新規細菌及びHerbaspirillum属新規細菌の検出

実施例 3 に示す方法の外に、Azospirillum属新規細菌又はHerbaspirillum属新規細菌が感染しているか否かが不明の植物において、これらの菌の感染の有無を検出する方法を検討した。そして、以下に示す通り、ELISA法が有効であることが明らかとなった。

50

ELISA法のためにAzospirillum属新規細菌、Herbaspirillum属新規細菌に対するポリクローナル抗体を以下の方法で作製した。Azospirillum属新規細菌及びHerbaspirillum属新規細菌をホルマリン処理し、抗原菌体液を調製した。それぞれウサギ背部に $3 \sim 4 \times 10^8$ 細胞ずつ免疫した。エマルジョン作製は、初回はフロイントコンプリートアジュバント、2回目からはフロイントインコンプリートアジュバントを使用し2週間間隔で免疫した。6回免疫後に全採血し、ウサギ抗Azospirillum属新規細菌血清、ウサギ抗Herbaspirillum属新規細菌血清を調製した。

Azospirillum属新規細菌又はHerbaspirillum属新規細菌を接種した植物体に生理食塩水を加え、乳鉢、又はビーズによる細胞破碎装置で出来る限り細かく破碎した。破碎液を弱く遠心し、大きな植物残さを除き、上記ポリクローナル抗体を用い常法のELISAに供試した。

植物破碎液をマイクロタイタープレートに注入し、菌体を壁に吸着させ、洗浄後に、10万倍希釈した上記ポリクローナル抗体を反応させた。コントロールとして、無接種植物の破碎液、既知量の菌体を同時に供試した。洗浄後、パーオキシデース標識された二次抗体(抗ウサギ抗体)を反応させ、パーオキシデースによる色素生成反応後に吸光度を測定した。

その結果、Azospirillum属新規細菌又はHerbaspirillum属新規細菌接種植物サンプルでは無接種植物サンプルより吸光度が上昇し、接種菌(Azospirillum属新規細菌又はHerbaspirillum属新規細菌)が感染していると結論づけることができることが明らかとなった。また、コントロールと比較することにより植物中の定着菌数の推定が可能であった。

【実施例5】

【0010】

イネにおける、Azospirillum属新規細菌及びHerbaspirillum属新規細菌のイネいもち病に対する病害抵抗性誘導効果

(目的)

本実施例ではAzospirillum属新規細菌又はHerbaspirillum属新規細菌(以下両菌株の総称として「エンドファイト」ということがある)に感染したイネ(Oryza sativa Nipponbare)を用いてイネいもち病(Magnaporthe grisea race 007)に対する病害抵抗性誘導効果について検証した。イネは単子葉植物のモデル植物である。

(実験方法)

1. イネは3葉期にセルシート(1区画2cm×2cmにイネ幼苗5株)から1%肥料溶液中での水耕栽培に移植した。3.5葉に生育したイネに2種類のエンドファイト調製液をそれぞれ $10^5 \sim 10^9$ CFU/mlになるように灌注処理した。エンドファイト処理5日後にいもち病菌の孢子懸濁液(0.2% Tween 20添加)を噴霧接種し、暗黒下、湿度100%の条件下に24時間静置した後、25℃、湿度60%の温室でさらに4日間栽培した。いもち病菌接種5日後に、第4葉に出現したいもち病の病斑数を計測した。各処理区における病斑数を比較し、いもち病抵抗性を評価した。

2. 上記の方法を用いて、処理期間を5日と10日に設定し、エンドファイトの処理期間がいもち病抵抗性に及ぼす影響について解析した。

なお、表7に示したBenzisothiazole(BIT)は抗イネいもち病農薬プロベナゾールの活性代謝物である。BIT 0.5mg/potを処理したイネは強いイネいもち病抵抗性を誘導する。本実験ではエンドファイト処理区のいもち病抵抗性誘導効果を比較するポジティブコントロールとしてBIT処理区を設けた。

3. 栄養条件がエンドファイト誘導性の病害抵抗性に及ぼす影響について検討するために、肥料濃度を0.5%、0.75%、1%の3段階設定し、3葉期のイネを移植した。2日後にエンドファイト懸濁液を処理し、5日後にいもち病菌を接種し、いもち病抵抗性を評価した。

10

20

30

40

50

(結果)

Azospirillum属新規細菌及びHerbaspirillum属新規細菌の 10^8 CFU/ml処理区においていもち病菌に対する防除価はそれぞれ約52%、55%であった(表6)。また、いもち病抵抗性誘導効果にはエンドファイトの処理期間(5日と10日)による差は認められなかった(表7)。0.5%肥料溶液の処理区では、エンドファイトが誘導する病害抵抗性が認められなかったが、栄養が十分に存在する0.75%と1%肥料溶液の条件では、エンドファイトの耐病性付与効果が認められた(表8)。

【表6】

表6

10

Azospirillum 菌濃度(cfu/ml)	無処理区に対する防除価
10^5	39%
10^6	40%
10^7	30%
10^8	52%
10^9	37%

20

Herbaspirillum 菌濃度(cfu/ml)	無処理区に対する防除価
10^5	40%
10^6	39%
10^7	23%
10^8	55%
10^9	22%

30

【表7】

表7

処理区	処理期間	無処理区に対する防除価
BIT	5 day	81%
Azospirillum 10^8 (cfu/ml)	5 day	59%
Azospirillum 10^8 (cfu/ml)	10 day	58%
Herbaspirillum 10^8 (cfu/ml)	5 day	30%
Herbaspirillum 10^8 (cfu/ml)	10 day	38%

40

【表 8】

表 8

処理条件	肥料濃度	無処理区に対する防除価
Azospirillum 10 ⁸ (cfu/ml) 10 day	0.5%	0%
	0.75%	31%
	1.0%	33%
Herbaspirillum 10 ⁸ (cfu/ml) 10 day	0.5%	0%
	0.75%	33%
	1.0%	39%

10

【実施例 6】

【0011】

シロイヌナズナにおける、Azospirillum 属新規細菌又は Herbaspirillum 属新規細菌の細菌性病害に対する病害抵抗性誘導効果

(目的)

本実施例ではエンドファイトに感染したシロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana Col-0) を用いてシロイヌナズナに罹病性の病原性バクテリア (Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000) に対する病害抵抗性誘導効果について検証した。シロイヌナズナは双子葉植物のモデル植物である。

20

(実験方法)

シロイヌナズナの種子を 70% エタノールで 20 秒間、1% 次亜塩素酸水溶液で 5 分間処理して滅菌後、滅菌した蒸留水で 20 分、3 回洗浄した。オートクレーブ滅菌 (121、40 分) した園芸培土 (Kureha) を入れたプラスチック容器 (5 x 5 x 5 cm) に滅菌した種子を約 20 粒ずつ播種し、人工気象器内で、温度 21、湿度 60%、16 時間明 / 8 時間暗の条件下で栽培した。

30

1) エンドファイト処理濃度が病害抵抗性誘導効果に及ぼす影響

播種後 4 週間目のシロイヌナズナに Azospirillum 属新規細菌調製液を 10⁶ ~ 10⁸ CFU/ml になるように灌注処理した。エンドファイト処理 5 日後に Pst DC3000 (1 x 10⁷ CFU/ml) を接種し、5 日後に葉の病徴をコントロールと比較した。

2) エンドファイト処理期間が病害抵抗性誘導効果に及ぼす影響

播種後 3 週間目のシロイヌナズナに Azospirillum 属新規細菌と Herbaspirillum 属新規細菌の菌懸濁液をそれぞれ 10⁷ CFU/ml になるように灌注処理した。エンドファイト処理 10 日後と 15 日後に Pst DC3000 (1 x 10⁷ CFU/ml) を接種し、5 日後に葉の病徴をコントロールと比較した。

40

3) エンドファイト処理が Pst DC3000 の増殖に及ぼす影響

播種後 3 週間目のシロイヌナズナに上と同じように菌懸濁液をそれぞれ 10⁷ 又は 10⁸ CFU/ml になるように灌注処理した。処理後 15 日後に Pst DC3000 (2 x 10⁵ CFU/ml) を接種し、3 日後の葉を回収し、10 mM MgCl₂ 中で磨砕した。磨砕液を三段階に希釈し、NB 平板培地 (rifampicin 50 mg/l) に塗布した。28 度で二晩培養後、コロニーをカウントして植物体内での菌の増殖率を数値化した。

(結果)

1) Azospirillum 属新規細菌を 10⁶ から 10⁸ CFU/ml で処理した結

50

果、エンドファイト処理濃度が高いほど *P s t D C 3 0 0 0* の病徴を抑制する傾向が認められた (図 4) 。

2) *A z o s p i r i l l u m* 属新規細菌処理区では処理期間が長い方が *P s t D C 3 0 0 0* の病徴抑制効果が高い傾向が観察された。

H e r b a s p i r i l l u m 属新規細菌処理区では処理期間が異なっても *P s t D C 3 0 0 0* の病徴抑制効果に差はほとんど認められなかった (図 5) 。

3) 植物体内における *P s t D C 3 0 0 0* の増殖を測定したところ、コントロールに比べてエンドファイト処理区で *P s t D C 3 0 0 0* の増殖が抑制された。処理したエンドファイトは $1 0 ^ 8$ C F U / m l より $1 0 ^ 7$ C F U / m l の方が病原菌増殖抑制効果が強かった (表 9) 。

【表 9】

表 9

処理区	処理期間	無処理区に対する防除価
<i>Azospirillum</i> 10 ⁷ (cfu/ml)	15 day	82%
<i>Azospirillum</i> 10 ⁸ (cfu/ml)	15 day	42%
<i>Herbaspirillum</i> 10 ⁷ (cfu/ml)	15 day	70%
<i>Herbaspirillum</i> 10 ⁸ (cfu/ml)	15 day	62%

【実施例 7】

【0012】

コマツナにおける、*A z o s p i r i l l u m* 属新規細菌の糸状菌性病害に対する病害抵抗性誘導効果

(目的)

エンドファイトに感染したコマツナを用いて、糸状菌 (*A l b u g o m a c r o s p o r a*) が引き起こす白さび病に対する病害抵抗性誘導効果について検証した。

(実験方法)

(1) エンドファイトの培養及び菌懸濁液調製方法

A z o s p i r i l l u m 属新規細菌は、500ml 三角フラスコに入れた NB 液体培地 100ml に接種し、28 度で 30 時間振とう培養した。遠心分離して菌体を回収し、10mM MgCl₂ 溶液に懸濁させた後、菌濃度を $1 \times 1 0 ^ 9$ C F U / m l になるように調製した。

(2) コマツナ幼苗の栽培とエンドファイト処理

コマツナ (品種 : 夏楽天 (タキイ種苗)) を 200 穴のセルトレイ (用土は c l a y s o i l 、量は 20mL / 穴) に 1 株ずつ植えて温室内で栽培した。播種 4 日後の苗の根本にエンドファイト菌液を終濃度が $5 \times 1 0 ^ 7$ C F U / m l になるように処理した。温室内で 2 週間栽培を継続した後、屋外の圃場に定植 (株間 5cm 、条間 15cm) した。

(3) 白さび病の発病と調査

定植後 2 週間後から白さび病の発病が観察され、定植後 6 週間後に発病程度を調査した。発病度は、甚 (5) 、多 (4) 、中 (3) 、小 (2) 、極微 (1) の 5 段階で評価し、統計処理後発病度 (%) を算出した。

(結果)

エンドファイト無処理区の発病度 21.8 に対して、*A z o s p i r i l l u m* 属新規細菌処理区では 18.8 であり有意に低下していた。したがって、*A z o s p i r i l l u m* 属新規細菌処理はコマツナに白さび病抵抗性を誘導することが示された。

10

20

30

40

【表 1 0】

表 1 0

白さび病発病度

処理区	発病度
Azospirillum 属新規細菌	18.8 a
対照	21.8 b

10

【産業上の利用可能性】

【0013】

本発明により、宿主植物に病原性糸状菌、病原性細菌又は病原性ウイルスによる病害に対する耐性を付与する能力を有する細菌、該細菌を用いた、植物における病害の防除方法、並びに、該方法により作出された病害耐性を有する植物が提供される。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> Mayekawa Mfg. Co., Ltd.

<110> RIKEN

<120> Novel bacterium and method for preventing plant disease by using the same

<130> PH-3068-PCT

10

<150> JP 2006-58483

<151> 2006-03-03

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20

<211> 1429

<212> DNA

<213> Azospirillum sp.

<400> 1

aacgctggcg gcatgcctaa cacatgcaag tcgaacgatg gcttcggcca tagtggcgca 60
 cgggtgagta acacgtggga acctgccttt cggttcggaa taacgtctgg aaacggacgc 120
 taacaccgga tacgcccttt tggggaaagt ttacgccgag agaggggccc gcgtcggatt 180
 aggtagttagt tgtggtaacg ggcaccaag ccgacgatcc gtagctggtc tgagaggatg 240
 atcagccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300
 attggacaat gggcgcaagc ctgatccagc aatgccgctg gtagtgatgaa ggccttaggg 360
 ttgtaaagct ctttcgcacg cgacgatgat gacggtagcg tgagaagaag ccccggtctaa 420
 ctctcgtgcca gcagccgagg taatacgaag ggggctagcg ttgttcggaa ttactgggag 480
 taaagggcgc gtaggcggcc ttgtcagtea gaagtgaag ccccgggctc aacctgggaa 540
 ccgcttttga tactgcaagg cttgagttcc ggagaggatg gtggaattcc cagtgtagag 600
 gtgaaattcg tagatattgg gaagaacacc ggtggcgaag gcggccatct ggacggacac 660
 tgacgctgag gcgcgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg tagtccacgc 720
 cgtaaacgat gaatgctaga cgtcgggggtg catgcactc ggtgtcggcg ctaacgcatt 780
 aagcattccg cctggggagt acggccgcaa ggttaaaact caaaggaatt gacgggggccc 840
 cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgcagaacct taccaaccct 900
 tgacatgtcc actatgggct tgagagatca ggtccttcgg ttcggccggg tggaacacag 960
 gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc 1020
 gcaacccta cgtcagttg ccatcattca gttgggcaact ctggtggaac cgccggtgac 1080
 aagccggagg aaggcgggga tgacgtcaag tcctcatggc ccttatgggt tgggctacac 1140
 acgtgctaca atggcggtga cagtgggaag cgaagtgcgc agatggagcc aatccccaaa 1200

30

40

agccgtctca gttcggatcg tactctgcaa ctcgagtgcg tgaagttgga atcgctagta 1260
 atcgcgatc agcagcccg ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgccccgtcac 1320
 accatgggag ttggctttac ccgaagacgg tgcgctaacc cgcaaggag gcagccggcc 1380
 acggtaaggt cagcgactgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgtaggg 1429

<210> 2

<211> 1477

<212> DNA

<213> *Herbaspirillum* sp.

10

<400> 2

acgctggcgg catgccttac acatgcaagt cgaacggcag cataggagct tgctcctgat 60
 ggcgagtggc gaacgggtga gtaatatatc ggaacgtgcc ctagagtggg ggataactag 120
 tcgaaagact agctaatacc gcatacgate taaggatgaa agtgggggat cgcaagacct 180
 catgctcctg gagcggccga tatctgatta gctagttggt ggggtaaaag cctaccaagg 240
 cgacgatcag tagctggtct gagaggacga ccagccacac tgggactgag acacggccca 300
 gactcctacg ggaggcagca gtggggaatt ttggacaatg ggggcaacce tgatccagca 360
 atgccgcgtg agtgaagaag gccttcgggt tgtaaagctc tttgtcagg gaagaaacgg 420
 tagtagctaa tatctattac taatgacggt acctgaagaa taagcaccgg ctaactacgt 480
 gccagcagcc gcggtaatac gtagggtgca agcgttaatc ggaattactg ggcgtaaagc 540
 gtgcgcagcc ggttgtgtaa gacagatgtg aatccccgg gctcaacctg ggaattgcat 600
 ttgtgactgc acggctagag tgtgtcagag gggggtagaa ttccacgtgt agcagtgaaa 660
 tgcgtagata tgtggaggaa taccgatggc gaaggcagcc ccctgggata aactgacgc 720
 tcatgcacga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccctaaa 780
 cgatgtctac tagttgtcgg gtcttaattg acttggtaac gcagctaacg cgtgaagtag 840
 accgctggg gagtacggtc gcaagattaa aactcaaagg aattgacggg gacccgcaca 900
 agcggatgat gatgtggatt aattcgatgc aacgcgaaaa accttaccta cccttgacat 960
 ggtcggaaac ctgaagagat ttaggagtgc tcgaaagaga accggcgcac aggtgctgca 1020
 tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacct 1080
 tgtcattagt tgctacgaaa gggcactcta atgagactgc cggtgacaaa ccggaggaag 1140
 gtggggatga cgtcaagtcc tcatggcct tatgggtagg gttcacacg tcatacaatg 1200
 gtacatacag agggccgcca acccgcgagg gggagctaat ccagaaagt gtatcgtagt 1260
 ccggattgta gtctgcaact cgactacatg aagtgggaat cgctagtaat cgcggatcag 1320
 catgtcgcgg tgaatacgtt cccgggtctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagcg 1380
 ggttttacca gaagtgggta gcctaaccgc aaggagggcg ctcaccacgg taggattcgt 1440
 gactgggggtg aagtcgtaac aaggagccgt atcgtaa 1477

20

30

40

<210> 3

<211> 659

<212> DNA

<213> Azospirillum sp.

<400> 3

ggctggatca cctcctttct aaggaagccg accttgaggg tccggcatca ggaagtcctg 60
 atggcgtttc tetgcccgcg cgggcgcac ccttctcagc gttctcgac tgctccacga 120
 tggggcacgg acgggctagt agctcagttg gttagagcgc gcgcttgata agcgtgaggt 180
 cggaggttca aatcctccct ggcgcacat gtttagcggc cgtgcgtttt gccgatcggg 240
 ggcatagctc agttgggaga gcgcctgctt tgcaagcagg aggtcgtcgg ttcgatcccg 300
 tetgcctcca ccagtttccg gaaggagtgc tgggtcgcag ggacgctgaa ccgccagct 360
 tegaggaccg ttggaaggaa ccacaacacg gcaacgtgaa cagccacgag cgcttcgcgc 420
 tcgttgctgt gtccctcagc ggacgggatc atggacaagt gaagatgaag tgcaagtgac 480
 cgaggacgct cctcggccgg caagcccaca aggcgacgct ggctgggagc agcatcgaac 540
 ggcggaaaca gctggctagc taccagctcg cgagcaggct tgttctcgcg cgtggcgcaa 600
 gcgttttctg tggagttgag atcaagcgtc tgaaggcat ctggtgatg ccttgggca 659

10

<210> 4

<211> 624

<212> DNA

<213> Herbaspirillum sp.

20

<400> 4

ggctggatca cctcctttct agagtgcgca cgaagttaag cgtccacact tctcggtgt 60
 aattcaaaga acagttattt ggtgaagcgc ggtccgtgac acaaggtcac tgactggcta 120
 ctgatactga tccaagcggg tctgtagctc agctggtagc agcaccgtgt tgataacgcg 180
 ggggtcgttg gttcgagccc aaccagacc accaaggttt cgggggttta gctcagctgg 240
 gagagcacct gctttgcaag cagggggtcg tcggttcgat cccgtcaacc tccaccaaga 300
 aatgtcaaac ctaagtcagc gtcacaaaac gcaagacgta gtgatttagg tttgatcttt 360
 tatgatcaat ggctgttttt gttctttaac aatctggaag aagtaaagat tcatttaaac 420
 gatcgccagg acttcggttc ttgcgaaagt aaaaatgggt gtgattgtat caatcaaagt 480
 attacgaagt gatcttagca attagaagac ttgctttgga atacggcaaa cgctaaaact 540
 caacgcttct ttataacgct cttgcaaaaag aggctaactg tataggaaca agcgaataac 600
 tgcacatggt ggatgccttg ggca 624

30

40

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 5			
ttgagggtcc ggcacacag	18		
<210> 6			
<211> 21			
<212> DNA			
<213> Artificial			10
<220>			
<223> primer			
<400> 6			
tcaggaagtc cgtatggcgt t	21		
<210> 7			20
<211> 19			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220>			
<223> primer			
<400> 7			
cgtccctcga caccagcac	19		30
<210> 8			
<211> 18			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220>			
<223> primer			40
<400> 8			
gtgccttgt gggcttgc	18		
<210> 9			

<211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 9
 gcggtccgtg acacaa

16

10

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 10
 caaggtcact gactggetac tg

22

20

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 11
 cactacgtct tgcgttttgt g

21

30

<210> 12
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

40

<400> 12

cgcaagaacc gaagtctct

18

【 図 1 - 1 】

図 1 - 1

```

Azospirillum      AACGCTGGCGCATGCTAACACATGCAAGTCAAC
AF521650  AGAGTTGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGCATGCTAACACATGCAAGTCAAC
      10      20      30      40      50      60
Azospirillum      40      50      60      70      80      90
AF521650  GATGGCTTCGGCCATAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCTTTTCGGTTC
      40      50      60      70      80      90
Azospirillum      100     110     120     130     140     150
AF521650  GAAATAACGCTCTGAAACCGGACGCTAACACCGGATACGCCCTTTGGGAAAGTTACGC
      100     110     120     130     140     150
Azospirillum      160     170     180     190     200     210
AF521650  GGAATAACGCTCTGAAACCGGACGCTAACACCGGATACGCCCTTTGGGAAAGTTACGC
      160     170     180     190     200     210
Azospirillum      220     230     240     250     260     270
AF521650  CGAGAGAGGGGCCCGCTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGTTAAGCGGCAACGCGCAGC
      220     230     240     250     260     270
Azospirillum      280     290     300     310     320     330
AF521650  CGAGAGAGGGGCCCGCTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGTTAAGCGGCAACGCGCAGC
      280     290     300     310     320     330
Azospirillum      340     350     360     370     380     390
AF521650  ATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACAGGGCCAGACT
      340     350     360     370     380     390
Azospirillum      400     410     420     430     440     450
AF521650  CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCC
      400     410     420     430     440     450
Azospirillum      460     470     480     490     500     510
AF521650  GCGTGAGTATGAAAGCCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCCGACGGCAGCATGATGACGGT
      460     470     480     490     500     510
Azospirillum      520     530     540
AF521650  AGCGTGAGAAGAAGCCCGCTAACTTCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGAAGGGGGCT
      520     530     540
Azospirillum      550     560     570     580     590     600
AF521650  AGCGTTGTTGGAAATTAAGCGGCAAGCGGCGTAGCGGCTTTAGTTCAGAAAGTG
      550     560     570     580     590     600

```

【 図 1 - 2 】

図 1 - 2

```

Azospirillum      520     530     540     550     560     570
AF521650  AAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACCGCTTTGATACTGCAAGGCTTGAGTCCGGAGAG
      520     530     540     550     560     570
Azospirillum      580     590     600     610     620     630
AF521650  AAGGGCGGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGG
      580     590     600     610     620     630
Azospirillum      640     650     660     670     680     690
AF521650  GATGGTGGAAATCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGC
      640     650     660     670     680     690
Azospirillum      700     710     720     730     740     750
AF521650  GAAGGGCGGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGG
      700     710     720     730     740     750
Azospirillum      760     770     780     790     800     810
AF521650  ATTAGATACCTGGTAGTCCACGGCGTAACGATGAATGCTAGACCTCGGGGTGCATGCA
      760     770     780     790     800     810
Azospirillum      820     830     840     850     860     870
AF521650  ATTAGATACCTGGTAGTCCACGGCGTAACGATGAATGCTAGACCTCGGGGTGCATGCA
      820     830     840     850     860     870
Azospirillum      880     890     900     910     920     930
AF521650  CTTGGGTGCGCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAA
      880     890     900     910     920     930
Azospirillum      940     950     960     970     980     990
AF521650  CTTGGGTGCGCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAA
      940     950     960     970     980     990
Azospirillum      1000    1010    1020    1030    1040    1050
AF521650  AACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGC
      1000    1010    1020    1030    1040    1050
Azospirillum      1060    1070    1080    1090    1100    1110
AF521650  AACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGC
      1060    1070    1080    1090    1100    1110
Azospirillum      1120    1130    1140
AF521650  AAGCGGCAGAACCTTACCAACCTTGACATGTCCACTATGGGCTTGAGAGTACAGGTCT
      1120    1130    1140
Azospirillum      1150    1160    1170    1180    1190    1200
AF521650  AAGCGGCAGAACCTTACCAACCTTGACATGTCCACTATGGGCTTGAGAGTACAGGTCT
      1150    1160    1170    1180    1190    1200
Azospirillum      1210    1220    1230    1240    1250    1260
AF521650  TCGGTTGCGCGGGTGGAAACACAGGTGCTGCATGGCTGCTCAGCTCGTGTGAGAT
      1210    1220    1230    1240    1250    1260
Azospirillum      1270    1280    1290    1300    1310    1320
AF521650  TCGGTTGCGCGGGTGGAAACACAGGTGCTGCATGGCTGCTCAGCTCGTGTGAGAT
      1270    1280    1290    1300    1310    1320
Azospirillum      1330    1340    1350    1360    1370    1380
AF521650  GTGGGTTAAGTCCCGCAACGCGGTAACACCGGTAACCGCTCACTGTCATTCAGTGGG
      1330    1340    1350    1360    1370    1380
Azospirillum      1390    1400    1410    1420    1430    1440
AF521650  GTGGGTTAAGTCCCGCAACGCGGTAACACCGGTAACCGCTCACTGTCATTCAGTGGG
      1390    1400    1410    1420    1430    1440
Azospirillum      1450    1460    1470    1480    1490    1500
AF521650  CACTCTGGTGAACCGCGGTGACAAGCGGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAGTCTCA
      1450    1460    1470    1480    1490    1500
Azospirillum      1510    1520    1530    1540
AF521650  CACTCTGGTGAACCGCGGTGACAAGCGGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAGTCTCA
      1510    1520    1530    1540

```

【 図 1 - 3 】

図 1 - 3

Azospirillum 1120 1130 1140 1150 1160 1170
 TGCCCTATGGGTTGGGCTACACAGTCTACAATGGCGGTGACAGTGGAGCGAAGT
 AF521650 TGCCCTATGGGTTGGGCTACACAGTCTACAATGGCGGTGACAGTGGAGCGAAGT
 1150 1160 1170 1180 1190 1200

Azospirillum 1180 1190 1200 1210 1220 1230
 CGGAGATGGAGCAATCCCAAAGCCGCTCAGTTCGGATCTGCAACTCGAG
 AF521650 CGGAGATGGAGCAATCCCAAAGCCGCTCAGTTCGGATCTGCAACTCGAG
 1210 1220 1230 1240 1250 1260

Azospirillum 1240 1250 1260 1270 1280 1290
 TGCGTGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGATCAGCAGCGCGGTGAATACGTTCCCG
 AF521650 TGCGTGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGATCAGCAGCGCGGTGAATACGTTCCCG
 1270 1280 1290 1300 1310 1320

Azospirillum 1300 1310 1320 1330 1340 1350
 GGCTTGTACACACCGCCGCTCACACCATGGGAGTTGGCTTTACCCGAAGACGGTGGCGT
 AF521650 GGCTTGTACACACCGCCGCTCACACCATGGGAGTTGGCTTTACCCGAAGACGGTGGCGT
 1330 1340 1350 1360 1370 1380

Azospirillum 1360 1370 1380 1390 1400 1410
 AACCCGCAAGGAGGACCGCCAGGTAAGTACAGGACTGGGTTGAAGTCTGTAACAA
 AF521650 AACCCGCAAGGAGGACCGCCAGGTAAGTACAGGACTGGGTTGAAGTCTGTAACAA
 1390 1400 1410 1420 1430 1440

Azospirillum 1420
 GGTAGCCGTAGGG
 AF521650 GGTAGCCGTAGGGAACTGCGGCTGGATCACCTCT
 1450 1460 1470

【 図 2 - 1 】

図 2 - 1

Herbaspirillum 10 20 30 40 50
 ACGTGGCGGATGCCTACACATGCAAGTCAAGCGCAGCATAGGAGCTTGCTC
 AF137508 ATTGAACGCTGGCGGATGCCTACACATGCAAGTCAAGCGCAGCATAGGAGCTTGCTC
 10 20 30 40 50 60

Herbaspirillum 60 70 80 90 100 110
 CTGATGGCGAGTGGCGAAGCGGTGAGTAATATATCGAAAGTGCCTAGAGTGGGGATA
 AF137508 CTGATGGCGAGTGGCGAAGCGGTGAGTAATATATCGAAAGTGCCTAGAGTGGGGATA
 70 80 90 100 110 120

Herbaspirillum 120 130 140 150 160 170
 ACTAGTGGAAAGCTAGCTAATACCGCATAGGATTAAGGATGAAAGTGGGGATCGCAA
 AF137508 ACTAGTGGAAAGCTAGCTAATACCGCATAGGATTAAGGATGAAAGTGGGGATCGCAA
 130 140 150 160 170 180

Herbaspirillum 180 190 200 210 220 230
 GACCTCATGCTCTGGAGCGCGATATCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGCCCTAC
 AF137508 GACCTCATGCTCTGGAGCGCGATATCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGCCCTAC
 190 200 210 220 230 240

Herbaspirillum 240 250 260 270 280 290
 CAAGCGGACGATCAGTAGCTGGTGTGAGAGGACGACAGCCACACTGGGACTGAGACAG
 AF137508 CAAGCGGACGATCAGTAGCTGGTGTGAGAGGACGACAGCCACACTGGGACTGAGACAG
 250 260 270 280 290 300

Herbaspirillum 300 310 320 330 340 350
 GCCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGAAATTTGGACAATGGGGCAACCTGATC
 AF137508 GCCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGAAATTTGGACAATGGGGCAACCTGATC
 310 320 330 340 350 360

Herbaspirillum 360 370 380 390 400 410
 CAGCAATGCCGCGTGAAGAAAGCGCTTCGGTTGTAAGCTCTTTTGTACGGGAAGA
 AF137508 CAGCAATGCCGCGTGAAGAAAGCGCTTCGGTTGTAAGCTCTTTTGTACGGGAAGA
 370 380 390 400 410 420

Herbaspirillum 420 430 440 450 460 470
 AACGGTAGTACTAATATCTAATGACGCTACCTGAAGAATAAGCAGCGCTAAC
 AF137508 AACGGTAGTACTAATATCTAATGACGCTACCTGAAGAATAAGCAGCGCTAAC
 430 440 450 460 470 480

Herbaspirillum 480 490 500 510 520 530
 TACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTCGACGGGTTAATCGGAATTAATCGGCT
 AF137508 TACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTCGACGGGTTAATCGGAATTAATCGGCT
 490 500 510 520 530 540

【 図 2 - 2 】

図 2 - 2

Herbaspirillum 540 550 560 570 580 590
 AAAGCGTCCGAGCGGTTGTGTAAGACAGATGTGAAATCCCGGCTCAACCTGGGAAT
 AF137508 AAAGCGTCCGAGCGGTTGTGTAAGACAGATGTGAAATCCCGGCTCAACCTGGGAAT
 550 560 570 580 590 600

Herbaspirillum 600 610 620 630 640 650
 TGCAATTGTACTCCAGCGCTAGAGTGTGTACAGAGGGGGTGAAGATCCACGTTAGCAG
 AF137508 TGCAATTGTACTCCAGCGCTAGAGTGTGTACAGAGGGGGTGAAGATCCACGTTAGCAG
 610 620 630 640 650 660

Herbaspirillum 660 670 680 690 700 710
 TGAAATGCGTAGATATGTGGAAGAAACCGATGGCGAAGGACGCCCTGGGATAACACT
 AF137508 TGAAATGCGTAGATATGTGGAAGAAACCGATGGCGAAGGACGCCCTGGGATAACACT
 670 680 690 700 710 720

Herbaspirillum 720 730 740 750 760 770
 GACCGTATGCACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATAGATAACCTGGTAGTCCACGCC
 AF137508 GACCGTATGCACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATAGATAACCTGGTAGTCCACGCC
 730 740 750 760 770 780

Herbaspirillum 780 790 800 810 820 830
 CTAAAGCATGTCTACTAGTTGGGCTCTTAATGACTTGGTAACGCGCTAACCGGTGA
 AF137508 CTAAAGCATGTCTACTAGTTGGGCTCTTAATGACTTGGTAACGCGCTAACCGGTGA
 790 800 810 820 830 840

Herbaspirillum 840 850 860 870 880 890
 AGTAGACCGCTGGGAGTACGTCGCAAGATTAACCTCAAGGAATGACGGGGACCC
 AF137508 AGTAGACCGCTGGGAGTACGTCGCAAGATTAACCTCAAGGAATGACGGGGACCC
 850 860 870 880 890 900

Herbaspirillum 900 910 920 930 940 950
 GCACAAGCGGTGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACTTACCTACCCCT
 AF137508 GCACAAGCGGTGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACTTACCTACCCCT
 910 920 930 940 950 960

Herbaspirillum 960 970 980 990 1000 1010
 GACATGGTGGAACTCCTGAAGGATTTGGGAGTCTCGAAGAGAAACCGCGCAGGCTG
 AF137508 GACATGGTGGAACTCCTGAAGGATTTGGGAGTCTCGAAGAGAAACCGCGCAGGCTG
 970 980 990 1000 1010 1020

Herbaspirillum 1020 1030 1040 1050 1060 1070
 CTGCATGGCTGTGCTGAGCTGGTGTGCGTGAAGTGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
 AF137508 CTGCATGGCTGTGCTGAGCTGGTGTGCGTGAAGTGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
 1030 1040 1050 1060 1070 1080

Herbaspirillum 1080 1090 1100 1110 1120 1130
 ACCCTTGTCTTAGTTGCTACGAAAGGCACTTAATGAGACTGCCGGTACAAACCGGA
 AF137508 ACCCTTGTCTTAGTTGCTACGAAAGGCACTTAATGAGACTGCCGGTACAAACCGGA
 1090 1100 1110 1120 1130 1140

【 図 2 - 3 】

図 2 - 3

Herbaspirillum 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 GGAAGTGGGGATGACCTCAAGTCTCATGGCCCTATTGGGTAGGGCTTCACACCTGATA
 AF137508 GGAAGTGGGGATGACCTCAAGTCTCATGGCCCTATTGGGTAGGGCTTCACACCTGATA
 1150 1160 1170 1180 1190 1200

Herbaspirillum 1200 1210 1220 1230 1240 1250
 CAATGGTACATACAGAGGGCGCAACCGCGAGGGGAGCTAATCCGAAAGTGTATC
 AF137508 CAATGGTACATACAGAGGGCGCAACCGCGAGGGGAGCTAATCCGAAAGTGTATC
 1210 1220 1230 1240 1250 1260

Herbaspirillum 1260 1270 1280 1290 1300 1310
 GTAGTCCGGATTGAGTCTGCAACTCGACTACAGTGAAGTGGAAATCGCTAATCGCGG
 AF137508 GTAGTCCGGATTGAGTCTGCAACTCGACTACAGTGAAGTGGAAATCGCTAATCGCGG
 1270 1280 1290 1300 1310 1320

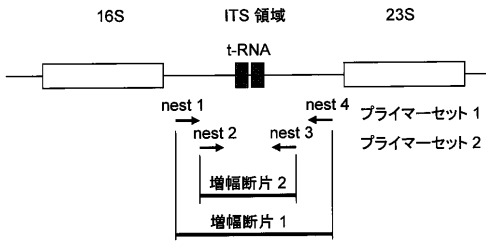
Herbaspirillum 1320 1330 1340 1350 1360 1370
 ATCAGCATGTGCGGTTGAATACGTTCCCGGGCTTTGTACACACCGCCGCTACACCAATGG
 AF137508 ATCAGCATGTGCGGTTGAATACGTTCCCGGGCTTTGTACACACCGCCGCTACACCAATGG
 1330 1340 1350 1360 1370 1380

Herbaspirillum 1380 1390 1400 1410 1420 1430
 GAGCGGGTTTACCAGAAGTGGTAGCTAACCGCAAGGAGGGCGCTCACCAGGTAGGA
 AF137508 GAGCGGGTTTACCAGAAGTGGTAGCTAACCGCAAGGAGGGCGCTCACCAGGTAGGA
 1390 1400 1410 1420 1430 1440

Herbaspirillum 1440 1450 1460 1470
 TTCGTGACTGGGGTGAAGTCTGTAACAAGG-AGCCGATCGGAA
 AF137508 TTCGTGACTGGGGTGAAGTCTGTAACAAGGAGCCGATCGGAA
 1450 1460 1470 1480

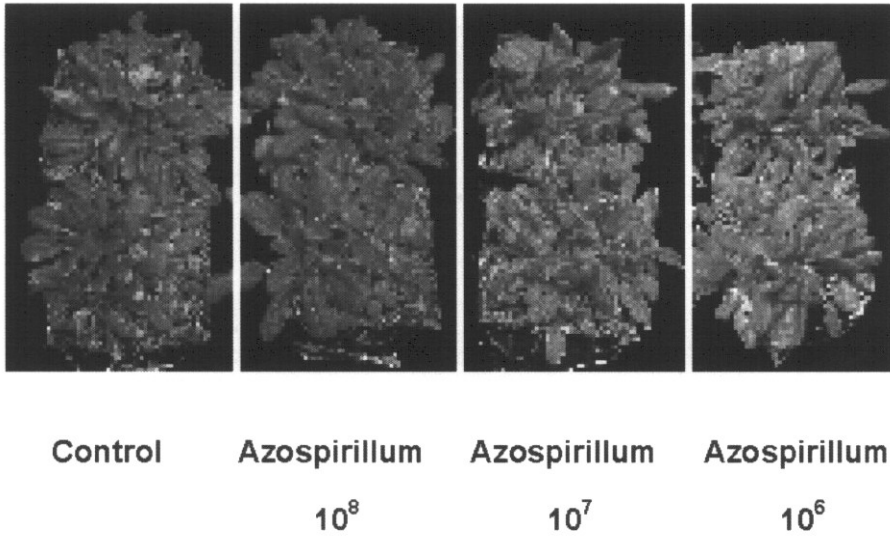
【 図 3 】

図 3



【 図 4 】

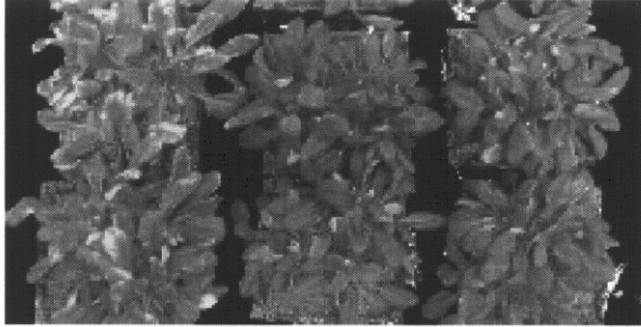
図 4



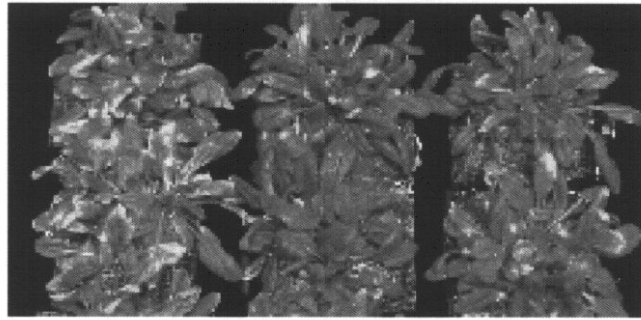
【 图 5 】

图 5

处理 10 日



处理 15 日



Control Azospirillum Herbaspirillum

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/054624
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N1/20(2006.01)i, A01G7/00(2006.01)i, A01M29/02(2006.01)i, A01N63/00(2006.01)i, A01P3/00(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n 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) C12N1/20, A01G7/00, A01M29/02, A01N63/00, A01P3/00, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-300805 A (Shadan Hojin Norin Suisan Sentan Gijutsu Sangyo Shinko Senta), 21 October, 2003 (21.10.03), & US 2003/0195117 A1	1-9
A	JP 2002-531117 A (Tatko Biotech, Inc.), 24 September, 2002 (24.09.02), & US 1999/5951978 A1 & EP 1135462 A1 & WO 2000/034440 A1	1-9
A	JP 2003-274779 A (Shadan Hojin Norin Suisan Sentan Gijutsu Sangyo Shinko Senta), 30 September, 2003 (30.09.03), & US 2003/0135898 A1	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 application or patent 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 28 March, 2007 (28.03.07)		Date of mailing of the international search report 10 April, 2007 (10.04.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/054624

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 1998/0042834 A1 (Ibaraki-ken), 01 October, 1998 (01.10.98), & EP 0919615 A1 & US 6306390 B1	1-9
A	JP 2002-223747 A (Kyushu TLO Co., Ltd.), 13 August, 2002 (13.08.02), (Family: none)	1-9
A	JP 05-317092 A (Kabushiki Kaisha Japan Turfgrass), 03 December, 1993 (03.12.93), (Family: none)	1-9

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2007/054624									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N1/20(2006.01)i, A01G7/00(2006.01)i, A01M29/02(2006.01)i, A01N63/00(2006.01)i, A01P3/00(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n											
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. C12N1/20, A01G7/00, A01M29/02, A01N63/00, A01P3/00, C12N15/09											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2007年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2007年	日本国実用新案登録公報	1996-2007年	日本国登録実用新案公報	1994-2007年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2007年										
日本国実用新案登録公報	1996-2007年										
日本国登録実用新案公報	1994-2007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/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)											
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	JP 2003-300805 A(社団法人農林水産先端技術産業振興センター)2003.10.21 & US 2003/0195117 A1	1-9									
A	JP 2002-531117 A(タットコ バイオテック インコーポレイテッド)2002.09.24 & US 1999/5951978 A1 & EP 1135462 A1 & WO 2000/034440 A1	1-9									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 28.03.2007		国際調査報告の発送日 10.04.2007									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 長井 啓子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 9123								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 5 4 6 2 4
C (続き) . 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	JP 2003-274779 A(社団法人農林水産先端技術産業振興センター)2003.09.30 & US 2003/0135898 A1	1-9
A	WO 1998/0042834 A1(茨城県)1998.10.01 & EP 0919615 A1 & US 6306390 B1	1-9
A	JP 2002-223747 A(株式会社産学連携機構九州)2002.08.13 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 05-317092 A(株式会社ジャパン・ターフグラス)1993.12.03 (ファミリーなし)	1-9

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
A 0 1 H 5/00 Z

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100130443

弁理士 遠藤 真治

(72) 発明者 伊沢 剛

東京都江東区牡丹三丁目 1 4 番 1 5 号 株式会社前川製作所内

(72) 発明者 安田 美智子

東京都江東区牡丹三丁目 1 4 番 1 5 号 株式会社前川製作所内

(72) 発明者 篠崎 聡

東京都江東区牡丹三丁目 1 4 番 1 5 号 株式会社前川製作所内

(72) 発明者 仲下 英雄

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内

(72) 発明者 工藤 俊章

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内

F ターム (参考) 2B030 AA02 AB03 AD05 CA28 CB02

4B065 AA01X AC20 BA22 CA47 CA53

4H011 AA01 AA04 BA01 BB21 DF05 DG05

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。