

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5120849号

(P5120849)

(45) 発行日 平成25年1月16日(2013.1.16)

(24) 登録日 平成24年11月2日(2012.11.2)

(51) Int.Cl.

F 1

<b>C 1 2 N</b>	<b>1/20</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>1/20</b>	<b>Z N A A</b>
<b>A O 1 H</b>	<b>17/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A O 1 H</b>	<b>17/00</b>	
<b>A O 1 N</b>	<b>63/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>1/20</b>	<b>E</b>
<b>A O 1 P</b>	<b>3/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A O 1 N</b>	<b>63/00</b>	<b>F</b>
<b>A O 1 H</b>	<b>5/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A O 1 P</b>	<b>3/00</b>	

請求項の数 7 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-502889 (P2008-502889)  
 (86) (22) 出願日 平成19年3月2日(2007.3.2)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2007/054624  
 (87) 国際公開番号 W02007/100162  
 (87) 国際公開日 平成19年9月7日(2007.9.7)  
 審査請求日 平成22年1月5日(2010.1.5)  
 (31) 優先権主張番号 特願2006-58483 (P2006-58483)  
 (32) 優先日 平成18年3月3日(2006.3.3)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-193  
 微生物の受託番号 NPMD NITE BP-194

(73) 特許権者 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  
 (73) 特許権者 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  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100096183  
 弁理士 石井 貞次  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (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) 【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、又は病原性細菌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、又は病原性細菌による病害の防除方法であって、

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、防除方法。

【請求項 2】

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記載の方法。

【請求項 3】

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又は2記載の方法。

【請求項 4】

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、又は病原性細菌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、又は病原性細菌による病害の防除剤であって、

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

10

20

なくとも1種である、防除剤。

【請求項5】

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、又は病原性細菌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6】

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、又は病原性細菌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7】

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、又は病原性細菌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、又は病原性細菌による病害に対する耐性を有する植物。

【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。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、それに適合した病虫害防除技術（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

10

20

30

40

50

)、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】

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】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 5 】

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、バミューダグラス、ウィーピンググラス、センチピードグラス、カーペットグラス、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。

10

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：*Cochliobolus 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。

20

30

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。

40

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

50

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。

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。

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

10

20

30

40

50

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。

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。

10

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。

#### 【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 3 cm 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から、Nutrient Agar 培地に植菌して、シングルコロニーを単離した。

20

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 1)。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。

30

当該菌株は *Azospirillum* sp. Arm2-2 株 (Accession No. AF521650) と、98.5% 相同であった (図 1)。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	
$\beta$ -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	
$\alpha$ -メチル-D-マンノース	
$\alpha$ -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 3 cm 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 rubrisbalbicans (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 rubrisbalbicans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' -	TTGAGGGTCCGGCATCAG	-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' -	CAAGGTCACTGACTGGCTACTG	-3'	63.76	22
	nest 3	5' -	CACTACGTCTTGCGTTTGTG	-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週間間隔で免役した。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、無接种植物の破碎液、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* 属新規細菌接种植物サンプルでは無接种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  $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$  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  $10^5 \sim 10^9 \text{ CFU/ml}$  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  $0.5 \text{ mg/pot}$  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。

(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 <sup>8</sup> (cfu/ml) 10 day	0.5%	0%
	0.75%	31%
	1.0%	33%
Herbaspirillum 10 <sup>8</sup> (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)

20

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。

(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(5×5×5cm)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10<sup>6</sup>~10<sup>8</sup> 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 (1×10<sup>7</sup> 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10<sup>7</sup> 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 (1×10<sup>7</sup> 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10<sup>7</sup>又は10<sup>8</sup> CFU/mlになるように灌注処理した。処理後15日後にPst DC3000 (2×10<sup>5</sup> CFU/ml) を接種し、3日後の葉を回収し、10mM MgCl<sub>2</sub>中で磨砕した。磨砕液を三段階に希釈し、NB平板培地(rifampicin 50mg/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10<sup>6</sup>から10<sup>8</sup> 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  $10^8$  CFU/ml より  $10^7$  CFU/ml の方が病原菌増殖抑制効果が強かった ( 表 9 ) 。

10

【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 <sup>7</sup> (cfu/ml)	15 day	82%
<i>Azospirillum</i> 10 <sup>8</sup> (cfu/ml)	15 day	42%
<i>Herbaspirillum</i> 10 <sup>7</sup> (cfu/ml)	15 day	70%
<i>Herbaspirillum</i> 10 <sup>8</sup> (cfu/ml)	15 day	62%

20

【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。

30

( 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 MgCl<sub>2</sub> 溶液に懸濁させた後、菌濃度を  $1 \times 10^9$  CFU/ml 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 clay soil、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  $5 \times 10^7$  CFU/ml 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。

40

( 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。

## 【表 10】

表 10

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

<211> 1429

20

<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  
 agtagttgg tgtggtaacg gcgaccaag ccgacgatcc gtagctggtc tgagaggatg 240  
 atcagccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300  
 attggacaat gggcgcaagc ctgatccagc aatgccgcgt gagtgatgaa ggccttaggg 360  
 ttgtaaagct ctttcgcacg cgacgatgat gacggtagcg tgagaagaag ccccggctaa 420  
 ctctgtgcca gcagccgcg taatacgaag ggggctagcg ttgttcggaa ttactgggcg 480  
 taaagggcgc gtaggcggcc ttgtcagtca 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 cgtcggggtg catgcacttc ggtgtcgcgg ctaacgcatt 780  
 aagcattccg cctggggagt acggccgcaa ggttaaaact caaaggaatt gacgggggccc 840  
 cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgcagaacct taccaacct 900  
 tgacatgtcc actatgggct tgagagatca ggtccttcgg ttcggccggg tggaacacag 960  
 gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc 1020  
 gcaaccctta cgtcagttg ccatcattca gttgggcaact ctggtggaac cgccggtgac 1080  
 aagccggagg aaggcgggga tgacgtcaag tcctcatggc cttatgggt tgggctacac 1140  
 acgtgctaca atggcgggta cagtgggaag cgaagtcgcg agatggagcc aatccccaaa 1200

30

40

agccgtctca gttcggatcg tactctgcaa ctcgagtgcg tgaagttgga atcgctagta 1260  
 atcgcggatc agcacgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgccccgcac 1320  
 accatgggag ttggctttac ccgaagacgg tgcgctaacc cgcaagggag 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 gcatacgatc taaggatgaa agtgggggat cgcaagacct 180  
 catgctcctg gagcggccga tatctgatta gctagttggt ggggtaaaag cctaccaagg 240  
 cgacgatcag tagctggtct gagaggacga ccagccacac tgggactgag acacggccca 300  
 gactcctacg ggaggcagca gtggggaatt ttggacaatg ggggcaacc tgatccagca 360  
 atgccgcgtg agtgaagaag gccttcgggt tgtaaagctc ttttgtcagg gaagaaacgg 420  
 tagtagctaa tatctattac taatgacggt acctgaagaa taagcaccgg ctaactacgt 480  
 gccagcagcc gcggtaatac gtagggtgca agcgttaatc ggaattactg ggcgtaaagc 540  
 gtgcgcagge ggttgtgtaa gacagatgtg aatccccgg gctcaacctg ggaattgcat 600  
 ttgtgactgc acggctagag tgtgtcagag ggggtagaa ttccacgtgt agcagtgaaa 660  
 tgcgtagata tgtggaggaa taccgatggc gaaggcagcc ccctgggata aactgacgc 720  
 tcatgcacga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccctaaa 780  
 cgatgtctac tagttgtcgg gtcttaattg acttggtaac gcagctaacg cgtgaagtag 840  
 accgcctggg gactacggtc gcaagattaa aactcaaagg aattgacggg gaccgcaca 900  
 agcggtgat gatgtggatt aattcgatgc aacgcgaaaa accttaccta cccttgacat 960  
 ggtcggaaatc ctgaagagat ttaggagtgc tcgaaagaga accggcgcac aggtgctgca 1020  
 tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct 1080  
 tgtcattagt tgctacgaaa gggcactcta atgagactgc cggtgacaaa ccggaggaag 1140  
 gtggggatga cgtcaagtcc tcatggccct tatggtagg gttcacacg tcatacaatg 1200  
 gtacatacag agggccgcca acccgcgagg gggagctaat ccagaaaagt gtatcgtagt 1260  
 ccgattgta gtctgcaact cgactacatg aagttggaat cgctagtaat cgcgatcag 1320  
 catgtcgcgg tgaatacgtt cccgggtctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagcg 1380  
 ggttttacca gaagtgggta gcctaaccgc aaggagggag 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 ggaagtccgt 60  
 atggcgtttc tctgcccgg cggcgccatc ccttctcacg gttctcgacg tgctccacga 120  
 tggggcacgg acgggctagt agctcagttg gttagagcgc gcgcttgata agcgtgaggt 180  
 cggaggttca aatcctccct ggcgcacat gtttagcggg cgtgcgtttt gccgatcggg 240  
 ggcatagctc agttgggaga gcgcctgctt tgcaagcagg aggtcgtcgg ttcgatcccg 300  
 tctgcctcca ccagtttccg gaaggagtgc tgggtgctgag ggacgctgaa ccgccagct 360  
 tcgaggaccg ttggaaggaa ccacaacacg gcaacgtgaa cagccacgag cgcttcgcgc 420  
 tcgttgctgt gtcctcacg ggacgggatc atggacaagt gaagatgaag tgcaagtgac 480  
 cgaggacgct cctcggccgg caagcccaca aggcgacgct ggctgggagc agcatcgaac 540  
 ggcggaaaca gctggctagc taccagctcg cgagcaggct tgttcctgcg cgtggcgcaa 600  
 gcgttttcgt tggagttgag atcaagcgtc tgaaggcat ctggtgatg ccttgggca 659

10

<210> 4

<211> 624

<212> DNA

<213> Herbaspirillum sp.

20

<400> 4

ggctggatca cctcctttct agagtgcgca cgaagttaag cgtccacact tctcggctgt 60  
 aatcaaaga acagttattt ggtgaagcgc ggtccgtgac acaaggcac tgactggcta 120  
 ctgatactga tccaagcggg tctgtagctc agctggttag agcaccgtgt tgataacggg 180  
 ggggtcgttg gttcgagccc aaccagacc accaaggttt cgggggttta gctcagctgg 240  
 gagagcact gctttgcaag cagggggtcg tcggttcgat cccgtcaacc tccaccaaga 300  
 aatgtcaaac ctaagtcagc gtcacaaaac gcaagacgta gtgatttagg tttgatcttt 360  
 tatgatcaat ggtgtttttt gttctttaac aatctggaag aagtaaagat tcatttaaac 420  
 gatcgcagg acttcgggtc ttgcgaaagt aaaaatgggt gtgattgtat caatcaaagt 480  
 attacgaagt gatcttagca attagaagac ttgctttgga atacggcaaa cgctaaaact 540  
 caacgcttct ttataacgct cttgcaaaag aggctaactg tataggaaca agcgaataac 600  
 tgacatggt ggatgccttg ggca 624

30

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

40

<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			
<211> 19			20
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220>			
<223> primer			
<400> 7			
cgtccctoga caccagcac		19	30
<210> 8			
<211> 18			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220>			
<223> primer			40
<400> 8			
gtcgccttgt 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>		20
<223> primer		
<400> 10		
caaggtcact gactggctac tg	22	
<210> 11		
<211> 21		
<212> DNA		30
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 11		
cactacgtct tgcgttttgt g	21	
		40
<210> 12		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		

<400> 12

cgcaagaacc gaagtctct

18

【 図 1 - 1 】

図 1 - 1

```

Azospirillum          10      20      30
                      AACGCTGGGGGATGCCTAACACATGCAAGTGAAC
AF521650             AGAGTTTGATCATGGCTCAGAACGACGCTGGCGGATGCCCTAACACATGCAAGTGAAC
                      10      20      30      40      50      60

Azospirillum          40      50      60      70      80      90
                      GATGGCTTCGGCCATAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTTGGGAACTGCCTTTCGGTTC
AF521650             GAAGGCTTCGGCTTACTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTTGGGAACTGCCTTTCGGTTC
                      70      80      90      100     110     120

Azospirillum          100     110     120     130     140     150
                      GGAATAAAGTCTGGAAACGGACGCTAACACCGGATACGCCCTTTGGGAAAGTTTACGC
AF521650             GGAATAAAGTCTGGAAACGGACGCTAACACCGGATACGCCCTTTGGGAAAGTTTACGC
                      130     140     150     160     170     180

Azospirillum          160     170     180     190     200     210
                      CGAGAGAGGGGCCCGCTCGGATTAGTAGTTGGTGGTAACGGGCACCAAGCCGAGG
AF521650             CGAGAGAGGGGCCCGCTCGGATTAGTAGTTGGTGGTAACGGGCCTCCAAGCCGAGG
                      190     200     210     220     230     240

Azospirillum          220     230     240     250     260     270
                      ATCCGTAGTCTGCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACGCCAGCTC
AF521650             ATCCGTAGTCTGCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACGCCAGCTC
                      250     260     270     280     290     300

Azospirillum          280     290     300     310     320     330
                      CTACGGAGGCAGCAGTGGGAAATATTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCC
AF521650             CTACGGAGGCAGCAGTGGGAAATATTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCC
                      310     320     330     340     350     360

Azospirillum          340     350     360     370     380     390
                      GCGTGAGTGATGAAGCCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCCACGGCAGCATGATGACGGT
AF521650             GCGTGAGTGATGAAGCCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCCACGGCAGCATGATGACGGT
                      370     380     390     400     410     420

Azospirillum          400     410     420     430     440     450
                      AGCGTGAGAAGAAGCCCGGCTAACCTCGTGCCAGCAGCGGGTAATACGAAGGGGGCT
AF521650             AGCGTGAGAAGAAGCCCGGCTAACCTCGTGCCAGCAGCGGGTAATACGAAGGGGGCT
                      430     440     450     460     470     480

Azospirillum          460     470     480     490     500     510
                      AGCGTTGTTGGGAATTAAGGGCGTAAAGGGCGGTAGCGGGCTTTGTCAGTCAGAAGTG
AF521650             AGCGTTGTTGGGAATTAAGGGCGTAAAGGGCGGTAGCGGGCTTTGTCAGTCAGAAGTG
                      490     500     510     520     530     540

```

【 図 1 - 2 】

図 1 - 2

```

Azospirillum          520     530     540     550     560     570
                      AAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACCGCTTTGATACTGCAAGCTTGAGTCCGGAGAG
AF521650             AAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATAGCTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTCCGGAGAG
                      550     560     570     580     590     600

Azospirillum          580     590     600     610     620     630
                      GATGGTGGAAATCCAGGTGAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACCCGGTGGC
AF521650             GATGGTGGAAATCCAGGTGAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACCCGGTGGC
                      610     620     630     640     650     660

Azospirillum          640     650     660     670     680     690
                      GAAGGGGCCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGG
AF521650             GAAGGGGCCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGG
                      670     680     690     700     710     720

Azospirillum          700     710     720     730     740     750
                      ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGGCGTAAACGATGAATGCTAGACGCTGGGGTGCATGCA
AF521650             ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGGCGTAAACGATGAATGCTAGACGCTGGGGTGCATGCA
                      730     740     750     760     770     780

Azospirillum          760     770     780     790     800     810
                      CTTGGTGTGCGCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA
AF521650             CTTGGTGTGCGCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA
                      790     800     810     820     830     840

Azospirillum          820     830     840     850     860     870
                      AACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGC
AF521650             AACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGC
                      850     860     870     880     890     900

Azospirillum          880     890     900     910     920     930
                      AACGGCAGAACCTTACCACCTTGACATGTCCACTATGGGCTTGAGAGTACAGGTCCT
AF521650             AACGGCAGAACCTTACCACCTTGACATGTCCACTATGGGCTTGAGAGTACAGGTCCT
                      910     920     930     940     950     960

Azospirillum          940     950     960     970     980     990
                      TCGGTTGCGCGGGTGGAAACACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTGAGTGGTGGAGAT
AF521650             TCGGTTGCGCGGGTGGAAACACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTGAGTGGTGGAGAT
                      970     980     990     1000    1010    1020

Azospirillum          1000    1010    1020    1030    1040    1050
                      GTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCACTTGGCATCATTCAAGTGGG
AF521650             GTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCACTTGGCATCATTCAAGTGGG
                      1030    1040    1050    1060    1070    1080

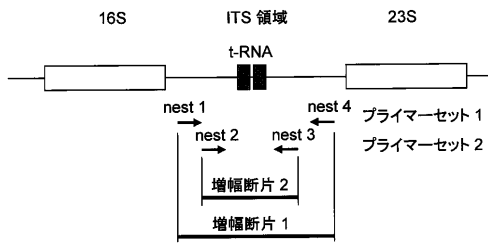
Azospirillum          1060    1070    1080    1090    1100    1110
                      CACTCTGGTGAACCGCGGTGACAAGCGGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAGTCTCTCA
AF521650             CACTCTGGTGAACCGCGGTGACAAGCGGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAGTCTCTCA
                      1090    1100    1110    1120    1130    1140

```



【 図 3 】

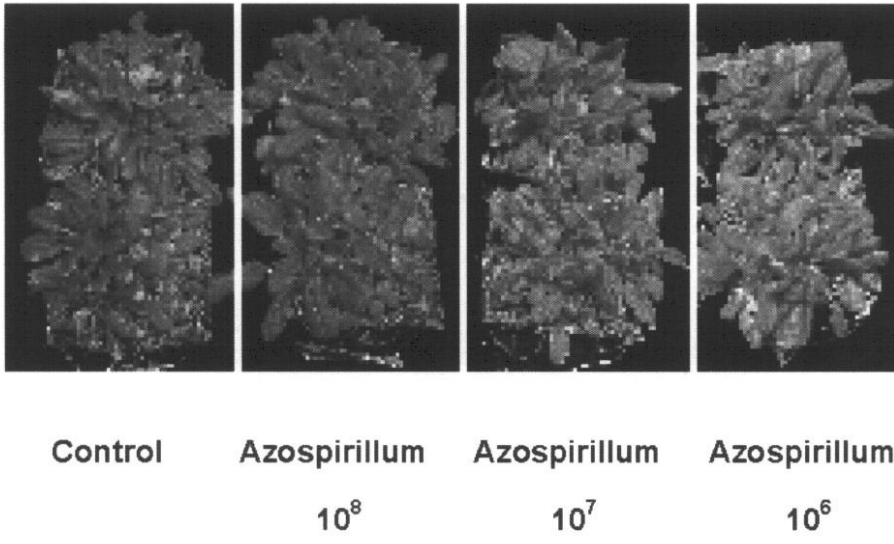
図 3





【 図 4 】

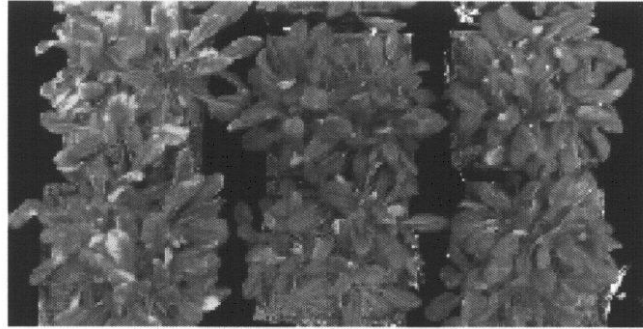
図 4



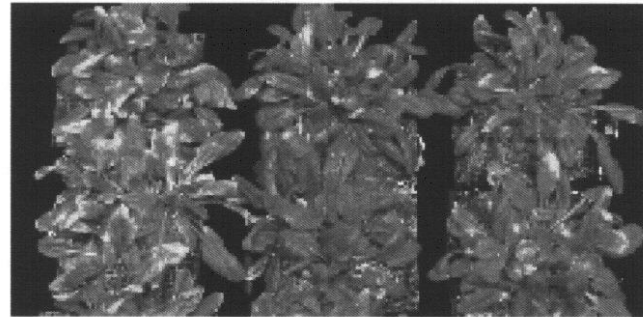
【 図 5 】

図 5

処理 10 日



処理 15 日



Control    Azospirillum    Herbaspirillum

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 0 1 H 5/00 Z

- (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14番15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14番15号 株式会社前川製作所内
- (72)発明者 篠崎 聰  
東京都江東区牡丹三丁目14番15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

審査官 太田 雄三

- (56)参考文献 特開2003-300805(JP,A)  
特表2002-531117(JP,A)  
特開2003-274779(JP,A)  
特開2002-223747(JP,A)  
特開平5-317092(JP,A)  
特開2006-58483(JP,A)  
国際公開第98/42834(WO,A1)  
植物微生物研究会 第14回研究交流会講演要旨集, 2004年 9月 6日, p. 48, 49

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N 1/20  
A01H 5/00  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
PubMed  
Cinii