

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4417998号  
(P4417998)

(45) 発行日 平成22年2月17日(2010.2.17)

(24) 登録日 平成21年12月4日(2009.12.4)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 Z N A A
A O 1 N 63/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 E
A O 1 N 63/02 (2006.01)	A O 1 N 63/00 F
A O 1 P 3/00 (2006.01)	A O 1 N 63/02 E
A O 1 G 7/00 (2006.01)	A O 1 P 3/00

請求項の数 6 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-504884 (P2007-504884)	(73) 特許権者	591199338
(86) (22) 出願日	平成17年3月23日 (2005.3.23)		コリア リサーチ インスティテュート
(65) 公表番号	特表2007-530032 (P2007-530032A)		オブ ケミカル テクノロジー
(43) 公表日	平成19年11月1日 (2007.11.1)		KOREA RESEARCH INST
(86) 国際出願番号	PCT/KR2005/000842		ITUTE OF CHEMICAL T
(87) 国際公開番号	W02005/090553		ECHNOLOGY
(87) 国際公開日	平成17年9月29日 (2005.9.29)		大韓民国、ダエジオンーシ、ユセーグ、
審査請求日	平成18年10月24日 (2006.10.24)		ジャンードン、100
(31) 優先権主張番号	10-2004-0020074	(74) 代理人	100058479
(32) 優先日	平成16年3月24日 (2004.3.24)		弁理士 鈴江 武彦
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(74) 代理人	100091351
微生物の受託番号	KCTC 10578BP		弁理士 河野 哲
		(74) 代理人	100088683
			弁理士 中村 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】拮抗作用を有する枯草菌株を用いた植物病の防除方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

植物病に対して拮抗作用を有する枯草菌 (Bacillus subtilis) E B 1 2 0 菌株 (K C T C 1 0 5 7 8 B P) の生物学的純粋培養液。

【請求項 2】

枯草菌 E B 1 2 0 菌株 (K C T C 1 0 5 7 8 B P) 又はこれから由来した物質を有効成分として含むことを特徴とする植物病防除用の微生物製剤。

【請求項 3】

前記物質が、枯草菌 E B 1 2 0 菌株の培養液全体と、前記培養液のブタノール抽出物と、枯草菌 E B 1 2 0 菌株の孢子、からなる群から選択されることを特徴とする請求項 2 記載の植物病防除用の微生物製剤。

【請求項 4】

前記植物病が、オオムギうどん粉病、キュウリうどん粉病、トウガラシ炭疽病、イネいもち病、トマト灰色かび病、トマト疫病、及び小麦赤さび病からなる群から選択されることを特徴とする請求項 2 記載の植物病防除用の微生物製剤。

【請求項 5】

枯草菌 E B 1 2 0 菌株 (K C T C 1 0 5 7 8 B P) 又は請求項 2 の微生物製剤を効果的な量で植物に適用する段階を含むことを特徴とする植物病の防除方法。

【請求項 6】

前記植物病が、オオムギうどん粉病、キュウリうどん粉病、トウガラシ炭疽病、イネい

もち病、トマト灰色かび病、トマト疫病、及び小麦赤さび病からなる群から選択されることを特徴とする請求項 5 記載の植物病の防除方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物病に対する拮抗作用 (antagonistic activity) を有する新規な枯草菌株 (*Bacillus subtilis*)、これを含む植物病防除用の微生物製剤、及び該微生物製剤を用いて植物病を生物学的に防除する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

農作物耕作の際農薬を用いない場合、30%から最高100%までの収穫量の減少が起こる問題があるので、収穫量の増加のためには農薬の使用が必須的である。しかし、化学合成農薬の乱用は、土壌、水質及び農産物汚染、毒性、生態系攪乱、抵抗性菌株の出現など色々の問題を引き起こす。このような問題点を解決するための一つの方法は、拮抗微生物を用いた生物農薬 (Biopesticide) を開発することである。生物農薬は植物抽出物、微生物、天敵、天然生理活性物質及び遺伝子組換え生物 (GMO; genetically modified organism) などに大別される。生物農薬は化学合成農薬に比べてより安全で且つ生分解性が高く、開発費用も少ない。

【0003】

生物農薬、特に微生物殺菌剤 (fungicide) に対する研究はこの70余年の間植物病理学の主要分野としてコツコツと進行されており、その結果、この10年間40余種以上の製品が開発されてきた。

【0004】

一方、グラム陽性細菌であるバチルス (*Bacillus*) 属細菌は、シュードモナス属 (genus *Pseudomonas*) と同様に広く研究されて商用化された細菌である。バチルス属細菌は生物学的活性のある2次代謝産物を生産し、熱に対して安定であり熱安定性が良く、かつまた劣悪な環境に抵抗性を有する内生孢子 (endospore) を形成する。グスタフソン社 (Gustafson Inc.) は畝間及び綿花と落花生の種子を処理するために枯草菌株を用いた微生物殺菌剤を開発し、これはコディアック (Kodiak) という商品名として市販されている (Backmanら、Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria, pp. 3-8, 1994)。また、2001年には枯草菌とバチラス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) との混合物を用いたバイオールド (Bio Yield) という商品名の微生物殺菌剤が市販された。中国ではバチルス属の多くの菌株が収穫量増進のために使用されている。のみならず、バイエル社 (Bayer Inc.) はバチラス FZB 24 菌株を含む土壌伝染病防除剤を開発しており、米国Taensa社は同一の菌を用いた微生物殺菌剤を出した。

【0005】

また、米国AgraQuest社は枯草菌 QST 713 菌株を用いた微生物殺菌剤であるセレナーデ (Serenade; 商品名) を開発した。この微生物殺菌剤は枯草菌株を用いた他の製品とは異なり、灰色かび病 (gray mold)、立枯病 (damping-off) 及びうどん粉病 (powdery mildew) を含む40種以上植物病に対して効果がある。この拮抗微生物は競争、寄生、抗生作用及び誘導抵抗性の発現などの多様な機作によって様々な植物病を防除することと知られており、イチュリン (iturin)、プリパスタチン (plipastatin) 及びサーファクチン (surfactin) の3つのグループを含む抗生物質であって、30種以上のリポペプチド (lipopeptide) を生産する (Ritter, Chemical & Engineering News, 81; 30-35, 2003)。

【0006】

韓国では、1970年代初から収穫後に朝鮮人参の根腐れ (root rot) の生物学的防除研究を始めてトウガラシ疫病、キュウリやイチゴのフザリウム立枯病 (*Fusarium wilt*)、ゴマ立枯病、及び灰色かび病の生物学的防除に関する研究が行われている。しかし、効果の不安定性、製剤化の困難、低い生産性などの理由で成功した例がない現状である。パ

10

20

30

40

50

チルス属の菌株を用いた韓国内における最初の微生物殺菌剤は(株)グリーンバイオテック (Greenbiotech Co. Ltd.) によって開発された“トップシード”(Topseed)である。しかし、このトップシードはうどん粉病のみに対して効果があるので、その使用対象に多くの制限がある。

【0007】

それで、本発明者らは、広範囲な植物病に対して強力な殺菌活性を示す新たな殺菌剤を開発するため努力したところ、トウガラシから分離した植物内生細菌である枯草菌 E B 1 2 0 菌株がオオムギうどん粉病及びキュウリうどん粉病を始めとしてトウガラシ炭疽病、イネいもち病、トマト灰色かび病、トマト疫病、及び小麦赤さび病など種々の植物病に対して拮抗作用があることを見出して、本発明を完成するに至った。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

従って、本発明の目的は植物病に対して拮抗作用を有する新規な枯草菌株を提供することにある。

【0009】

本発明の他の目的は、前記菌株を含む植物病防除用の微生物製剤を提供することにある。

【0010】

本発明のまた他の目的は、前記微生物製剤を用いて植物病を防除する方法を提供することにある。

20

【課題を解決するための手段】

【0011】

前記目的を達成するために、本発明では植物病に対して拮抗作用を有する枯草菌 (*Bacillus subtilis*) E B 1 2 0 菌株 (K C T C 1 0 5 7 8 B P) を提供する。

【0012】

前記他の目的を達成するために、本発明では前記菌株又はこれから由来した拮抗活性物質を有効成分として含む植物病防除用の微生物製剤を提供する。

【0013】

前記また他の目的を達成するために、本発明では前記微生物製剤を用いて植物病を防除する方法を提供する。

30

【発明の詳細な説明】

【0014】

本発明は植物病に対する広範囲な拮抗作用を示す新規な枯草菌 (*Bacillus subtilis*) E B 1 2 0 菌株 (K C T C 1 0 5 7 8 B P) を提供する。

【0015】

本発明による新規な菌株は、トウガラシの葉から分離される。菌株の形態的特性、生化学的特性及び 16 S r D N A の塩基配列解釈の結果は、当該菌株が枯草菌に属することを示す。この新規な菌株は枯草菌 E B 1 2 0 (*Bacillus subtilis* EB120) と命名され、2004年1月6日付で特許手続きのための微生物寄託の国際認識に関するブダペスト条約により韓国生命工学研究機関遺伝子銀行 (KCTC; Korean Collection for Type Cultures) (アドレス: 韓国大田広域市儒城区魚隠洞 5 2 番地 3 0 5 - 3 3 韓国生命工学研究機関 (KRIBB; Korea Research Institution of Bioscience and Biotechnology)) に寄託番号第 K C T C 1 0 5 7 8 B P 号として寄託された。

40

【0016】

本発明による枯草菌 E B 1 2 0 菌株は、次のような形態学的及び生化学的特徴を示す。即ち、枯草菌 E B 1 2 0 菌株は、トリプシン大豆寒天培地 (triptic soy agar medium) 上で薄く広がって育ち、単一コロニーの場合、小さな雪花状となる (図 1 参照)。また、枯草菌 E B 1 2 0 菌株はバチルス属に属し、グラム染色反応、水酸化カリウム (K O H) テスト、カタラーゼ (catalase) 及びオキシダーゼ (oxidase) テストにおいて陽性反応

50

を示し、熱安定性のある内生孢子を形成し、澱粉及びカゼイン (casein) に対する加水分解能を有する。更に、マルトトリオース (maltotriose) の場合を除いて、枯草菌 E B 1 2 0 菌株及び A T C C 6 0 5 1 菌株は同一の糖利用性を示す。

【 0 0 1 7 】

また、16S rDNA の塩基配列解釈の結果は、本発明による枯草菌 E B 1 2 0 菌株が枯草菌と 99% の配列相同性をもつ配列番号 1 の塩基配列を有することを示す。

【 0 0 1 8 】

このような特性を有する枯草菌 E B 1 2 0 菌株はオオムギうどん粉病及びキュウリうどん粉病、トウガラシ炭疽病、イネいもち病、トマト灰色かび病、トマト疫病、及び小麦さび病などを含む植物病防除のための幅広くかつ強い拮抗作用を示す。

10

【 0 0 1 9 】

従って、本発明による枯草菌 E B 1 2 0 菌株は植物病防除のための微生物製剤として用いられることができる。菌株そのものもこのような微生物製剤として使用可能である。また、前記微生物製剤は菌株の培養液、それから得られた溶媒抽出物或いは単一の内生孢子を担体と混合した後、粉末、ペレット、顆粒又は溶液などに剤形化して製造することができる。本発明で使用可能な担体としては、水、ホワイトカーボン、カオリンなどがあるが、これらに限定されない。

【 0 0 2 0 】

本発明による微生物製剤を用いて、植物が生長している土壌又は成長中の植物を処理することで、植物病による植物成長阻害及びこれに起因する枯れ死を防除するが可能である。

20

【 0 0 2 1 】

本発明による枯草菌 E B 1 2 0 菌株は、対象植物に対して  $1.0 \times 10^4$  cells/ml 乃至  $1.0 \times 10^{10}$  cells/ml、好ましくは  $1.0 \times 10^6$  cells/ml 乃至  $1.0 \times 10^9$  cells/ml の量で処理される。

【 実施例 】

【 0 0 2 2 】

以下、添付図面を参照して本発明による好適な実施形態をより詳細に説明する。但し、下記の実施例は本発明を例示するためのものであり、本発明の範囲がこれらに制限されるものではない。

30

【 0 0 2 3 】

実施例 1：枯草菌 E B 1 2 0 菌株の分離

新鮮なトウガラシの葉 5 g を 0.1% トゥイーン (Tween) 20 が添加された 2% N A O C l に 10 秒間浸漬させてトウガラシの葉の表面を滅菌した。このように滅菌した葉に 45 ml の滅菌水を加えた後、乳棒と乳鉢ですって 1 ml を取り、蒸留水を用いて 1:10、1:100 及び 1:1000 にそれぞれ希釈した。各希釈液 200  $\mu$ l を 40  $\mu$ g/ml のシクロヘキシミド (cycloheximide) を含むトリプシン大豆寒天培地 (tryptic soy agar medium) に散布した後、30 でバクテリアコロニーが形成するまで培養した。培地からコロニーを取って新鮮な栄養寒天培地 (nutrient agar medium) に接種し、3~4 回継代培養してバクテリアの菌株の単一コロニーを分離した。

40

【 0 0 2 4 】

実施例 2：枯草菌 E B 1 2 0 菌株の同定

実施例 1 で分離された細菌の菌株の同定は菌株の形態学的及び生化学的特性、並びに 16S rDNA 塩基配列解釈を用いて行った。

【 0 0 2 5 】

(1) 形態学的及び生化学的特性

前記分離された菌株は、トリプシン大豆寒天培地上で薄く広がって育ち、単一コロニーの場合は小さな雪花状に形成される (図 1)。前記分離された菌株はグラム染色反応及び水酸化カリウム (KOH) テストにおいて陽性反応を示すことから枯草菌属に属することがわかり、カタラーゼ (catalase) テスト及びオキシダーゼ (oxidase) テストにおいて

50

陽性反応を示し、また内生孢子を形成し、澱粉及びカゼイン (casein) を加水分解した。

【0026】

また、GN2マイクロプレート(購入先:米国バイオログ社(Biolog Inc.))を用いて糖利用性を調査し、その結果を下記の表1に示した。比較菌株としては枯草菌の亜種(Bacillus subtilis subsp. subtilis) ATCC 6051菌株(購入先:韓国生命工学研究院の遺伝子銀行)を用いた。

【表1】

糖	EB120菌株	ATCC6051菌株
L-アラビノース	-	-
アラビトール	-	-
アルブチン	+	+
セロビオース	+	+
D-フルクトース	+	+
L-フルクトース	-	-
D-ガラクトン酸	-	-
$\alpha$ -D-グルコース	+	-
$\alpha$ -D-ラクトース	-	-
マルトトリオース	-	+
D-マンニトール	+	+
D-マンノース	+	+
D-メレジトース	-	-
D-メリビオース	-	-
$\alpha$ -メチル-D-ガラクトシド	-	-
$\beta$ -メチル-D-ガラクトシド	-	-
A-メチル-D-マンノシド	-	-
D-ブシコース	+	+
L-ラムノース	-	-
セドヘプツロース	-	-
スタキオース	-	-
スクロース	+	+
D-タガトース	-	-
D-トレハロース	+	+
キシリトール	-	-
D-キシロース	-	-

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 7 】

前記表 1 から明らかなように、マルトトリオースを除いては、枯草菌 E B 1 2 0 菌株及び A T C C 6 0 5 1 菌株は同一の糖利用性を示す。即ち、両菌株ともアルブチン (albutin)、セロビオース (cellobiose)、D - フラクトース (D-fructose)、D - グルコース (D-glucose)、D - マンニトール (D-mannitol)、D - マンノース (D-mannose)、D - プシコース (D-psicose)、スクロース (sucrose)、及び D - トレハロース (D-trehalose) を全て利用したが、対照菌株である枯草菌の亜種 (Bacillus subtilis subsp. subtilis) A T C C 6 0 5 1 菌株は本発明の分離菌株とは異なり、マルトトリオースをも利用した。

## 【 0 0 2 8 】

( 2 ) 1 6 S r D N A の塩基配列解釈

1 6 S r D N A の塩基配列解釈の結果、分離された菌株が枯草菌の配列と 9 9 % の配列相同性を有する配列番号 1 の塩基配列を有することが分かった。

## 【 0 0 2 9 】

このような結果は分離された菌株が枯草菌の新規な菌株であることを証明する。この新規な菌株は枯草菌 E B 1 2 0 と命名され、2 0 0 4 年 1 月 6 日付で韓国生命工学研究院の遺伝子銀行に寄託番号第 K C T C 1 0 5 7 8 B P 号として寄託された。

## 【 0 0 3 0 】

実施例 3 : 植物病に対する菌株の防除活性の検定

枯草菌 E B 1 2 0 菌株 (以下、“E B 1 2 0” と称する) のトマト灰色かび病、トマト疫病、キュウリ炭疽病及びオオムギうどん粉病に対する防除活性を調べるために、E B 1 2 0 で対象植物を処理し、2 4 時間後に植物病原菌を接種した。

## 【 0 0 3 1 】

具体的に、E B 1 2 0 を滅菌された 2 0 0 ml のトリプシン大豆液体培地 (Tryptic soy broth、Becton and Dickinson 社) に接種し、3 0 ℃ にて 3 日間 1 5 0 r p m で振湯培養した。培養液を、蒸留水を用いて 1 : 3 及び 1 : 9 の比率で希釈した後、3 0 ml の培養液及び希釈液をそれぞれ 1 0 0 μ g / ml のキサントン・ガムと混合した。トマト、オオムギ及びキュウリはそれぞれ 2 葉期 (2nd leaf stage)、1 葉期 (1st leaf stage) 及び 2 葉期に至るまで園芸用真土を 7 0 % ほど盛ったプラスチック鉢で温室条件 (2 5 ± 5 ℃) のもとに 1 週乃至 3 週間耕作生育させた後、前記混合物で各対象植物を処理し、大気中で乾燥させ、2 4 時間常温で放置した。

## 【 0 0 3 2 】

引き続き、各病原菌の発病誘導は次のように行った。つまり、トマト疫病及びトマト灰色かび病は、疫病菌 (Phytophthora infestans、入手先：韓国江陵大学校) の孢子囊 (5 × 1 0 <sup>4</sup> 孢子囊 / ml) から抽出した遊走の懸濁液及び灰色かび病菌 (Botrytis cinerea、入手先：韓国化学研究院) の孢子懸濁液 (5 × 1 0 <sup>5</sup> 孢子 / ml) をそれぞれ 2 葉期のトマト幼苗の葉に噴霧処理して 2 0 ℃ の恒温室内で発病を誘導した。そして、キュウリ炭疽病は、2 葉期のキュウリ幼苗の葉に炭疽病菌 (Colletotrichum orbiculare、入手先：農業化学技術院) の孢子懸濁液 (1 0 <sup>6</sup> 孢子 / ml) を処理した後、2 日間温室で発病を誘導した後、2 5 ℃ の恒温恒湿室で 3 日間発病させた。また、オオムギうどん粉病は、1 葉期のオオムギ幼苗の葉に宿主植物から継代培養されたうどん粉病菌 (Blumeria graminis f. sp. hordei、入手先：韓国化学研究院) の孢子を接種した後、2 0 ℃ の恒温室内で発病させた。

## 【 0 0 3 3 】

対照群としては、菌株培養液を含有しないキサントン・ガム溶液 (1 0 0 μ g / ml) 3 0 ml で処理したものを使用し、比較群としては、各当該病原菌に対して防除効果を有する化学物質であるクロロタロニル (chlorothalonil) (購入先：Sungbo Chemical Co., Ltd.)、ジチアノン (Dithianon) (購入先：Hankook Samgong Co., Ltd.)、ジクロフルアニド (Dichlofluanid) (購入先：Dongbu Hannong Chemical Co., Ltd.) 及びベノミル (BenomyI) (購入先：Dongyang Chemical Industry Co., Ltd.) で処理した群を用い

10

20

30

40

50

た。

【 0 0 3 4 】

各オオムギうどん粉病、キュウリ炭疽病、トマト灰色かび病、及びトマト疫病の発病程度は、各病原菌を接種してからそれぞれ7日、5日、3日、及び4日後に接種された葉に対して孢子形成阻害による病斑面積率又は白化現象や壊死現象による病斑面積率を評価することで調査した。病防除効果（防除価）は下記の式1に基づいて算出し、その結果を下記の表2に示した。

【 数 1 】

$$\text{防除価(\%)} = (ID_{UCG} - ID_{TEG}) \div ID_{UCG} \times 100$$

10

【 0 0 3 5 】

前記式1において、 $ID_{UCG}$ は無処理対照群の発病度を示し、 $ID_{TEG}$ は処理群の発病度を示す。

【 表 2 】

処理試料	希釈倍数及び濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	防除価 (%)			
		トマト疫病	キュウリ炭疽病	トマト灰色かび病	オオムギうどん粉病
枯草菌 EB120 菌株	1倍希釈液 (原液)	88	3	95	82
	3倍希釈液	13	3	50	72
	9倍希釈液	0	3	23	58
クロロタロ ニル	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100			
	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	89			
ジチアノン	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$		100		
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$		80		
ジクロフル アニド	80 $\mu\text{g}/\text{ml}$			97	
	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$			86	
ベノミル	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$				100
	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$				52

20

30

40

【 0 0 3 6 】

前記表2から明らかなように、EB120はトマト疫病、トマト灰色かび病およびオオムギうどん粉病に対して優れた防除活性を示すことがわかる。

【 0 0 3 7 】

実施例4：植物病に優れた拮抗作用を示す最適培地の選別

EB120の防除活性物質の生産のための最適培地を選別するために、色々な培養培地を用いた培養実験を下記のように行った。

【 0 0 3 8 】

50

EB120を下記の表3に記載の6種類の液体培地に接種した後、3日間30℃にて150rpmで振湯培養した。各培養液を、蒸留水を用いて1:3及び1:9の比率で希釈した。各希釈溶液にキサンタン・ガムを100µg/mlの濃度で添加した後、実施例3に記載の方法によりオオムギうどん粉病を誘発させて病防除効果を測定した。その結果を下記の表3に示した。

【表3】

培地	防除価 (%)	
	3倍希釈液	9倍希釈液
栄養培地 (Nutrient broth)	10	10
トリプシン大豆液体培地	70	52
ジャガイモ煎汁液体培地	46	0
プロテオースペプトングルコーススクロース液体培地	40	20
グルコース澱粉液体培地	52	10
グルコースペプトン液体培地	40	20
M523液体培地	30	10

10

20

## 【0039】

前記表3から明らかなように、EB120のオオムギうどん粉病に対する防除活性はトリプシン大豆液体培地で培養した場合が最適であることが分かる。

## 【0040】

## 実施例5：枯草菌EB120菌株のキュウリうどん粉病に対する防除効果

EB120をトリプシン大豆液体培地に接種した後、3日間30℃にて150rpmで振湯培養した。これを、蒸留水を用いて1:10、1:25、1:50、1:100及び1:200の比率で希釈した。各希釈溶液に250µg/mlのトゥイーン20を添加した後、7葉期のキュウリの葉面を噴霧処理した。

30

## 【0041】

比較群として、市販されているうどん粉病防除用の微生物殺菌剤の「トップシード」(購入先:(株)グリーンバイオテック(Greenbiotech Co. Ltd.)を、蒸留水を用いて1:10、1:25、1:50、1:100及び1:200の比率で希釈した希釈溶液と、細菌剤として知られたフルシラゾール(Flusilazole、購入先:Dongbu Hannong Chemical Co., Ltd.)とを対象キュウリ処理のため用いた。対照群としてはトゥイーン20溶液のみで処理したキュウリを使用した。

## 【0042】

前記噴霧処理1週日後、菌株培養液の希釈溶液及び比較群の試料を対象キュウリに2次処理し、2次処理してから7日後に実施例3に記載の方法と同様な方法によってうどん粉病に対する病防除効果を測定した。うどん粉病は温室に存在する病原菌(Sphaerotheca fuliginea)による自然的な発生を誘導した。

40

## 【0043】

前記実験過程は2回行い、1回目及び2回目の実験の結果をそれぞれ下記の表4に示した。



【表4】

処理試料	希釈倍数及び濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	防除価 (%)	
		1次実験	2次実験
枯草菌 EB120 菌株	10 倍希釈溶液	86 $\pm$ 5.8	94 $\pm$ 3.3
	25 倍希釈溶液	84 $\pm$ 5.0	91 $\pm$ 2.7
	50 倍希釈溶液	76 $\pm$ 11	86 $\pm$ 3.0
	100 倍希釈溶液	21 $\pm$ 9.2	84 $\pm$ 6.7
	200 倍希釈溶液	16 $\pm$ 5.8	72 $\pm$ 20
トップシード	10 倍希釈溶液	87 $\pm$ 3.8	92 $\pm$ 5.4
	25 倍希釈溶液	60 $\pm$ 7.8	82 $\pm$ 6.7
	50 倍希釈溶液	56 $\pm$ 9.3	48 $\pm$ 11
	100 倍希釈溶液	32 $\pm$ 23	14 $\pm$ 39
	200 倍希釈溶液	26 $\pm$ 13	45 $\pm$ 20
フルシラゾール	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	97	97
	30 $\mu\text{g}/\text{ml}$	99	99

10

20

## 【0044】

前記表4から明らかなように、EB120培養液の全ての希釈溶液がキュウリうどん粉病に対して優れた防除活性を示し、200倍に希釈したEB120希釈溶液で処理した場合であっても、有効な水準の防除効果を示すことが判明した。また、既存のうどん粉病防除用の微生物殺菌剤であるトップシードと比較するとき、希釈倍数が50倍以下の希釈溶液処理群ではトップシード処理群と同等以上の効果を示すことが分かった。図2はEB120のキュウリうどん粉病に対する防除活性を示す図である。トゥイーン20溶液のみで処理した対照群の場合、うどん粉病の病徴が多く現われたことに対し、枯草菌EB120菌株の培養液で処理した実験群のキュウリの葉においては病徴をほとんど見出すことができなかった。

30

## 【0045】

実施例6：枯草菌EB120菌株培養液、これの酢酸エチル及びブタノール抽出物における植物病に対する防除活性のインビボテスト

EB120が生産する物質の防除活性を測定するために、EB120培養液、これの酢酸エチル及びブタノール抽出物における植物病に対する防除効果を下記のように実験した。

40

## 【0046】

EB120をトリプシン大豆液体培地に接種した後、30℃にて150rpmで3日間振湯培養し、9000rpmで12分間遠心分離した。上澄液を同量の酢酸エチルで2回抽出して酢酸エチル抽出物を得、これを減圧濃縮した。また、ブタノール抽出物を前記酢酸エチル抽出物と同様な方法により得た。各抽出試料から、培養液40mlに該当する量を取った後、酢酸エチル抽出試料は4mlのアセトンで溶解し、ブタノール抽出試料は2mlのメタノールで溶解した。両溶液をトゥイーン20(250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )溶液で希釈して最終容積40mlを作製した。

50

## 【 0 0 4 7 】

一方、E B 1 2 0 の培養上澄液 4 0 ml に 2 5 0  $\mu$  g / ml のトゥイーン 2 0 を添加した。

## 【 0 0 4 8 】

各溶液をトウガラシ、イネ、トマト、コムギ、及びオオムギに噴霧し、1日経過後病原菌であるトウガラシ炭疽病 ( P A N )、イネいもち病 ( R C B )、イネ紋枯病 ( R S B )、トマト灰色かび病 ( T G M )、トマト疫病 ( T L B )、小麦赤さび病 ( W L R )、及びオオムギうどん粉病 ( B P M ) を接種して病防除効果を調べた。

## 【 0 0 4 9 】

各病原菌の発病誘導において、トマト灰色かび病、トマト疫病、及びオオムギうどん粉病は前記実施例 3 に記載の方法と同様な方法によって行った。

10

## 【 0 0 5 0 】

一方、トウガラシ炭疽病は、発芽させたトウガラシ種子を直径 7 . 0 c m の鉢に播種した後、8葉期まで温室で育った唐辛子にトウガラシ炭疽病原菌 ( Colletotrichum coccodes、入手先：韓国高麗大学校 ) の孢子懸濁液 ( 5  $\times$  1 0 <sup>5</sup> 孢子 / ml ) を噴霧処理した後、恒湿室内で2日間処理してから、25 の恒温恒湿室で2日間培養して発病を誘導した。

## 【 0 0 5 1 】

イネいもち病は、2葉期の幼苗にイネいもち病原菌 ( Magnaporthe gisea、入手先：韓国ソウル大学校 ) の孢子懸濁液 ( 5  $\times$  1 0 <sup>5</sup> 孢子 / ml ) を噴霧して接種した後、25 の湿室内で一日間放置してから、25 の恒温室で5日間培養して発病を誘導した。

20

## 【 0 0 5 2 】

イネ紋枯病は、3葉期の幼苗にイネ紋枯病原菌 ( Thanatephorus cucumeris、入手先：韓国化学研究院 ) が7日間培養された培地 ( ふすま 9 0 g、米ぬか 1 5 g、蒸留水 1 0 0 ml ) を接種して25 の湿室内で4日間処理したのち、25 の恒温室で4日間培養して発病を誘導した。

## 【 0 0 5 3 】

小麦赤さび病は、1葉期の幼苗に活物寄生菌 ( Puccinia recondita、入手先：韓国化学研究院 ) の孢子をトゥイーン 2 0 溶液 ( 2 5 0  $\mu$  g / ml ) に 0 . 6 7 g 孢子 / l の濃度に懸濁した孢子懸濁液を噴霧処理して一日間20 の湿室内で処理した後、恒温室へ移して培養して発病を誘導した。

30

## 【 0 0 5 4 】

トウガラシ炭疽病に対しては、病原菌を接種してから4日後に、イネいもち病に対しては病原菌を接種してから5日後に、小麦赤さび病及びイネ紋枯病に対しては病原菌を接種してから7日後に病斑面積率 ( % ) を調査し、実施例 3 の方法によって病防除効果 ( 防除価 ) を測定した。その結果は下記の表 5 に示した。

## 【 表 5 】

試料	防除価 (%)						
	PAN	RCB	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM
培養上澄液	93	83	0	94	94	90	92
培養液の酢酸エチル抽出物	0	70	0	0	0	53	0
培養液のブタノール抽出物	96	98	60	94	95	83	93

40

## 【 0 0 5 5 】

前記表 5 から明らかなように、E B 1 2 0 培養液の酢酸エチル抽出物は植物病に対してほとんど効果がなかったが、これのブタノール抽出物は E B 1 2 0 菌株の培養上澄液と同様にオオムギうどん粉病、トウガラシ炭疽病、イネいもち病、トマト灰色かび病、トマト

50

疫病、小麦赤さび病の全ての植物病に対してE B 1 2 0 菌株の培養上澄液と同等又はそれ以上の高い防除活性を示した。これによって、本発明によるE B 1 2 0 が生産する防除活性物質は比較的の高い極性を有する物質であることが分かった。

【0056】

実施例7：枯草菌E B 1 2 0 菌株が生産する防除活性物質の温度に対する安定性調査

E B 1 2 0 が生産する物質の温度に対する安定性を調査するために、培養上澄液とこれのブタノール抽出物を様々な温度、すなわち4℃、常温、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、100℃、及び121℃で予め処理した後、病原菌を接種することにより病原菌株の菌糸伸張阻害程度を調査した。

【0057】

具体的に、E B 1 2 0 培養上澄液と前記実施例6で得られたブタノール抽出物を、4℃及び常温では24時間、30℃、40℃、50℃、60℃、及び70℃では5時間、100℃及び121℃では15分間予め処理した。培養上澄液は蒸留水を用いて1：2の比率で希釈し、ブタノール抽出物はメタノールに200mg/mlの濃度で溶解させた。各試料50μlを直径8mmのペーパーディスク(paper disk)に噴霧して乾燥させた。イネいもち病原菌(Magnaporthe gisea、入手先：ソウル大学校)を注ぎ平板法(pour-planting method)によって接種されたジャガイモ寒天培地上に移した後、25℃で3日間培養した。ついで、各ペーパーディスクを取り周囲の阻害区域の直径を測定することで、菌糸伸張阻害効果を測定した。

【0058】

図3に示したように、イネいもち病においてE B 1 2 0 から生産された代謝物質に対して影響を受ける他のパターンの3つの領域は次の通りである。完全に菌糸生育が阻害される部位(完全阻害部位)と、空中菌糸は成長できずに培地の内側へ菌糸が育つ部位(部分阻害部位)と、空中菌糸が育って、空中菌糸が培地に吸着したように見える部位(空中菌糸の影響部位)とがある。これによって、E B 1 2 0 は少なくとも3つ以上の防除活性物質を生産することが分かることができる。

【0059】

また、E B 1 2 0 が生産する防除活性物質は温度に関係なくほぼ均一な程度の菌株成長阻害効果を示すことが認められる(図4)。これによって、E B 1 2 0 が生産する防除活性物質は熱に対して比較的安定であることが分かる。図4において、黒色の棒は完全阻害部位を、灰色の棒は部分阻害部位を、そして白色の棒は空中菌糸の影響部位をそれぞれ示している。

【0060】

一方、枯草菌E B 1 2 0 菌株の培養液のブタノール抽出物の熱処理によるイネいもち病原菌(Magnaporthe gisea)の成長阻害程度を観察した結果、培養液のブタノール抽出物に対しては培養上澄液とは異なり、空中菌糸の影響部位が現われなかった。この結果は空中菌糸の影響部位のパターンを示す防除活性物質は相異なる2つのパターンを示す防除活性物質よりも非極性であることを示す。なお、図5はブタノール抽出物も熱処理温度に関係なく均一な菌糸伸張阻害活性を示すグラフである。

【0061】

以上、本発明の好適な実施例について詳述したが、本発明の範囲は前述した実施例に制限されることはなく、特許請求範囲に記述された本発明の技術的思想を逸脱しないカテゴリ内で当業者によって多様な修正又は変更が可能であることは明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1】トリブシン大豆寒天培地で培養された枯草菌E B 1 2 0 菌株の写真である。

【図2】枯草菌E B 1 2 0 菌株のキュウリうどん粉病に対する抗真菌活性を示す写真である。

【図3】枯草菌E B 1 2 0 菌株のイネいもち病菌に対する菌糸伸張阻害活性を示す写真である。

10

20

30

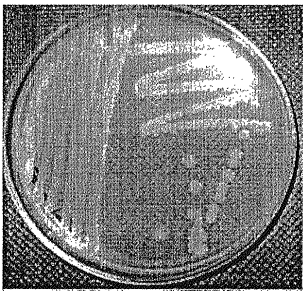
40

50

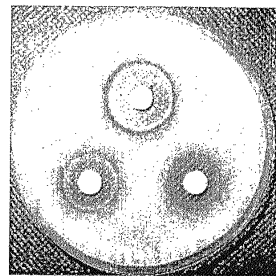
【図4】 枯草菌EB120菌株の培養液の熱安定性を示すグラフである。

【図5】 枯草菌EB120菌株の培養液のブタノール抽出物の熱安定性を示すグラフである。

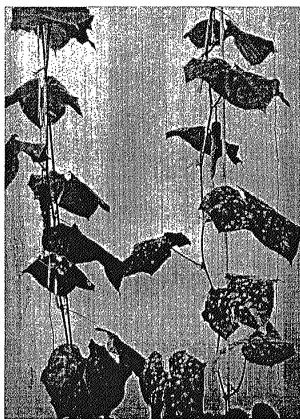
【図1】



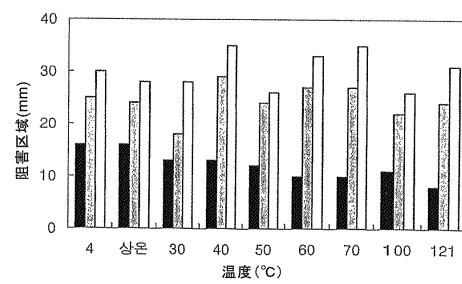
【図3】



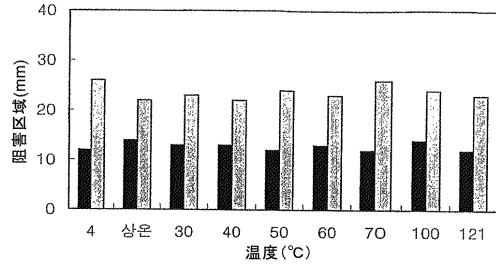
【図2】



【図4】



【 图 5 】



【 配列表 】

0004417998000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 0 1 G 7/00 6 0 5 Z

(74)代理人 100108855

弁理士 蔵田 昌俊

(74)代理人 100075672

弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100109830

弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100095441

弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100103034

弁理士 野河 信久

(74)代理人 100140176

弁理士 砂川 克

(74)代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(74)代理人 100100952

弁理士 風間 鉄也

(72)発明者 チョ、クワン - ユン

大韓民国、デジョン 305 - 340、ユソン - グ、ドリョン - ドン ナンバー383 - 21

(72)発明者 キム、ジン - チョル

大韓民国、デジョン 305 - 720、ユソン - グ、シンソン - ドン、デリム・デュレ・アパートメント 110 - 1006

(72)発明者 チョイ、ギョン - ジャ

大韓民国、デジョン 305 - 390、ユソン - グ、ジョンミン - ドン、ナンバー462 - 4、ナラエ・アパートメント 104 - 1005

(72)発明者 リ、ソン - ウォ

大韓民国、デジョン 305 - 755、ユソン - グ、エウン - ドン、ナンバー99、ハンビット・アパートメント 103 - 805

(72)発明者 チョイ、ヨン・ホ

大韓民国、デジョン 305 - 345、ユソン - グ、シンソン - ドン、ナンバー153、ハナ・アパートメント 105 - 801

(72)発明者 ジャン、キュン - ソ

大韓民国、デジョン 305 - 755、ユソン - グ、エウン - ドン、ナンバー99、ハンビット・アパートメント 127 - 1206

(72)発明者 リム、ヘ - キュン

大韓民国、デジョン 305 - 333、ユソン - グ、エウン - ドン、ナンバー99、ハンビット・アパートメント 130 - 202

審査官 三原 健治

(56)参考文献 欧州特許出願公開第01241247 (EP, A1)

米国特許第06291426 (US, B1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/20

A01N 63/02

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE(STN)

WPI