

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2009年7月16日 (16.07.2009)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2009/088074 A1

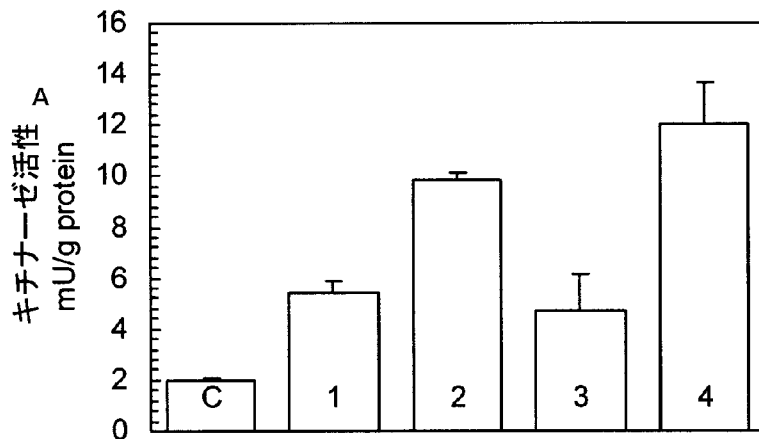
- (51) 国際特許分類:  
A01N 63/02 (2006.01) A01N 59/20 (2006.01)  
A01N 59/16 (2006.01) A01P 3/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/050216
- (22) 国際出願日: 2009年1月9日 (09.01.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2008-004833 2008年1月11日 (11.01.2008) JP  
特願2008-221563 2008年8月29日 (29.08.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 五十嵐 大亮
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス21ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM,

[続葉有]

(54) Title: DISEASE RESISTANCE ENHANCER FOR PLANTS AND METHOD OF CONTROLLING PLANT DISEASE BY USING THE SAME

(54) 発明の名称: 植物用病害耐性増強剤およびそれを用いた植物病害防除法

[図8]



A CHITINASE ACTIVITY mU/g protein

(57) Abstract: A plant is treated with a disease resistance enhancer comprising a liquid which is obtained by heating a microorganism under acidic conditions. Thus, resistance against a disease is induced and infection with a pathogenic microorganism is controlled.

(57) 要約: 微生物の酸性加熱処理液からなる病害耐性増強剤を植物に処理することで病害耐性を誘導することにより病原菌の感染を防除する。

WO 2009/088074 A1



KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA,  
MD, ME, 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, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,  
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,  
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

## 明 細 書

### 植物用病害耐性増強剤およびそれを用いた植物病害防除法

#### 技術分野

[0001] 本発明は微生物を原料として、環境負荷が少なくかつ使用者および消費者にとって安全な植物用病害耐性増強剤と植物の病害防除方法に関する。

#### 背景技術

[0002] 農作物の病害を防除するために、殺菌剤など植物病原菌に直接作用することで病害を防除する農薬のほかに、植物自体が有する病害耐性を高めることで作物の病害を防除する農薬(耐性誘導型農薬)が使用されている。殺菌剤など植物病原菌に対して直接作用するタイプの農薬は、病原菌に対して殺菌効果を示すものが多いが、継続的な使用により薬剤に対して耐性変異株が出現する場合が多い。他方、耐性誘導型農薬は、直接病原菌に作用するのではなく、植物の耐性を誘導することで病害感染を防除することから、これまでにこのタイプの農薬の耐性変異株が出現した事例は認められていない。さらに、耐性誘導型農薬は、生物に対する殺菌作用が少ないために、植物以外の生物を含めた環境への負荷は比較的少ないと考えられている。

[0003] これまで植物の病害耐性誘導を目的とした農薬は、プロベナゾール(商品名:オリゼメート)、ベンゾチアゾール系(BTH)のアシベンゾラルSメチル(ASM、商品名:バイオン)、チアジアゾールカルボキサミド系のチアニジル(商品名:ブイゲット)が販売されている。

[0004] また、天然物由来の病害耐性誘導物質では、多糖体分解物(例えば、特許文献1参照。)、セレブロシド類(例えば、特許文献2、特許文献3及び非特許文献1参照)、ジャスモン酸(例えば、特許文献4及び非特許文献2参照)、キチンオリゴ糖(例えば、非特許文献3参照)、 $\beta$ -1,3-および $\beta$ -1,6-グルカンオリゴ糖(例えば、非特許文献4、非特許文献5及び非特許文献6参照)、胆汁酸(特許文献5および非特許文献8参照)、ペプチドグリカン(非特許文献9参照)、リポポリサッカライド(非特許文献10参照)などが報告されている。これら物質はエリシターと呼ばれており、病原菌に対して抗菌活性をもつファイトアレキシン(phytoalexins)の蓄積、病原菌の細胞壁を溶解する

キチナーゼや $\beta$ -1,3-グルカナーゼなどのPRタンパク(Pathogenesis-related proteins)の蓄積、過敏感細胞死の誘導等の効果があることが知られている(例えば、非特許文献3及び非特許文献7参照)。

[0005] また、コリネバクテリウムによるプロリン発酵液の上清の散布により病原菌の感染を防除する方法(特許文献6)が知られているが、酸性条件下で微生物を加熱処理して得られる溶液の効果は知られていない。

特許文献1:特開平5-331016号公報

特許文献2:特許第2846610号公報

特許文献3:国際公開98/47364号公報

特許文献4:特開平11-29412号公報

特許文献5:特開2006-219372号公報

特許文献6:特開平6-80530号公報

非特許文献1:Koga J. et. al., J. Biol. Chem., 1998, 48, 27, p.31985-31991

非特許文献2:Nojiri H. et. al., Plant Physiol., 1996, 110, p.387-392

非特許文献3:Yamada A. et. al., Biosci. Biotech. Biochem., 1993, 57, 3, p.405-409

非特許文献4:Sharp J. K. et al., J. Biol. Chem., 1984, 259, p.11312-11320

非特許文献5:Sharp J. K. et. al., J. Biol. Chem., 1984, 259, p.11321-11336

非特許文献6:Yamaguchi T. et. al., Plant Cell, 2000, 12, p.817-826

非特許文献7:Keen N. T., Plant Mol. Biol., 1992, 19, p.109-122

非特許文献8:Koga J. et. al., Plant Physiol. 2006, 140, p.1475-1483

非特許文献9:Gust A. A. et. al., J. Biol. Chem., 2007, 2007 in press

非特許文献10:Newman M.,A, Plant J. 2002, 29, p.487-495.

#### 発明の開示

[0006] 本発明の目的は、上述の背景にもとづき、消費者および使用者に対して安全性が高く、安価な植物用病害耐性増強剤とそれを用いた植物病害防除法を提供することである。

[0007] 本発明者らは病害耐性誘導物質を探索したところ、微生物を酸性溶液中で加熱処理することで得られる抽出液に高い病害耐性誘導活性があることを発見した。すなわ

ち当該抽出液を植物に散布することで活性酸素の産生、キチナーゼ活性、グルカナーゼ活性の上昇が認められ、顕著な病害耐性誘導が引き起こされることを見出した。さらにイネいもち病、アブラナ科黒斑細菌病の感染に対して高い防除効果を有することを見出した。本発明者らはまた亜鉛及び／又は銅などの金属を添加することで当該抽出液による病害耐性誘導がさらに増加、または持続性が向上することを見出した。以上の発見に基づいて本発明を完成させた。

[0008] 本発明は以下のとおりである。

(1)微生物菌体を酸性溶液中で加熱処理することにより得られる抽出液を含む、植物用病害耐性増強剤。

(2)酸性溶液中での加熱処理が、pH6以下の溶液中で70℃以上に加熱する処理である、(1)記載の病害耐性増強剤。

(3)微生物がEscherichia属細菌、コリネ型細菌、Pantoea属細菌、Bacillus属細菌、酵母、乳酸菌、酢酸菌であることを特徴とする(1)または(2)記載の病害耐性増強剤。(

4)葉面散布剤であることを特徴とする(1)～(3)のいずれかに記載の病害耐性増強剤。

(5)さらに金属を含むことを特徴とする(1)～(4)のいずれかに記載の病害耐性増強剤。

(6)金属が亜鉛及び／又は銅である(5)記載の病害耐性増強剤。

(7)(1)～(6)のいずれかに記載の病害耐性増強剤で植物を処理することを特徴とする、植物の病害を防除する方法。

#### 図面の簡単な説明

[0009] [図1]Corynebacterium処理液による、シロイヌナズナのキチナーゼ活性またはグルカナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照(展着剤のみの葉面散布区)、1はCorynebacterium酸性加熱処理液、2はCorynebacterium加熱処理液(pH調整なし:pH 6.3)、3はCorynebacterium未処理液(pH6.3)を葉面散布したときの活性を示す。  
[図2]E. coli処理液による、シロイヌナズナのキチナーゼ活性またはグルカナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照(展着剤のみの葉面散布区)、1はE. coli酸性加熱処理液、2はE. coli加熱処理液(pH調整なし:pH6.3)、3はE. coli未処理液(pH

6. 3)を葉面散布したときの活性を示す。

[図3]Bacillus処理液(A)またはPantoea処理液(B)による、シロイヌナズナのキチナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照(展着剤のみの葉面散布区)、1は酸性加熱処理液を葉面散布したときの活性を示す。

[図4]Corynebacterium処理液による、シロイヌナズナのキチナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照(展着剤のみの葉面散布区)、1はCorynebacterium菌体懸濁液(pH6)、2はCorynebacterium菌体懸濁液(pH6)を75°Cで60分加熱処理した液、3はCorynebacterium菌体懸濁液(pH6)を95°Cで60分加熱処理した液、をそれぞれ散布したときの活性を示す。本実験は菌体処理液を1/10希釈した溶液を用いて、加熱処理の効果を検討した。

[図5]活性汚泥処理液による、シロイヌナズナのキチナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照(展着剤のみの葉面散布区)、1は活性汚泥処理液を1/20希釈して葉面散布したときの活性を示す。

[図6]Corynebacterium処理液と亜鉛による、シロイヌナズナのキチナーゼ活性またはグルカナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照(展着剤のみの葉面散布区)、1はCorynebacterium酸性加熱処理液、2はCorynebacterium酸性加熱処理液+亜鉛(0.01% w/v)、3は亜鉛(0.01% w/v)を葉面散布したときの活性を示す。上段は処理後24時間、下段は処理後72時間の結果を示す。

[図7]E. coli処理液と亜鉛による、シロイヌナズナのキチナーゼ活性またはグルカナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照(展着剤のみの葉面散布区)、1はE. coli酸性加熱処理液、2はE. coli酸性加熱処理液+亜鉛(0.01% w/v)、3は亜鉛(0.01% w/v)を葉面散布したときの活性を示す。

[図8]CorynebacteriumとE.coli処理液と銅による、シロイヌナズナのキチナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照(展着剤のみの葉面散布区)、1はCorynebacterium酸性加熱処理液、2はCorynebacterium酸性加熱処理液+Cu(0.01% w/v)、3はE.coli酸性加熱処理液、4はE.coli酸性加熱処理液+Cu(0.01% w/v)をそれぞれ散布したときの活性を示す。

[図9]ペプチドグリカン(A)またはLPS(B)による、シロイヌナズナのキチナーゼ活性に

対する効果を示す図。Cは対照(展着剤のみの葉面散布区)、(A)の1はペプチドグリカン100mg/L、(B)の1はLPS 100mg/Lを葉面散布したときの活性を示す。

[図10]プロリン発酵液上清(アミノ酸50ppm)による、シロイヌナズナのキチナーゼ活性またはグルカナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照(展着剤のみの葉面散布区)、1はプロリン発酵液上清(アミノ酸50ppm)を葉面散布したときの活性を示す。

[図11]Corynebacterium酸性加熱処理液による、シロイヌナズナへの黒斑細菌病の感染防除効果を示す図。(A)はシロイヌナズナの葉の写真であり、左の2枚の葉は非処理(対照)、右の2枚の葉はCorynebacterium酸性加熱処理液で前処理した後に病原菌を感染させたものである。(B)は葉の単位重量あたりにおける病原菌の数である。

[図12]各微生物酸性加熱処理液による、イネのグルカナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照(展着剤のみの葉面散布区)、1はCorynebacterium酸性加熱処理液、2はE. coli酸性加熱処理液、3はPantoea 酸性加熱処理液、4はBacillus酸性加熱処理液を葉面散布したときの活性を示す。

[図13]Corynebacterium酸性加熱処理液によるイネのいもち病の感染防除効果を示す図。Cは対照(展着剤アプローチBI(花王)散布区)、1は展着剤にCorynebacterium酸性加熱処理液を加えたもので前処理をしたものであり、グラフの縦軸は葉あたりの病斑数を示す。

[図14]Corynebacterium酸性加熱処理液によるアスパラガス、イチゴ、ブドウの活性酸素( $H_2O_2$ )発生量を示す図。各植物の葉に処理を行ない、活性酸素の発生量を測定した。値は相対的な蛍光値(RFU; relative fluorescent units)で示した。Cは対照、1はCorynebacterium酸性加熱処理液を分子量分画(5kDa以上、30kDa以下)した後の液(100ppm)を処理したときの活性酸素の発生量を示す。

[図15]Corynebacterium酸性加熱処理液によるキャベツのキチナーゼ活性に対する効果を示す図。播種後3週間栽培したキャベツの葉に処理液を注入し、48時間後のキチナーゼ活性を測定した。Cは対照、1はCorynebacterium酸性加熱処理液を処理したときの活性を示す。

[図16]Saccharomyces cerevisiae酸性加熱処理液によるイネのグルカナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照、1はSaccharomyces cerevisiae酸性加熱処理液を処

理したときの活性を示す。

[図17] *Saccharomyces cerevisiae* 酸性加熱処理液によるイネのいもち病の感染防除効果を示す図。Cは対照(展着剤アプローチBI(花王)散布区)、1は展着剤に *Saccharomyces cerevisiae* 酸性加熱処理液を加えたもので前処理をしたものであり、グラフの縦軸は葉あたりの病斑数を示す。

[図18] イネの根に対する菌体酸加熱処理液処理による病害抵抗性遺伝子発現誘導効果を示す図。Cは対照、1は *Corynebacterium* 酸性加熱処理液を処理したときの RA c1 の発現量で標準化された PBZ1 遺伝子の発現量を示す。

### 発明を実施するための最良の形態

[0010] 本発明において微生物とは、酵母や菌類などの真核生物と、バクテリアあるいは放線菌などの原核生物を指し、グラム陽性、グラム陰性菌を限定しない。

好ましくは、コリネ型細菌、バチルス属細菌、エシエリヒア属細菌、パントエア属細菌、乳酸菌、酢酸菌、酵母等が使用できる。

[0011] コリネ型細菌としては、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム、コリネバクテリウム・アセトグルタミカム、コリネバクテリウム・アルカノリチカム、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・カルナエ、コリネバクテリウム・グルタミカム、コリネバクテリウム・リリウム、コリネバクテリウム・メラセコーラ、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス、コリネバクテリウム・ハーキュリス等のコリネバクテリウム属細菌やブレビバクテリウム・ディバリカタム、ブレビバクテリウム・フラバム、ブレビバクテリウム・インマリオフィラム、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム、ブレビバクテリウム・ロゼウム、ブレビバクテリウム・サッカロリチカム、ブレビバクテリウム・チオゲニタリス、ブレビバクテリウム・アルバム、ブレビバクテリウム・セリヌム等のブレビバクテリウム属細菌、マイクロバクテリウム・アンモニアフィラム等のマイクロバクテリウム属細菌等が例示される。

[0012] エシエリヒア属細菌としては、エシエリヒア・コリ (*E. coli*) 等が挙げられる。

パントエア属細菌としてはパントエア・アナナティス等が挙げられる。

バチルス属細菌としては、バチルス・ズブチリス、バチルス・アミロリケファシエンシス、バチルス・プミルス等が挙げられる。

酵母としては、サッカロミセス・セレビジエ等のサッカロミセス属酵母、ピキア・パストリ

ス等のピキア属酵母、ハンセヌラ・ポリモルファ等のハンセヌラ属酵母、キャンディダ・ユティリス等のキャンディダ属酵母、シゾサッカロミセス・ポンベ等のシゾサッカロミセス属酵母などが挙げられる。

乳酸菌としては、ラクトバチルス・カゼイなどのラクトバチルス属細菌、ラクトコッカス・ラクチスなどのラクトコッカス属細菌、ビフィドバクテリウム・ビフィドゥムなどのビフィドバクテリウム属細菌が挙げられる。

酢酸菌としては、アセトバクター・アセチなどのアセトバクター属細菌が挙げられる。

[0013] 本発明において、酸性加熱処理とは、好ましくはpH6以下、より好ましくはpH5以下、さらに好ましくはpH4以下、特に好ましくはpH3以下の酸性溶液中で加熱処理を行えばよい。下限は特に制限されないが、pH1が例示される。加熱条件は特に限定されないが70°C～200°Cの範囲で行うのが一般的である。尚、好ましくは75°C以上、より好ましくは90°C以上、さらに好ましくは100°C以上、特に好ましくは120°C以上に加熱処理するのが望ましい。加熱は通常1分～120分、好ましくは10分～60分間加熱行えばよい。

[0014] 微生物の菌体を水や緩衝液や培地などに懸濁し、酸性にした後に、加熱することが好ましい。なお、培養終了後の微生物菌体を含む培養液を酸性にした後に、加熱してもよい。例えば、アミノ酸などの物質の発酵生産に使用した微生物菌体を含む培養液(発酵液)を酸性にした後に、加熱してもよい。さらには、微生物を含む有機性汚泥などを水や緩衝液に懸濁し、酸性にした後に、加熱してもよい。有機性汚泥としては、通常の下水处理場から排出される下水汚泥や各種の有機性廃水の生物処理装置から排出される汚泥、及びそれらの余剰汚泥や脱水物などが例示される。なお、酸性加熱処理を行う際には、微生物菌体の濃度を50mg～200g(乾燥重量)/Lに懸濁して行うことが好ましい。

[0015] 酸性加熱処理することによって得られる抽出液(以下、酸性加熱処理液ともいう)は、遠心分離や膜分離などで菌体を除いた後に、病害耐性増強剤として使用することができるが、菌体を含んだまま使用してもよい。

本発明の病害耐性増強剤の施用濃度は植物の種類、生育ステージ、施用方法により適切な濃度に希釈又は濃縮して調製することができる。また、分子量で分画した

画分を用いることもできる。

[0016] 植物病害抵抗誘導活性とは、植物がしばしば細菌、糸状菌などの感染時にその拡大を防除する為に引き起こされる活性酸素の産生、抗菌タンパク質、抗菌化合物の蓄積、細胞壁の強化、キチナーゼ、グルカナーゼ等の殺菌酵素の蓄積に代表される一連の反応である。本活性は実施例記載の方法に従い、キチナーゼまたはグルカナーゼの酵素活性測定および活性酸素測定などにより評価することが可能である。また、PBZ1遺伝子など病害抵抗性関連遺伝子の発現量をRT-PCRなどで調べることによっても評価することができる。

[0017] 本発明の病害耐性増強剤の施用方法の例としては、植物体への散布(葉面散布剤など)または塗布処理や根への浸漬処理、土壌への混合処理などが挙げられる。また、本発明の植物病害防除法は、病害の予防を主な目的としているため、病害が発生する時期に先駆けて使用することが好ましい。ただし、病害の発生後であってもその拡大を抑制したり、病害を減弱する効果は期待できる。

本発明の病害耐性増強剤は、その他の成分を含んでもよい。その他の成分としては、亜鉛や銅などの金属が挙げられる。微生物の酸性加熱処理液の散布でも効果は発揮されるが、亜鉛や銅などの金属を添加することでその効果を増加、持続させることができる。金属の濃度は、金属の重量として施用時に0.0001%~10%(w/v)になるような濃度範囲が好ましい。亜鉛や銅などの金属は、溶液中でイオンを形成するように、塩の形で本発明の病害耐性増強剤に加えることが好ましい。

[0018] 本発明の病害耐性増強剤の対象となる作物は特に制限されず、栽培植物一般を対象とすることができるが、例えば、イネ科植物(イネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシ、エンバク、シバなど)、ナス科植物(トマト、ナス、ジャガイモなど)、ウリ科植物(キュウリ、メロン、カボチャなど)、マメ科植物(エンドウ、ダイズ、インゲンマメ、アルファルファ、ラッカセイ、ソラマメなど)、アブラナ科植物(ダイコン、ハクサイ、キャベツ、コマツナ、ナノハナ、チンゲンサイ、シロイヌナズナなど)、バラ科植物(イチゴ、リンゴ、ナシなど)、クワ科(クワなど)、アオイ科(ワタなど)、セリ科(ニンジン、パセリ、セロリーなど)、ユリ科(ネギ、タマネギ、アスパラガスなど)、キク科(ゴボウ、ヒマワリ、キク、シュンギク、ベニバナ、レタスなど)、ブドウ科(ブドウなど)などである。

[0019] 植物の一般的な病害抵抗反応は病原菌に対して非特異的であることから、対象病害としては、糸状菌、細菌、ウイルスを原因とする植物病害すべてが含まれる。例えば、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、イネごま葉枯病菌 (*Cochliobolus miyabeanus*)、黒斑細菌病、ジャガイモ粉状そうか病菌 (*Spongospora subterranea*)、ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*)、ダイズべと病菌 (*Peronospora manshurica*)、オオムギうどんこ病菌 (*Eryshiphe graminis* f. sp. hordei)、コムギうどんこ病菌 (*Eryshiphe graminis* f. sp. tritici)、ムギ類赤かび病菌 (*Gibberella zeae*)、エンドウ褐紋病菌 (*Mycosphaerella pinodes*)、ムギ類雪腐大粒菌核病菌 (*Sclerotinia borealis*)、コムギ赤さび病菌 (*Puccinia recondita*)、トウモロコシ黒穂病菌 (*Ustilago maydis*)、オオムギ株腐病菌 (*Ceratobasidium gramineum*)、ジャガイモ黒あざ病菌 (*Rhizoctonia solani*)、イネ紋枯れ病 (*Rhizoctonia solani*)、ジャガイモ夏疫病菌 (*Alternaria solani*)、ダイズ紫斑病菌 (*Cercospora kikuchii*)、サツマイモつる割病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. batatas)、メロンつる割病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. melonis)、レタス根腐病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. lactucae)、トマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici)、ハウレンソウ萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. spinaciae)、トマト半身萎凋病菌 (*Verticillium dahliae*)、アブラナ科根こぶ病菌 (*Plasmodiophora brassicae*)、キュウリ苗立枯病菌 (*Pythium debaryanum*)、イチゴ灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、トマト炭そ病菌 (*Colletotrichum phomoides*)、オオムギ、コムギ黒節病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)、ジャガイモ黒あし病菌 (*Erwinia* subsp. *atroseptica*)、イネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*)、ジャガイモそうか病菌 (*Streptomyces scabies*)、ムギ類萎縮ウイルス (Soil-borne wheat mosaic virus)、ダイズモザイクウイルス (Soybean mosaic virus)、アルファルフアモザイクウイルス (Alfalfa mosaic virus)、ジャガイモ葉巻ウイルス (Potato leafroll virus) による病害などが挙げられる。

[0020] 本発明の病害耐性増強剤は微生物の酸性加熱処理液を適当な添加物と混合して液剤、粉剤、粒剤、乳剤、水和剤、油剤、エアゾール、フロアブル剤などのいずれの形態で植物に使用してもよい。さらに所望により緩衝液などを加えてpHを調整し、展着剤や界面活性剤などを加えて植物への浸透性、展着性などの改良を図ることもできる。

[0021] 以下、実施例をもって本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

## 実施例

### [0022] 実施例1 微生物由来の植物用病害耐性増強剤の調製法

微生物菌体はEscherichia coli、Corynebacterium glutamicum、Pantoea ananatis、Bacillus subtilis、またはSaccharomyces cerevisiaeを用いた。各種菌体は培養液100mLあたりおよそ1.5-2.0g(乾燥重量)まで培養を行なった。培養には特開2005-278643、特開2003-259861、再表01/090310などに記載の培地を用いた。

各菌体は6,000rpmで遠心分離して回収し、純水で3回洗浄を行なった後、1.5-2.0g(乾燥重量)につき純水100mLに懸濁した。H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加してpH3.2に調整した後、121°Cで30分間オートクレーブを用いて加熱処理を行なった。得られた溶液を10,000rpmで遠心分離し、不溶成分を除去した。ここで得られた上清を酸性加熱処理液として以降の実験に用いた。植物体への処理には特に記載のない場合は100倍に希釈した溶液を用いた。

### [0023] 実施例2 酵素活性を指標とした植物病害耐性誘導の評価

#### (1)植物体の栽培と散布方法

シロイヌナズナ寒天栽培はOptMS無機塩類培養液(表1)に1% sucrose、0.8% agarを加えた培地で2週間栽培した植物を用いた。日周は16時間明期で光強度はおよそ70  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で栽培した。シロイヌナズナのロックウール栽培は5cm角のロックウール(日東紡社製・サイズV)を用いた。肥料としてOptMS無機塩類培養液(表1)を用いた。日周は14時間明期で光強度はおよそ100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で21日間栽培し、地上部のうち葉柄以外すべてをサンプルとした。各溶液による散布効果は寒天培地またはロックウールで栽培した植物に対して評価し、特に記載のない場合は、実施例1記載の方法で調製した溶液を100倍希釈したもので植物を処理し、処理後24時間の葉内の酵素活性を測定した。散布溶液には展着剤としてアプローチBI(花王)を1/1000濃度で添加した。

[0024] [表1]

KPO <sub>4</sub> (pH5.7)	2.5 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3 mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.5 mM
KNO <sub>3</sub>	2 mM
KCl	2 mM

micro nutrients

Fe(III)-EDTA	0.1 mM
MnCl <sub>2</sub>	0.1 mM
CuSO <sub>4</sub>	0.5 μM
ZnSO <sub>4</sub>	30 μM
NaMoO <sub>4</sub>	1 μM
CoCl <sub>2</sub>	0.1 μM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.1 mM
NaCl	10 μM

[0025] (2) 酵素抽出

酵素活性測定用に植物をサンプリングした後、直ちに液体窒素で凍結し、-80°Cで保存した。凍結状態のまま植物破砕機MM300(QIAGEN)により破砕し500 μLの抽出バッファー[100 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH6.0)、1 mM DTT、protease inhibitor / complete mini EDTA free (Roche)]に溶かした。10,000 rpm 5分間の遠心分離後の上清を0.22 μm フィルターに通し不溶化物を除去した。濃縮および脱塩を目的として限外ろ過フィルターUFV5BG00 (Millipore)に通した。1.5 mlの抽出バッファーを3回に分けて通すことで脱塩を行なった。ここで得られた画分を粗抽出画分とし、Bradford法によるタンパク質濃度測定後、酵素活性測定に用いた。

[0026] (3) キチナーゼ活性測定

キチナーゼ活性はMcCreathらによる方法(J. Microbiol. Methods 14:229- 1992)により求めた。基質である4MU-(GlcNAc)<sub>3</sub> (SIGMA M5639)は最終濃度0.4mMになるように50% エタノール中に溶解し-20°Cで保存した。使用時に10倍に希釈し基質溶液と

した。抽出した粗抽出液を6-8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調製し50  $\mu\text{L}$ を反応に用いた。96穴プレート上で37°Cで10分間のプレインキュベーション後に基質溶液50  $\mu\text{L}$ を添加し37°Cで反応を開始した。反応開始後30分、150分後に反応液に100  $\mu\text{L}$ の1M Gly / NaOH buffer (pH 10.2)を添加し反応を停止した。反応、停止は96ウェルプレート上で行き、最終量200  $\mu\text{L}$ とした。液面の泡を完全に除去した後に蛍光検出用プレートリーダー (WALLAC 1420 ARVO-SX)を用いて蛍光強度を測定した。蛍光測定では360nmエキサイテーション、450nmエミッションにより測定した。反応量は4-MU (メチルウンベリフェロン)を基質をして求めた標準値にもとづき1分間に1  $\mu\text{mol}$ 反応する酵素量を1ユニットと定義した。

[0027] (4)グルカナーゼ活性測定

シロイヌナズナにおけるグルカナーゼ活性測定はAonoらの方法(Appl Environ Microbiol. 58:520- 1992)に従って行なった。可溶性多糖であるラミナリン分解法を用いた。基質であるlaminarin (SIGMA L9634)は最終濃度5mg/mlとなるように滅菌水に溶解し-20°Cで保存した。抽出した粗抽出液を6-8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調製し50  $\mu\text{L}$ に基質溶液50  $\mu\text{L}$ を添加し、37°Cで反応を開始した。反応開始後180分、360分後に反応液100  $\mu\text{L}$ を500  $\mu\text{L}$ のDNS溶液(5g/L dinitrosalicylic acid、16g/L NaOH、300g/L 酒石酸ナトリウムカリウム4水和物)に添加し、98°Cで10分間加熱後氷上で急冷し発色させた。DNS法はMillerによる方法(Anal Chem 31: 426- 1959)により行き、発色後540nmの吸収量にもとづき活性を求めた。反応量はglucoseを基質として求めた標準値にもとづき1分間に1  $\mu\text{mol}$ 反応する酵素量を1ユニットと定義した。

[0028] Corynebacterium菌体の酸性加熱処理液を散布した植物の評価の結果を図1に示した。菌体を加熱または酸性処理した場合に比べて酸性条件下で加熱処理した溶液を散布することで飛躍的なキチナーゼ・グルカナーゼ活性の上昇が認められた。E. coli菌体を材料に行なった評価の結果を図2に示した。Corynebacteriumと同様に酸性条件下での加熱処理が極めて効果的に病害耐性誘導物質を抽出させることが示された。同様にPantoea、Bacillus菌体の酸性条件下での加熱処理液の評価を行なった。図3に示すとおり、いずれもキチナーゼ活性の上昇が認められ、病害耐性誘導効果があることが示された。

また、pH6の溶液中で加熱処理を行って得られたCorynebacterium菌体の酸性加熱処理液を散布した植物の評価の結果を図4に示した。その結果、pH6、75°Cで加熱することによって得られた処理液でもキチナーゼ活性の上昇が認められ、病害耐性誘導効果があることが示された。

また、アミノ酸発酵廃液を主成分とする工場排水の活性汚泥処理装置より発生した余剰汚泥を脱水し、 $H_2SO_4$ 水溶液を添加してpH3.2に調整した後、121°Cで20分間加熱処理を行った後、得られた溶液を10,000rpmで遠心分離し、不溶成分を除去して得られた上清を酸性加熱処理液として用いた場合の結果を図5に示す。その結果、余剰汚泥に含まれる微生物の酸性加熱処理液にも、病害耐性誘導効果があることが示された。

これらの結果から、様々な菌体を酸性条件下で加熱処理することで微生物から病害耐性誘導物質が抽出されることが判った。

$ZnSO_4$ を亜鉛Znの重量比率0.01%として散布液に混合した場合の効果を検証した結果を図6と図7で示した。菌体酸性加熱処理液やZn単独の場合と比較して、菌体酸性加熱処理液+Znでは、酵素活性上昇が強くなる傾向が認められた。この効果はCorynebacterium(図6)およびE.coli(図7)菌体で共通に認められ、特にグルカナーゼの活性において顕著であった。さらに処理後24時間よりも72時間目においてその効果は顕著であり、持続的に効果を発揮させる上でZnの添加が有効であることが示された。

また、 $CuSO_4$ を銅Cuの重量比率0.01%として散布液に混合した場合の効果を検証した結果を図8で示した。その結果、各種菌体酸性加熱処理液にCuを加えた場合には酵素活性上昇が強くなる傾向が認められた。

#### [0029] 比較例 既知の病害耐性誘導物質との効果比較

過去に菌体の細胞壁を構成するペプチドグリカンやリポポリサッカライド(LPS)を植物が認識し、病害耐性誘導が引き起こされることが報告されており、それらの物質との効果の比較を行なった。ペプチドグリカンはinvivogen社製の標品(PGN-ECndss ul trapure)をリポポリサッカライドはシグマ製の標品(L8643)を用い、それぞれ効果があることが示されている100mg/L濃度でシロイヌナズナへの葉面散布を行い24時間後

の酵素活性を測定した。図9に示すとおり、これらの物質ではキチナーゼの活性上昇は認められず、菌体酸性加熱処理液の葉面散布時の病害耐性誘導効果がこれらの物質よりも顕著に強いことが示された。

また、プロリン(Pro)発酵液の上清の散布により、病原菌の感染が防除できるとの先行知見(特開平6-80530号公報)にもとづき、これと本願の菌体酸性加熱処理液との効果の比較検討を実施した。Pro発酵菌体(コリネバクテリウム グルタミカムATCC21159)は文献に記載の方法で培養を行い、アミノ酸分析計(日立 L-8800)を用いてアミノ酸分析を行った。植物体への処理にはアミノ酸の総量が50ppmとなるように希釈した溶液を用いた。図10に示すとおり、Pro発酵液上清の葉面散布では有意な酵素活性上昇は認められなかった。

#### [0030] 実施例3 シロイヌナズナへの黒斑細菌病の感染防除効果

病原菌である*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*はYEP培地で24時間培養した。培養後の菌体を3,000rpmで回収し、 $5 \times 10^6$  cfu/mLとなるように10mM  $\text{MgSO}_4$ 水溶液に懸濁した。菌体懸濁液を針をつけていない1mLシリンジにて葉内に注入し感染させた。感染後3日目に観察を行い、被病性を確認した。

試験では、前処理を展着剤のみまたは展着剤+酸性加熱処理液を散布して行い、その24時間後に病原菌を感染させた。図11に示すとおり、展着剤のみに比べ、展着剤+酸性加熱処理液では顕著に感染が抑制されていることが示された。

#### [0031] 実施例4 イネにおける病害耐性誘導とイネいもち病感染防除効果

##### (1) イネの栽培と散布方法

イネ(品種:日本晴)種子を3日間水に浸して催芽し、園芸用培土(パワーソイル(関東肥料工業株式会社(呉羽化学工業株式会社))とバーミキュライト(エス・ケー・アグリ株式会社)を4:1で混合したものに播種して、温室内で栽培した。温室では自然光で14日間栽培し、本葉4.5葉齢期の植物をサンプルとして用いた。

##### [0032] (2) グルカナーゼ活性測定

イネにおけるグルカナーゼ活性測定はInuiらの方法(Biosci Biotechnol Biochem. 61: 975- 1997)に従って行なった。試料(酸性加熱処理液)は本葉4.5葉齢期の第4本葉の表面10ヶ所に2  $\mu$  Lずつのせ、24時間後にこの葉を液体窒素で凍結後、ホモジ

ナイズ抽出した。抽出した粗抽出液100  $\mu$  Lに900  $\mu$  Lの基質溶液(1% Curdlan (SIGMA C7821), 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-citric buffer, (pH5.0))を添加し、37°Cで反応を開始した。反応開始60分後に反応液50  $\mu$  Lを200  $\mu$  LのDNS溶液(5g/L dinitrosalicylic acid, 16g/L NaOH, 300g/L 酒石酸ナトリウムカリウム4水和物)に添加し、98°Cで10分間加熱後、氷上で急冷し発色させた。DNS法はMillerによる方法(Anal Chem 31: 426-1959)により行い、発色後540nmの吸収量にもとづき活性を求めた。反応量はglucoseを基質として求めた標準値にもとづき1分間に1  $\mu$  mol反応する酵素量を1ユニットと定義した。

実施例1記載の方法で調製した、Corynebacterium菌体の酸性条件下で加熱処理した溶液を希釈せずに用いてイネを処理し、その24時間後のグルカナーゼ活性を測定した。図12で示すとおり、対照と比較し、菌体酸性加熱処理液の散布により有意にグルカナーゼ活性が上昇することが示された。

[0033] (3) イネへのイネいもち病の感染防除効果

本葉4.5葉齢期のイネの葉全体に実施例1記載の方法で調製したCorynebacterium菌体の酸性加熱処理液を10倍希釈した試料をスプレーし、24時間栽培した後、イネいもち病菌(学名: Magnaporthe oryzae)の分生孢子懸濁液( $1 \times 10^5$  分生孢子/mL)を噴霧接種した。噴霧接種後、暗所、湿室下に24時間放置することにより、いもち病菌を感染させた。接種6日後に各処理区の第4本葉に発生した罹病性病斑数を測定することにより防除価を算出した。防除価の算出は、防除価=(対照区平均病斑数-各区の試料処理区平均病斑数/対照区平均病斑数) $\times 100$ とした。図13に示すとおり、対照と比較し、菌体酸性加熱処理液の散布により有意に病原菌の感染を防除できることが示された。

[0034] 実施例5 各種植物における活性酸素産生を指標とした病害耐性誘導評価

各植物は土-メトロミックス(ハイポネックスジャパン)に播種し、光強度はおおよそ100  $\mu$  mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、14時間明期、10時間暗期のサイクルで、21日間栽培した植物の新鮮な本葉を評価に用いた。

活性酸素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)の測定には、Kunzeらの方法(Plant Cell, 16, 3496-2004)を変更して行なった。植物の葉を約3mm四方に裁断し、一晚滅菌水に漬けた後に、各菌体(1

. Corynebacterium、2. E.coli、3. Bacillus、4. Pantoea、5. Saccharomyces cerevisiae)の酸性加熱処理液を含む水溶液に移しH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を発生させて、その水溶液を反応液(50mMリン酸バッファー(pH5.8)、5 μ M Amplex Red (Invitrogen)、1 μ g/mL Horseradish Peroxidase (Sigma Aldrich P8515) に添加し、Excitation 544nm、Emission 590nmで測定した。各実験は4反復以上繰り返し以下の基準に従って判定を行なった。

(判定方法)

- 1) 各実験回において、平均値が対照よりも5倍以上増加(+2)、2倍以上増加(+1)
- 2) 各実験回において、有意差検定を行ないp値が<0.01の場合は(+2)、<0.05の場合(+1)
- 3) 総和を実験回で割り、1以上を(++)、0.5以上を(+)と表記した。

表2に示すとおり、様々な植物で活性酸素の発生が確認できたことから、菌体酸性加熱処理液の処理による病害耐性誘導が種特異的ではないことが示された。

表2中の1はCorynebacterium glutamicum, 2はE.coli, 3はBacillus subtilis, 4はPantoea ananatis, 5はSaccharomyces cerevisiaeの酸加熱処理液による葉片からの活性酸素発生測定の結果を示す。またn.d.は測定せずを意味する。

[0035] [表2]

学名	和名	1	2	3	4	5
<i>Spinacia oleracea</i>	ホウレンソウ	+	++	+	+	+
<i>Brassica rapa var. peruviridis</i>	コマツナ	++	++	+	-	-
<i>Raphanus sativus</i>	ダイコン	++	++	++	-	++
<i>Brassica oleracea var. capitata</i>	キャベツ	++	++	++	-	n.d
<i>Brassica rapa var. chinensis</i>	チンゲンサイ	++	++	++	+	++
<i>Brassica rapa var. glabra Regel</i>	ハクサイ	++	++	-	-	+
<i>Brassica rapa var. nippo-oleifera</i>	ナノハナ	++	++	-	-	-
<i>Zoysia japonica</i>	シバ	+	++	++	++	n.d
<i>Oryza sativa</i>	イネ	++	++	++	++	++
<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	-	+	++	++	++
<i>Triticum aestivum</i>	コムギ	+	++	+	++	++
<i>Cucumis sativus</i>	キュウリ	++	+	++	++	++
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	シュンギク	++	++	++	-	n.d
<i>Lactuca sativa</i>	レタス	++	++	++	++	++
<i>Carthamus tinctorius</i>	ベニバナ	-	++	++	++	++
<i>Allium cepa</i>	タマネギ	++	++	++	+	++
<i>Pisum sativum</i>	エンドウ	+	++	-	-	-
<i>Glycine max</i>	ダイズ	++	++	+	+	++
<i>Vicia faba</i>	ソラマメ	++	++	++	++	++
<i>Allium fistulosum</i>	ネギ	++	++	++	+	++

[0036] 実施例6 アスパラガス、イチゴ、ブドウの活性酸素産生を指標とした病害抵抗性誘

## 導評価

活性酸素の測定は基本的に実施例5記載の方法で行なった。アスパラガスは実施例5記載の方法で1ヶ月間栽培した植物体から葉を回収し、活性酸素発生を測定した。イチゴとブドウはそれぞれ苗を購入し、温室内、25°Cで2-3週間栽培し順化した後に健全な葉を選んで回収し、活性酸素発生を測定した。処理液はCorynebacterium酸性加熱処理液を限外ろ過により5kDa以上から30kDa以下に分画した液を用いた。限外ろ過には分子量分画は限外ろ過フィルター(Amicon Ultra-15 centrifugal filter; 30 K NMWL, 5K NMWL; Millipore)を用いた。測定は相対的な蛍光強度を活性酸素発生量としてコントロールと比較した。図14に示す通り、上記分画液はアスパラガス、イチゴ、ブドウへの処理においても顕著な活性酸素産生を誘導することが示された。

### [0037] 実施例7

Corynebacterium処理液によるキャベツのキチナーゼ活性に対する効果

キャベツを土に播種し、3週間栽培後、第一番目の本葉にCorynebacterium酸性加熱処理液を10倍希釈で注入処理し48時間後のキチナーゼ活性を測定した。対照は水処理を行なった。図15に示す通り、対照と比較し菌体酸性加熱処理液の散布により有意にキチナーゼ活性が上昇していることが示された。

### [0038] 実施例8

Saccharomyces cerevisiae酸性加熱処理液によるイネに対する効果

実施例4記載の方法に従い、Saccharomyces cerevisiae酸性加熱処理液によるイネに対する効果をグルカナーゼ活性の上昇および感染防除効果を測定することで調べた。図16に示す通り、Saccharomyces cerevisiae酸性加熱処理液(等倍希釈)の散布により有意にグルカナーゼ活性が上昇していることが示され、また図17に示す通り、Saccharomyces cerevisiae酸性加熱処理液(5倍希釈)の散布により有意に病原菌の感染を防除できることが示された。

### [0039] 実施例9 イネの根に対する菌体酸加熱処理液処理による病害抵抗性遺伝子発現誘導

OptMS無機塩類培養培地(表1)に0.8% Agarを加えた寒天培地を充填した1mLチップをチップラックにセットし、培地上に滅菌済みのイネ(品種:コシヒカリ)の種子を播

種した。チップは根が伸展できるよう下端から約20mm以下の部分を切り落とし、乾燥を防ぐため切り口を純水に漬けた状態で1週間栽培した。チップ上で成長したイネ幼苗に厚さ20mmの発泡スチロールの浮きを装着し、OptMS 1Lを入れたフードパック(C-APフルーツ200、中央化学(株))に浮かべた。この状態でさらに1週間栽培し、トータルで2週間栽培した4.5葉期のイネを実験材料とした。テクノポット(住友ベークライト(株))の底部に処理液を100mL入れ、水耕栽培で2週間生育させたイネを根が処理液に十分浸る状態で発泡スチロールごと浮かべた。処理液は20%濃度のCorynebacterium酸性加熱処理液を用いた。発泡スチロールはあらかじめテクノポットに収まるサイズに調整した。栽培は恒温植物インキュベーター(コイトロン、小糸工業(株))内で、日周16時間明期8時間暗期、温度28°C、光強度約 $150 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で行った。根への処理後15時間後にサンプリングを行ない、サンプルは根全体を1サンプルとした。各サンプルからRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出した。Total RNAをRNase free DNase Set (QIAGEN)を用いてDNase処理した後、逆転写酵素High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いてoligo dT primerから逆転写を行ない、合成した1本鎖cDNAを鋳型として定量PCRを行なった。定量PCRはABI PRISM 7500を用い、反応条件は95°C 15秒 60°C 60秒を40サイクルで行った。試薬はPower SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いた。定量する遺伝子にはハウスキーピング遺伝子としてRAc1 (RAP code、Os11g0163100)、病害抵抗性関連遺伝子としてPBZ1 (RAP code、Os12g0555200)を用いた。各遺伝子発現用プライマーは以下を用いた:5'-CCCCTTGTGTGTGACAATGG-3' (配列番号1)と5'-CCCTGGGCGCATCGT-3' (配列番号2)(RAc1)、5'-GAGCAGGAGAAGATGATCG-3' (配列番号3)と5'-TTCTTCTCACATGCGACCAC-3' (配列番号4)(PBZ1)。PBZ1の発現量はRAc1の発現量で標準化した。結果を図18に示す。根に処理した場合、根においてはPBZ1遺伝子発現量が増加することが示された。

#### 産業上の利用可能性

[0040] 本発明の病害耐性増強剤はアミノ酸等の発酵を行なった後の各種微生物菌体残渣や有機性汚泥に含まれる微生物菌体を酸性溶液中で加熱処理(酸性加熱処理)

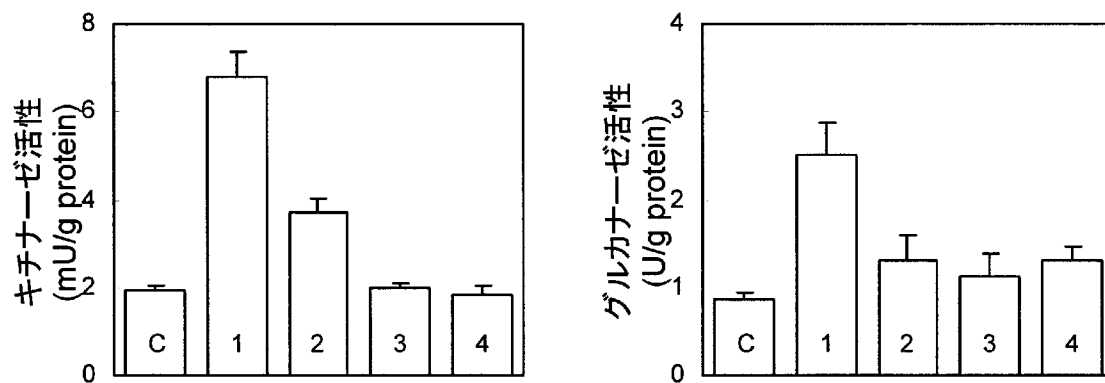
することで容易に得られ、さらに低濃度(例えば、菌体乾燥重量200mg/Lを酸性加熱処理)で効果が発揮されることから、コスト面、大量調製が容易に達成されることができると考えられる。

殺菌剤など植物病原菌に対して直接作用するタイプの農薬は、病原菌に対して殺菌効果を示すものが多いが、継続的な使用により薬剤に対して耐性変異株が出現するのに対して、耐性誘導型農薬は、薬剤の耐性変異株が出現しにくく、長期間にわたる使用が可能であることが知られている。このようなことから、微生物菌体の酸性加熱処理液が抗菌活性よりはむしろ、病害耐性を誘導することによって病原菌の感染を防ぐということは、耐性変異株が出現しにくく、長期間にわたる使用が可能であるために、産業上極めて有用である。

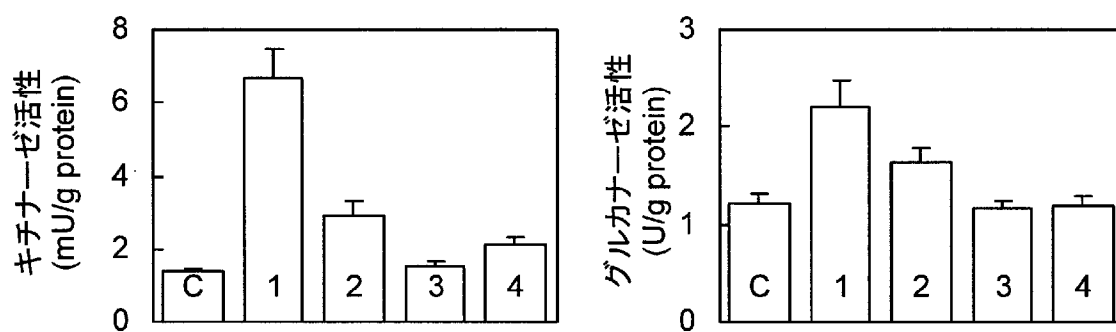
## 請求の範囲

- [1] 微生物菌体を酸性溶液中で加熱処理することにより得られる抽出液を含む、植物用病害耐性増強剤。
- [2] 酸性溶液中での加熱処理が、pH6以下の溶液中で70℃以上に加熱する処理である、請求項1記載の病害耐性増強剤。
- [3] 微生物がEscherichia属細菌、コリネ型細菌、Pantoea属細菌、Bacillus属細菌、酵母、乳酸菌、または酢酸菌である、請求項1または2記載の病害耐性増強剤。
- [4] 葉面散布剤である、請求項1～3のいずれか一項に記載の病害耐性増強剤。
- [5] さらに金属を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の病害耐性増強剤。
- [6] 金属が亜鉛及び／又は銅である、請求項5記載の病害耐性増強剤。
- [7] 請求項1～6のいずれか一項に記載の病害耐性増強剤で植物を処理することを特徴とする、植物の病害を防除する方法。

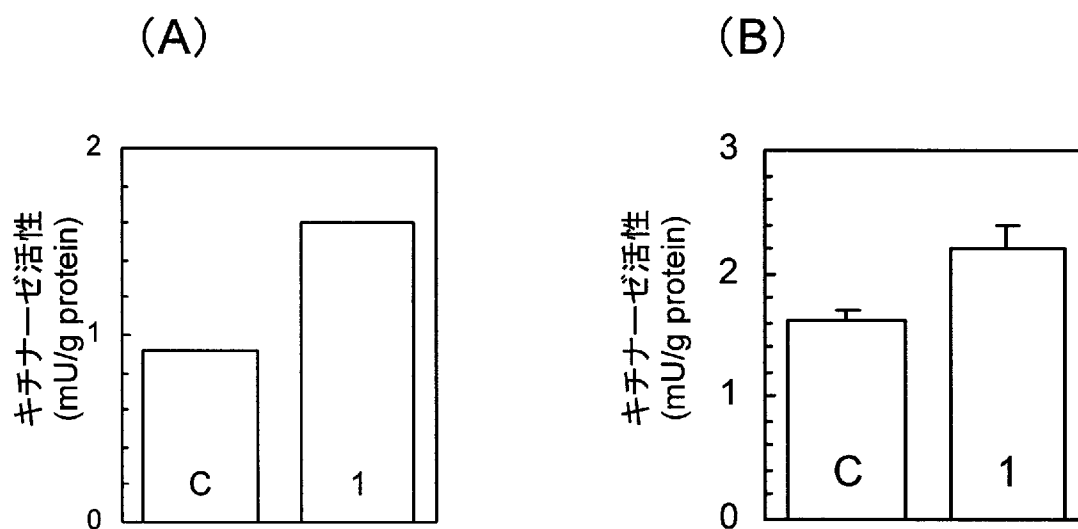
[図1]



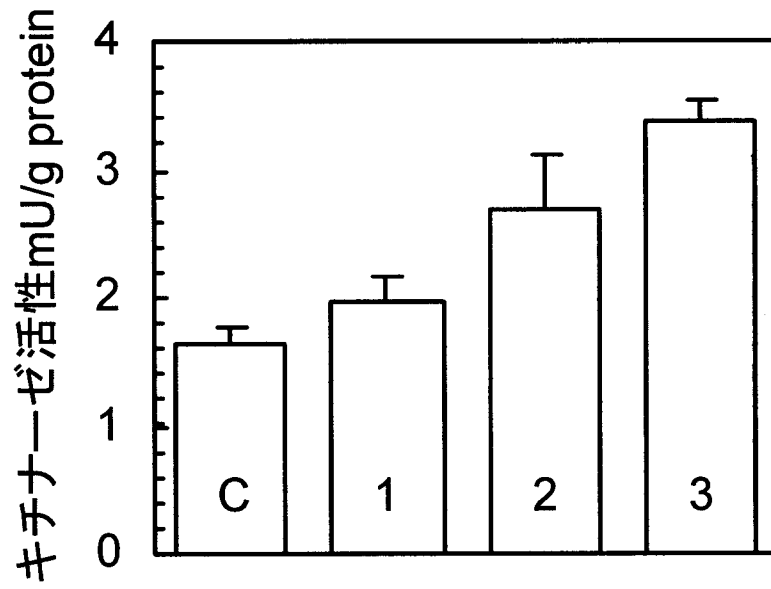
[図2]



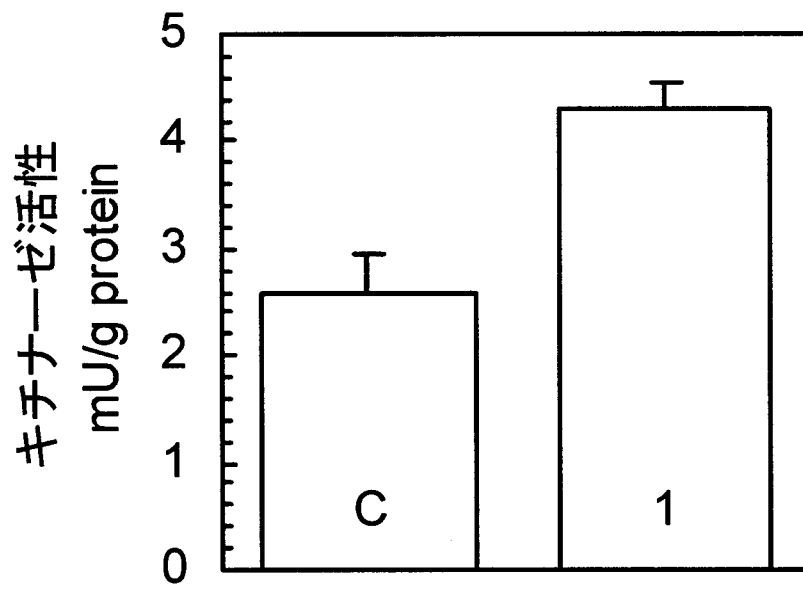
[図3]



[図4]

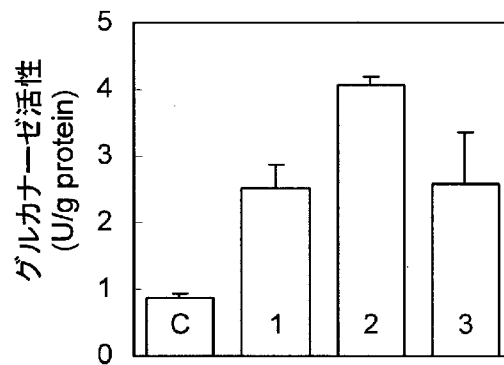
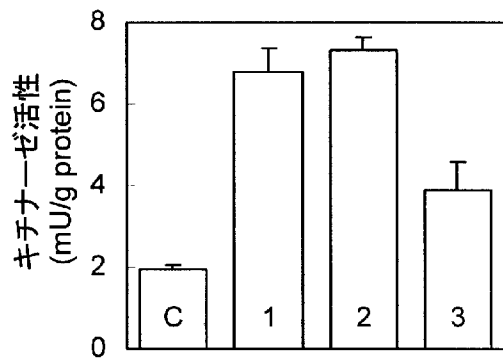


[図5]

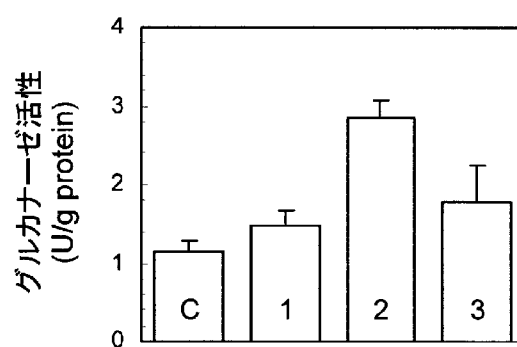
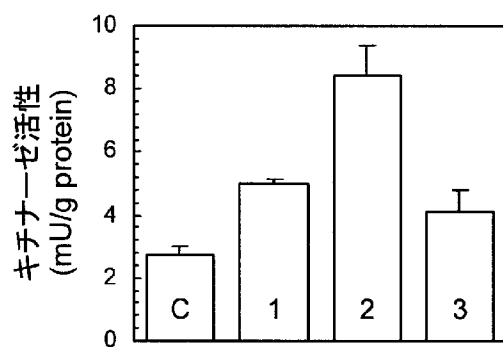


[図6]

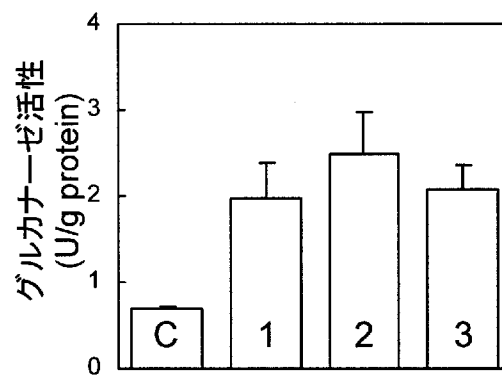
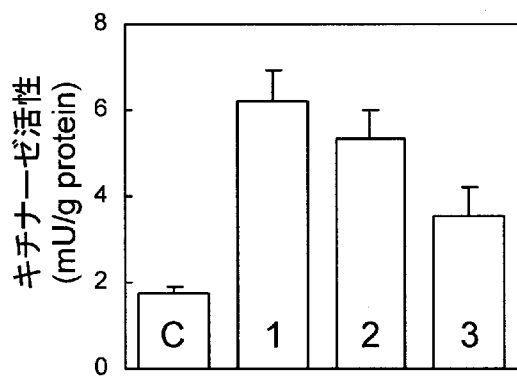
処理24時間



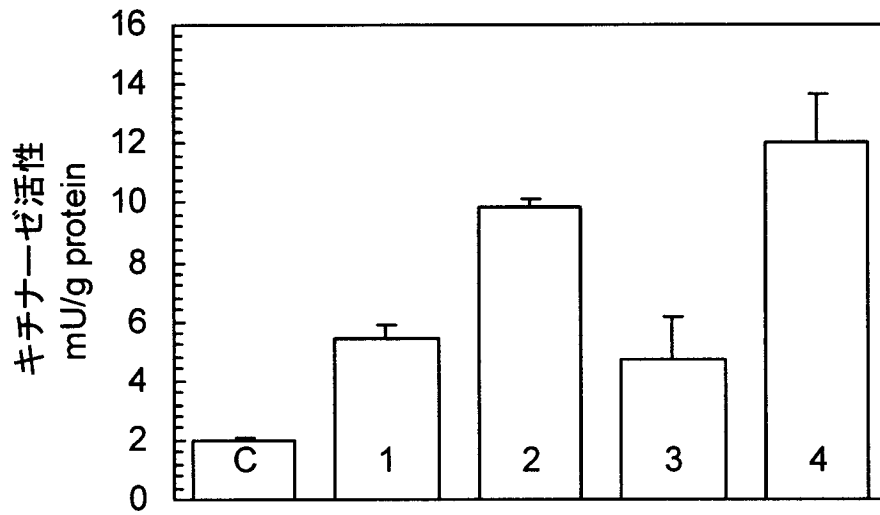
処理72時間



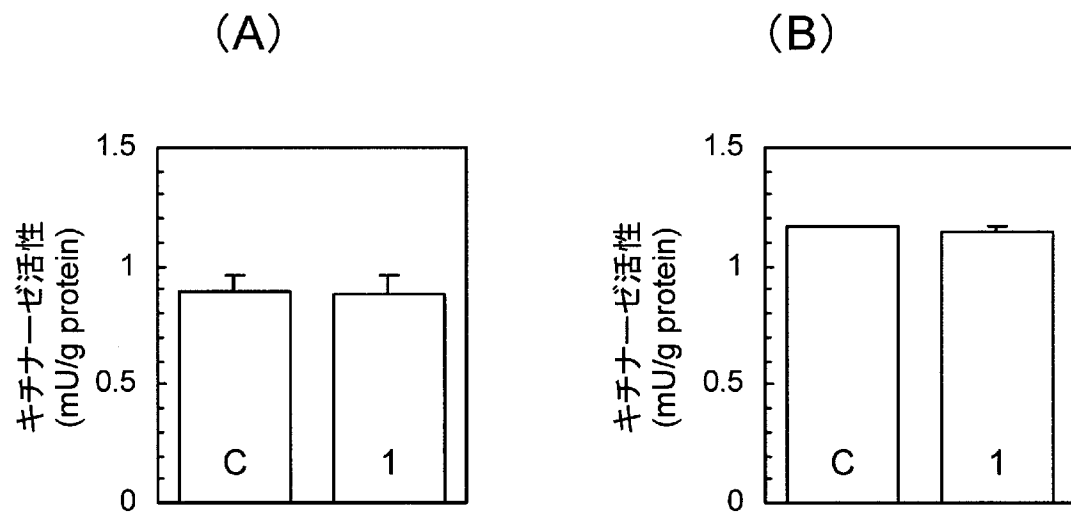
[図7]



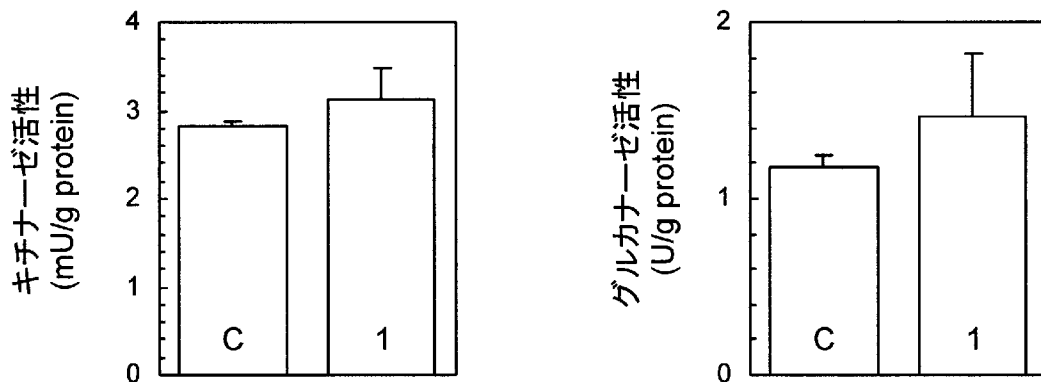
[図8]



[図9]

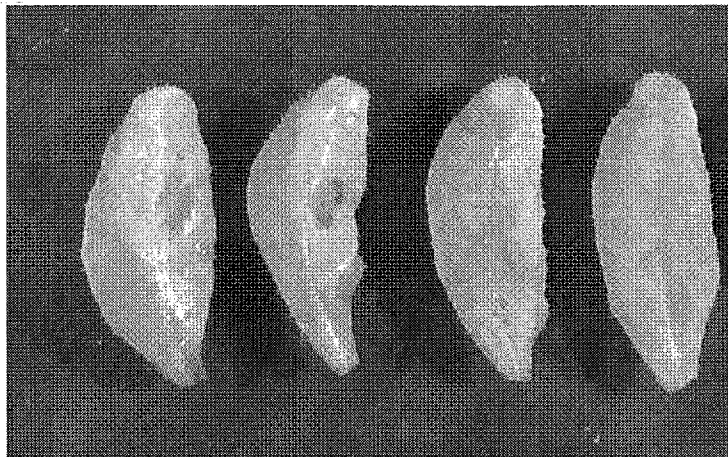


[図10]



[図11]

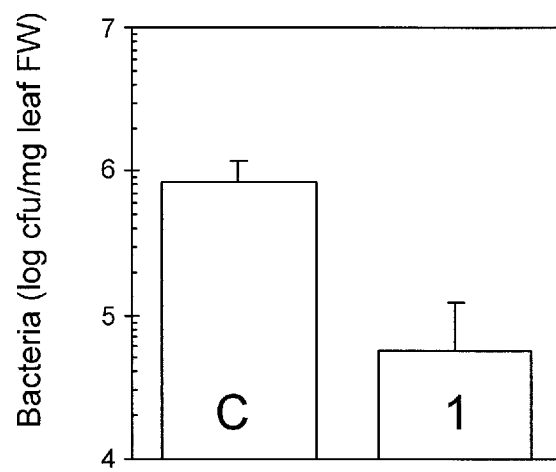
(A)



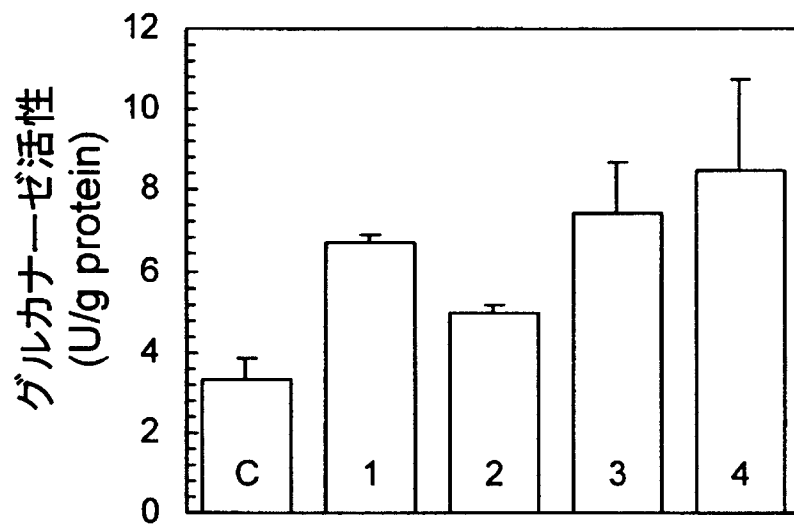
对照

Corynebacterium  
酸加熱処理前処理区

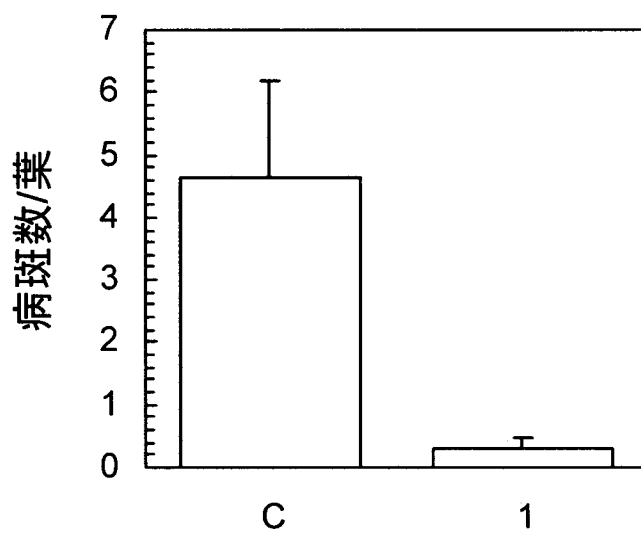
(B)



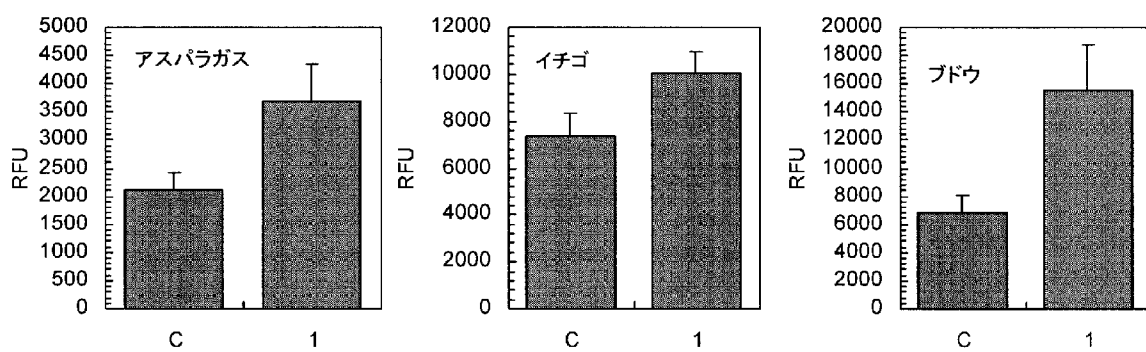
[図12]



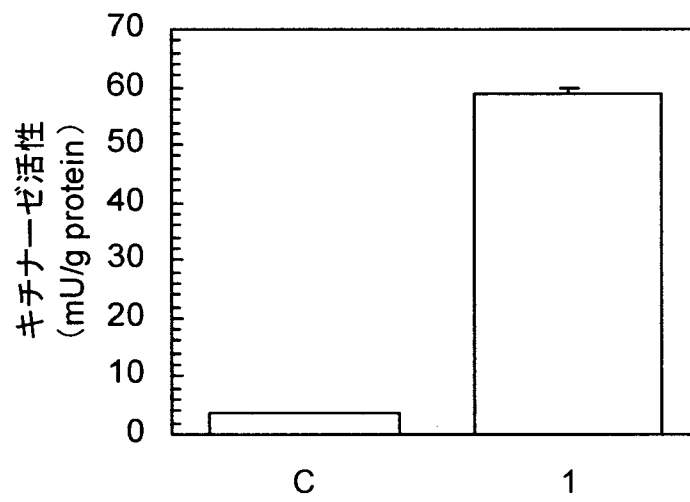
[図13]



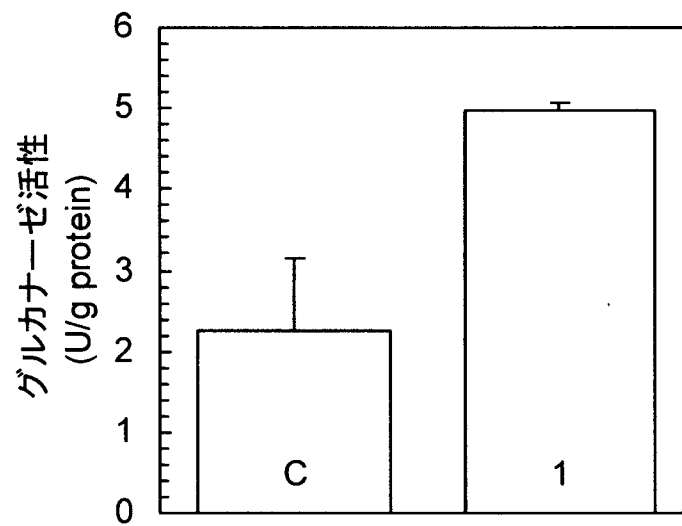
[図14]



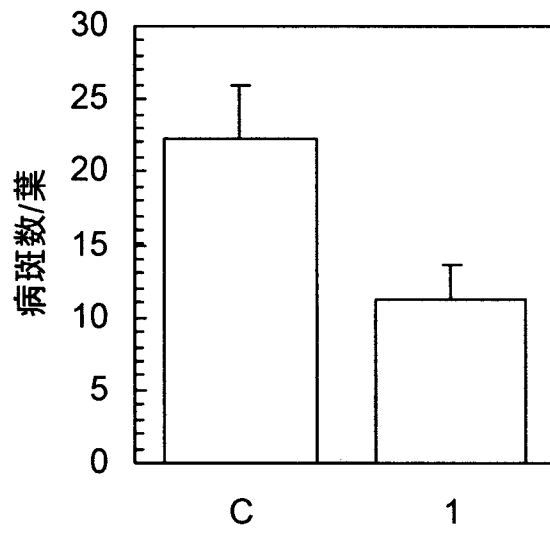
[図15]



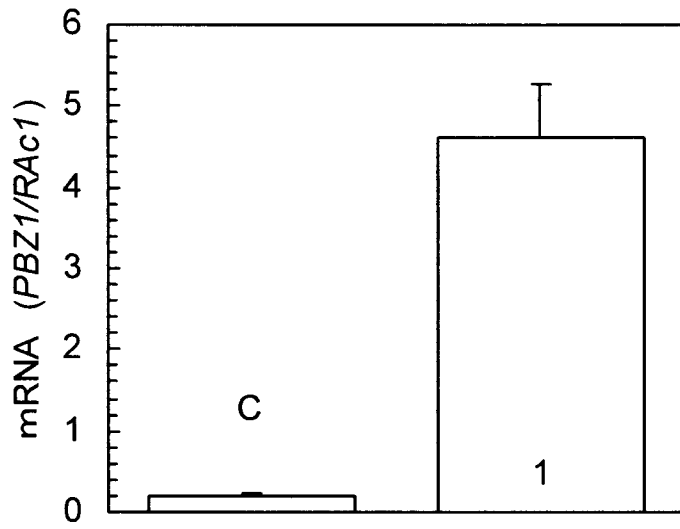
[図16]



[図17]



[図18]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/050216

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N63/02(2006.01)i, A01N59/16(2006.01)i, A01N59/20(2006.01)i, A01P3/00(2006.01)i

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)

A01N63/02, A01N59/16, A01N59/20, A01P3/00

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	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-530032 A (Korea Research Institute of Chemical Technology), 01 November, 2007 (01.11.07), Claims; Par. No. [0060] & WO 2005/090553 A1 & CN 1934241 A	1-7
A	JP 2007-77065 A (Meiji University), 29 March, 2007 (29.03.07), Claims (Family: none)	1-7
A	JP 2007-70292 A (Asahi Breweries, Ltd.), 22 March, 2007 (22.03.07), Claims (Family: none)	1-7

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

\* Special categories of cited documents:

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

"E" earlier 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
21 January, 2009 (21.01.09)Date of mailing of the international search report  
03 February, 2009 (03.02.09)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2009/050216

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 6-80530 A (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.), 22 March, 1994 (22.03.94), Claims (Family: none)	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. A01N63/02(2006.01)i, A01N59/16(2006.01)i, A01N59/20(2006.01)i, A01P3/00(2006.01)i

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. A01N63/02, A01N59/16, A01N59/20, A01P3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの  
 日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2009年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2009年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2009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)

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 2007-530032 A (コリア リサーチ インスティテュート オブ ケミカル テクノロジー) 2007. 11. 01, 請求の範囲、段落【0060】 & WO 2005/090553 A1 & CN 1934241 A	1-7
A	JP 2007-77065 A (学校法人明治大学) 2007. 03. 29, 請求の範囲 (ファミリーなし)	1-7
A	JP 2007-70292 A (アサヒビール株式会社) 2007. 03. 22, 請求の範囲 (ファミリーなし)	1-7

C欄の続きにも文献が列挙されている。  パテントファミリーに関する別紙を参照。

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

国際調査を完了した日 21. 01. 2009	国際調査報告の発送日 03. 02. 2009
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 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) 太田 千香子 電話番号 03-3581-1101 内線 3481

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 6-80530 A (三井東圧化学株式会社) 1994.03.22, 請求の範囲 (ファミリーなし)	1-7

## 第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

- a. タイプ  配列表  
 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット  紙形式  
 電子形式
- c. 提出時期  出願時の国際出願に含まれていたもの  
 この国際出願と共に電子形式により提出されたもの  
 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2.  さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：