(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2007 年9 月7 日 (07.09.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/100162 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/00* (2006.01)
A01G 7/00 (2006.01) *A01P 3/00* (2006.01)
A01M 29/02 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/054624

(22) 国際出願日: 2007 年3 月2 日 (02.03.2007)

(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2006-058483 2006 年3 月3 日 (03.03.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社前川製作所 (MAYEKAWA MFG. CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1358482 東京都江東区牡丹二丁目１３番１号 Tokyo (JP). 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 伊沢剛 (ISAWA, Tsuyoshi) [JP/JP]; 〒1358482 東京都江東区牡丹二丁目１３番１号株式会社前川製作所内 Tokyo (JP). 安田美智子 (YASUDA, Michiko) [JP/JP]; 〒1358482 東京都江東区牡丹二丁目１３番１号株式会社前川製作所内 Tokyo (JP). 篠崎聰 (SHINOZAKI, Satoshi) [JP/JP]; 〒1358482 東京都江東区牡丹二丁目１３番１号株式会社前川製作所内 Tokyo (JP). 仲下英雄 (NAKASHITA, Hideo) [JP/JP]; 〒3510198 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 Saitama (JP). 工藤俊章 (KUDO, Toshiaki) [JP/JP]; 〒3510198 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 Saitama (JP).

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19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, 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.

(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, 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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) **Title:** NOVEL BACTERIUM AND METHOD FOR CONTROL OF PLANT DISEASE USING THE SAME

(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) **Abstract:** The object is to provide a means for imparting resistance against a disease caused by a pathogenic mold, bacterium or virus to an agriculturally useful plant. Disclosed are: a bacterium which belongs to the genus *Azospirillum* or *Herbaspirillum* and can live symbiotically in a plant to impart resistance against a disease caused by a pathogenic mold, bacterium or virus to the host plant; a method for control of a plant disease using the bacterium; and a plant produced by the method.

(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。

WO 2007/100162 A1

明　細　書

新規細菌及びそれを用いた植物病害の防除方法

技術分野

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

これまでの化学農薬を中心とした病害虫防除技術は、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

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

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

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。

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：Ssclerophthora 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。

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 blach-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、ソラマメウイルトファバ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、ブ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・スティープ・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砕手段で粉砕されてもよい。

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。

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、潅注、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潅注処理する場合には、懸濁液中の本発明の細菌の濃度は 10^4～10^{12} CFU/ml が好ましい。

実施例１

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. Micribiol. 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。

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。

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

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
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
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
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
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
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
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
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

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. Micribiol. 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。

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 ATCC19308 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

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

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/GeneBank 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 ClastalW 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砕装置で出来る限り細かく破砕した。その破砕液から 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 484 bp 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 298 bp 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 356 bp 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 241 bp 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

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'– CACTACGTCTTGCGTTTTGTG	–3'	63.20	21
	nest 4	5'– CGCAAGAACCGAAGTCCT	–3'	62.99	18

表４

Azospirillum属新規細菌の第1のPCRの条件

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

Azospirillum属新規細菌の第2のPCRの条件

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

表５

Herbaspirillum属新規細菌の第1のPCRの条件

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

Herbaspirillum属新規細菌の第2のPCRの条件

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

実施例４

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。

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 3～4 X 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砕装置で出来る限り細かく破砕した。破砕液を弱く遠心し、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。

植物破砕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、無接種植物の破砕液、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

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 cm x 2 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 10^5～10^9CFU/ml になるように潅注処理した。エンドファイト処理 5 日後にいもち病菌の胞子懸濁液 (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。

(結果)

Azospirillum属新規細菌及びHerbaspirillum属新規細菌の 10^8CFU/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

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%

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%

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%

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%

実施例６

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。

（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（5x5x5 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。

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 10^6～10^8CFU/ml になるように潅注処理した。エンドファイト処理 5 日後に Pst DC3000 (1×10^7 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10^7CFU/mlになるように潅注処理した。エンドファイト処理10日後と15日後にPst DC3000（1×10^7 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。

3）エンドファイト処理がPstDC3000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10^7又は10^8 CFU/mlになるように潅注処理した。処理後15日後にPst DC3000（2×10^5 CFU/ml）を接種し、3日後の葉を回収し、10mM $MgCl_2$中で磨砕した。磨砕液を三段階に希釈し、NB平板培地（rifanpicin 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10^6から10^8 CFU/mlで処理した結果、エンドファイト処理濃度が高いほどPst DC3000の病徴を抑制する傾向が認められた（図4）。

2）Azospirillum属新規細菌処理区では処理期間が長い方がPst DC3000の病徴抑制効果が高い傾向が観察された。

Herbaspirillum属新規細菌処理区では処理期間が異なっていてもPst DC3000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Pst DC3000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Pst DC3000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）。

表9

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

実施例7

コマツナにおける、Azospirillum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（Albugo macrospora）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

Azospirillum 属新規細菌は、500 ml 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 $MgCl_2$ 溶液に懸濁させた後、菌濃度を 1×10^9 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claysoil、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 5×10^7CFU/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。

（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）

エンドフィト無処理区の発病度 21.8 に対して、Azospirillum 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、Azospirillum 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

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

産業上の利用可能性

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。

請求の範囲

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、請求項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、請求項１又は２記載の方法。

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。

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、請求項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。

図１－１

```
                                                  10        20        30
Azospirillum                                AACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAAC
                                            ::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650     AGAGTTTGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAAC
                      10        20        30        40        50        60

                40        50        60        70        80        90
Azospirillum GATGGCTTCGGCCATAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTCGGTTC
             :: :::::::::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650     GAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACACGTGGGAACCTGCCTTTCGGTTC
                      70        80        90       100       110       120

               100       110       120       130       140       150
Azospirillum GGAATAACGTCTGGAAACGGACGCTAACACCGGATACGCCCTTTTGGGGAAAGTTTACGC
             :::::::::::::::: :::::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::
AF521650     GGAATAACGTCTGGAAATGGACGCTAACACCGGATACGCCCTATTGGGGAAAGTTTACGC
                     130       140       150       160       170       180

               160       170       180       190       200       210
Azospirillum CGAGAGAGGGGCCCGCGTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCACCAAGCCGACG
             :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: ::::::::::
AF521650     CGAGAGAGGGGCCCGCGTCGGATTAGGTAGTTGGTGTGGTAACGGCGCTCCAAGCCGACG
                     190       200       210       220       230       240

               220       230       240       250       260       270
Azospirillum ATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
             ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650     ATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
                     250       260       270       280       290       300

               280       290       300       310       320       330
Azospirillum CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCC
             ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650     CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCC
                    310       320       330       340       350       360

               340       350       360       370       380       390
Azospirillum GCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACGGT
             ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650     GCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCGCACGCGACGATGATGACGGT
                     370       380       390       400       410       420

               400       410       420       430       440       450
Azospirillum AGCGTGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCT
             ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650     AGCGTGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCT
                     430       440       450       460       470       480

               460       470       480       490       500       510
Azospirillum AGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCCTTGTCAGTCAGAAGTG
             :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::  : ::::::::::
AF521650     AGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCCTGTTTAGTCAGAAGTG
                     490       500       510       520       530       540
```

図１－２

```
                520        530        540        550        560        570
Azospirillum AAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACCGCTTTTGATACTGCAAGGCTTGAGTTCCGGAGAG
             :::::::::::::::::::::::::  ::::::::::::  ::::::::::::::::::
AF521650     AAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATAGCTTTTGATACTGGCAGGCTTGAGTTCCGGAGAG
                    550        560        570        580        590        600

                580        590        600        610        620        630
Azospirillum GATGGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGC
             ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650     GATGGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGC
                    610        620        630        640        650        660

                640        650        660        670        680        690
Azospirillum GAAGGCGGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
             ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650     GAAGGCGGCCATCTGGACGGACACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
                    670        680        690        700        710        720

                700        710        720        730        740        750
Azospirillum ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGACGTCGGGGTGCATGCA
             ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650     ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGACGTCGGGGTGCATGCA
                    730        740        750        760        770        780

                760        770        780        790        800        810

Azospirillum CTTCGGTGTCGCCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA
             ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650     CTTCGGTGTCGCCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA
                    790        800        810        820        830        840

                820        830        840        850        860        870
Azospirillum AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC
             ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650     AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC
                    850        860        870        880        890        900

                880        890        900        910        920        930
Azospirillum AACGCGCAGAACCTTACCAACCCTTGACATGTCCACTATGGGCTTGAGAGATCAGGTCCT
             :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: ::::::: :::::::
AF521650     AACGCGCAGAACCTTACCAACCCTTGACATGTCCACTATGGGCTTCAGAGATGAGGTCCT
                    910        920        930        940        950        960

                940        950        960        970        980        990
Azospirillum TCGGTTCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT
             ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650     TCGGTTCGGCCGGGTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT
                    970        980        990       1000       1010       1020

               1000       1010       1020       1030       1040       1050
Azospirillum GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCAGTTGCCATCATTCAGTTGGG
             ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650     GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTACCGTCAGTTGCCATCATTCAGTTGGG
                  1030       1040       1050       1060       1070       1080

               1060       1070       1080       1090       1100       1110
Azospirillum CACTCTGGTGGAACCGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCCTCA
             ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650     CACTCTGGTGGAACCGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCCTCA
                   1090       1100       1110       1120       1130       1140
```

図１－３

```
                1120       1130       1140       1150       1160       1170
Azospirillum    TGGCCCTTATGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCGAAGT
                :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: :::::::
AF521650        TGGCCCTTATGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAGGCGAAGT
                      1150       1160       1170       1180       1190       1200

                1180       1190       1200       1210       1220       1230
Azospirillum    CGCGAGATGGAGCCAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATCGTACTCTGCAACTCGAG
                :::::::::::: :::::::::::::::::::::::::::::: : ::::::::::::::
AF521650        CGCGAGATGGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAG
                      1210       1220       1230       1240       1250       1260

                1240       1250       1260       1270       1280       1290
Azospirillum    TGCGTGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
                ::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650        TGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
                      1270       1280       1290       1300       1310       1320

                1300       1310       1320       1330       1340       1350
Azospirillum    GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCTTTACCCGAAGACGGTGCGCT
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650        GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCTTTACCCGAAGACGGTGCGCT
                      1330       1340       1350       1360       1370       1380

                1360       1370       1380       1390       1400       1410
Azospirillum    AACCCGCAAGGGAGGCAGCCGGCCACGGTAAGGTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAA
                :::: :::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF521650        AACCGGCAACGGAGGCAGCCGGCCACGGTAAGGTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAA
                      1390       1400       1410       1420       1430       1440

                1420
Azospirillum    GGTAGCCGTAGGG
                :::::::::::::
AF521650        GGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCT
                      1450       1460       1470
```

図２－１

```
                          10        20        30        40        50
Herbaspirillum      ACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCATAGGAGCTTGCTC
                    ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508      ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCATAGGAGCTTGCTC
                    10        20        30        40        50        60

                  60        70        80        90       100       110
Herbaspirillum CTGATGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATATATCGGAACGTGCCCTAGAGTGGGGGATA
               ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508      CTGATGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATATATCGGAACGTGCCCTAGAGTGGGGGATA
                    70        80        90       100       110       120

                 120       130       140       150       160       170
Herbaspirillum ACTAGTCGAAAGACTAGCTAATACCGCATACGATCTAAGGATGAAAGTGGGGGATCGCAA
               ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508      ACTAGTCGAAAGACTAGCTAATACCGCATACGATCTAAGGATGAAAGTGGGGGATCGCAA
                   130       140       150       160       170       180

                 180       190       200       210       220       230
Herbaspirillum GACCTCATGCTCCTGGAGCGGCCGATATCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAAGCCTAC
               ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508      GACCTCATGCTCCTGGAGCGGCCGATATCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAAGCCTAC
                   190       200       210       220       230       240

                 240       250       260       270       280       290
Herbaspirillum CAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACG
               ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508      CAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACG
                   250       260       270       280       290       300

                 300       310       320       330       340       350
Herbaspirillum GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATC
               ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508      GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATC
                   310       320       330       340       350       360

                 360       370       380       390       400       410
Herbaspirillum CAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTCAGGGAAGA
               ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508      CAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTCAGGGAAGA
                   370       380       390       400       410       420

                 420       430       440       450       460       470
Herbaspirillum AACGGTAGTAGCTAATATCTATTACTAATGACGGTACCTGAAGAATAAGCACCGGCTAAC
               :::::: ::::::::::::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508      AACGGTGGTAGCTAATATCTACTACTAATGACGGTACCTGAAGAATAAGCACCGGCTAAC
                   430       440       450       460       470       480

                 480       490       500       510       520       530
Herbaspirillum TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
               ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508      TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
                   490       500       510       520       530       540
```

図２－２

```
                  540        550        560        570        580        590
Herbaspirillum AAAGCGTGCGCAGGCGGTTGTGTAAGACAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAT
               :::::::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508       AAAGCGTGCGCAGGCGGTTGTGTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAT
                     550        560        570        580        590        600

                  600        610        620        630        640        650
Herbaspirillum TGCATTTGTGACTGCACGGCTAGAGTGTGTCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAG
               :::::::: :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508       TGCATTTGAGACTGCACGGCTAGAGTGTGTCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAG
                     610        620        630        640        650        660

                  660        670        680        690        700        710
Herbaspirillum TGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGATAACACT
               :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508       TGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGATAACACT
                     670        680        690        700        710        720

                  720        730        740        750        760        770
Herbaspirillum GACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
               :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508       GACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
                     730        740        750        760        770        780

                  780        790        800        810        820        830
Herbaspirillum CTAAACGATGTCTACTAGTTGTCGGGTCTTAATTGACTTGGTAACGCAGCTAACGCGTGA
               :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508       CTAAACGATGTCTACTAGTTGTCGGGTCTTAATTGACTTGGTAACGCAGCTAACGCGTGA
                     790        800        810        820        830        840

                  840        850        860        870        880        890
Herbaspirillum AGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
               :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508       AGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
                     850        860        870        880        890        900

                  900        910        920        930        940        950
Herbaspirillum GCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTT
               :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508       GCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTT
                     910        920        930        940        950        960

                  960        970        980        990       1000       1010
Herbaspirillum GACATGGTCGGAATCCTGAAGAGATTTAGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTG
               :::::::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508       GACATGGTCGGAATCCTGAAGAGATTTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTG
                     970        980        990       1000       1010       1020

                 1020       1030       1040       1050       1060       1070
Herbaspirillum CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
               :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508       CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
                     1030       1040       1050       1060       1070       1080

                 1080       1090       1100       1110       1120       1130
Herbaspirillum ACCCTTGTCATTAGTTGCTACGAAAGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA
               :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508       ACCCTTGTCATTAGTTGCTACGAAAGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA
                     1090       1100       1110       1120       1130       1140
```

図２－３

```
                1140       1150       1160       1170       1180       1190
Herbaspirillum GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATA
               ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508       GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATA
                     1150       1160       1170       1180       1190       1200

                1200       1210       1220       1230       1240       1250
Herbaspirillum CAATGGTACATACAGAGGGCCGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAGTGTATC
               ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508       CAATGGTACATACAGAGGGCCGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAGTGTATC
                     1210       1220       1230       1240       1250       1260

                1260       1270       1280       1290       1300       1310
Herbaspirillum GTAGTCCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGG
               ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508       GTAGTCCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGG
                     1270       1280       1290       1300       1310       1320

                1320       1330       1340       1350       1360       1370
Herbaspirillum ATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG
               ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508       ATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG
                     1330       1340       1350       1360       1370       1380

                1380       1390       1400       1410       1420       1430
Herbaspirillum GAGCGGGTTTTACCAGAAGTGGGTAGCCTAACCGCAAGGAGGGCGCTCACCACGGTAGGA
               ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AF137508       GAGCGGGTTTTACCAGAAGTGGGTAGCCTAACCGCAAGGAGGGCGCTCACCACGGTAGGA
                     1390       1400       1410       1420       1430       1440

                1440       1450       1460       1470
Herbaspirillum TTCGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG-AGCCGTATCGGAA
               :::::::::::::::::::::::::::: ::::::::::::
AF137508       TTCGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGG
                     1450       1460       1470       1480
```

図 3

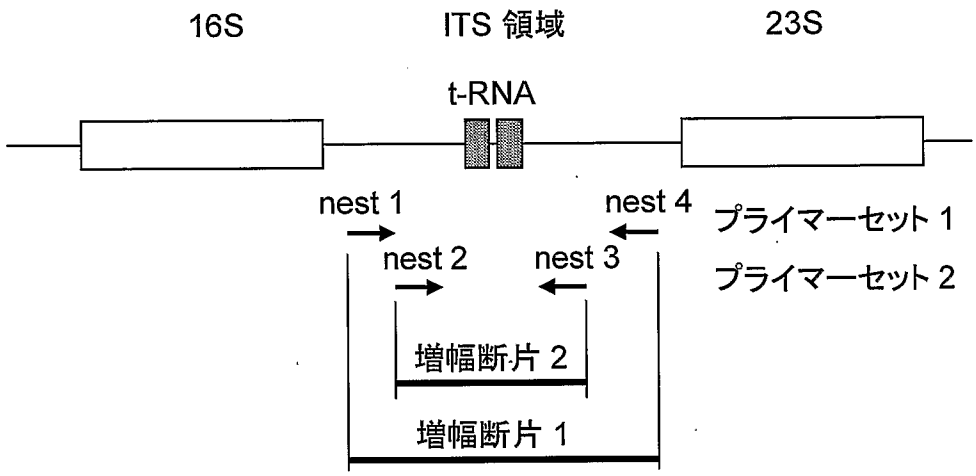
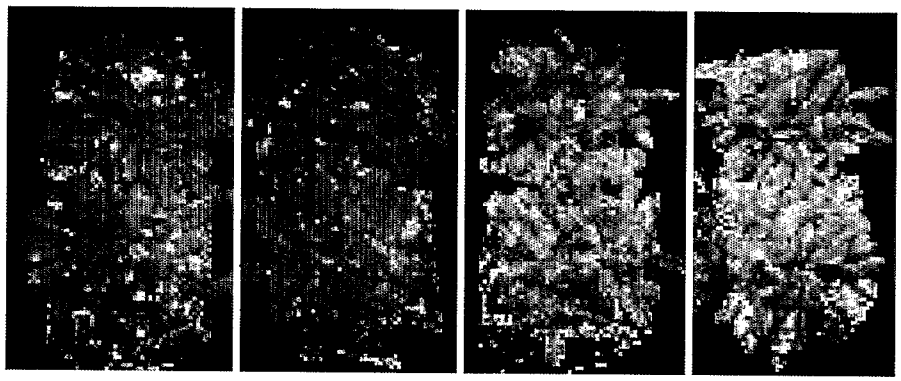

16S
ITS 領域
23S
t-RNA
nest 1
nest 4
プライマーセット 1
nest 2
nest 3
プライマーセット 2
増幅断片 2
増幅断片 1

図 4

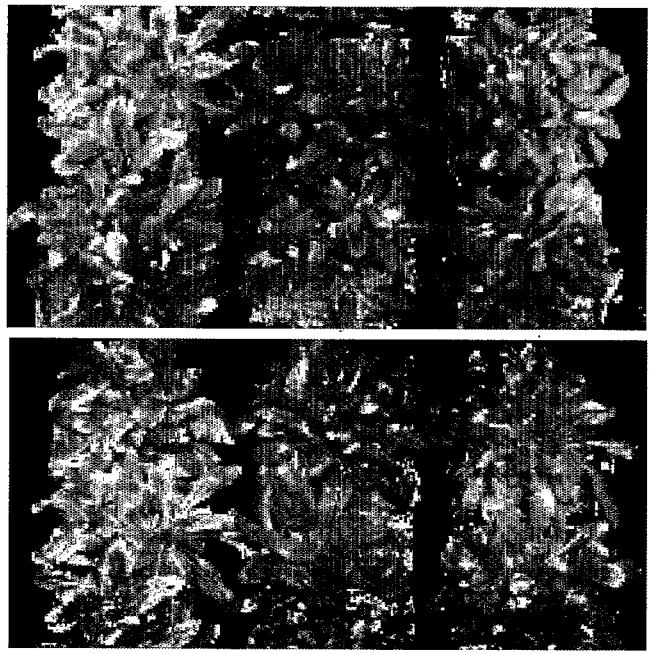


Control Azospirillum 10^8 Azospirillum 10^7 Azospirillum 10^6

図５

処理 10 日

処理 15 日



Control Azospirillum Herbaspirillum

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

☒ 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 March, 2007 (28.03.07)	10 April, 2007 (10.04.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer 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

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

☑　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の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 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）　４Ｎ　９１２３ 長井　啓子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

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