



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101415331 B

(45) 授权公告日 2012. 09. 05

(21) 申请号 200680054201. 3

(22) 申请日 2006. 04. 11

(85) PCT申请进入国家阶段日
2008. 10. 13

(86) PCT申请的申请数据
PCT/JP2006/307635 2006. 04. 11

(87) PCT申请的公布数据
W02006/109795 JA 2006. 10. 19

(73) 专利权人 株式会社吴羽
地址 日本东京都

(72) 发明人 永塚隆由 三宅泰司 坚石秀明
佐久间米子

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001
代理人 熊玉兰 李平英

(51) Int. Cl.
A01N 63/00 (2006. 01)
C12N 1/14 (2006. 01)
A01G 7/00 (2006. 01)

(56) 对比文件
JP 2004231626 A, 2004. 08. 19, 全文.

CN 1513327 A, 2004. 07. 21, 全文.

W0 03065812 A1, 2003. 08. 14, 全文.

CN 1136393 A, 1996. 11. 27, 全文.

Ayers W.A. et al.. Improved media for growth and sporulation of *Sporidesmium sclerotivorum*. 《Canadian Journal of Microbiology》. 1983, 第 29 卷 325-330.

DAY, J. B. et al.. Production of verruculogen by *penicillium estinogenum* in stirred fermenters. 《J. GEN. Microbiol. 》. 1980, 第 117 卷 (第 2 期), 405-410.

审查员 刘文君

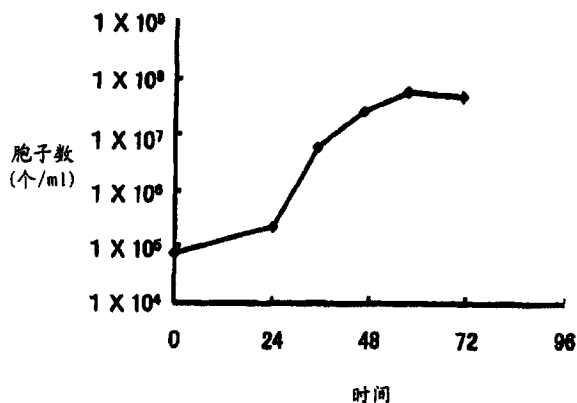
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

丝状菌孢子的制造方法及植物病害防治方法

(57) 摘要

本发明提供一种由液体培养有效地制造一般在液体培养中难以形成的丝状菌孢子, 以及使用通过该方法得到的孢子的植物病害防治技术。通过使用含有玉米浆和 / 或来源于大豆的脲作为碳源和氮源, 并且至少含有氯化钙作为无机成分的液体培养基培养丝状菌, 形成可实用化的充分量的孢子。另外, 回收由此得到的丝状菌孢子, 使其与植物体接触, 有效地防治植物病害。



1. 一种丝状菌孢子的制造方法,其使用含有 1 ~ 5%的玉米浆和 / 或来源于大豆的脲作为碳源和氮源、以 0.4 ~ 3.5%的氯化钙、0.05 ~ 0.2%的磷酸氢二钾以及 0.005 ~ 5.0%的硫酸镁作为无机成分的液体培养基,培养丝状菌 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516) 而形成孢子。

2. 如权利要求 1 所述的丝状菌孢子的制造方法,其特征在于上述液体培养基中,进一步含有 0.5 ~ 10%的甜菜糖蜜。

3. 一种丝状菌孢子的制造方法,其使用含有 1 ~ 5%的玉米浆作为碳源和氮源、以 0.4 ~ 3.5%的氯化钙、0.05 ~ 0.2%的磷酸氢二钾以及 0.005 ~ 5.0%的硫酸镁作为无机成分的液体培养基,培养丝状菌 *Talaromyces flavus* 而形成孢子。

4. 如权利要求 3 所述的丝状菌孢子的制造方法,其特征在于上述液体培养基中,进一步含有 0.5 ~ 10%的甜菜糖蜜。

丝状菌孢子的制造方法及植物病害防治方法

技术领域

[0001] 本发明涉及与植物病害的防治相关的技术。更详细地说,涉及可以形成足以作为青霉属菌的微生物农药或材料的实用化的充分量的孢子的技术。

背景技术

[0002] 化学农药是对于植物的病虫害防治的一种不可或缺的手段,为稳定的食物生产作出了很大的贡献。但是,近年来逐渐出现了由于化学农药的大量施用而产生的抗药性病虫害的发生或环境负荷的问题。

[0003] 以此为背景,近年来利用设想对环境的负荷比上述化学农药更低的微生物的,也被称为“生物农药 (Biological agrochemicals)”的生物防治的研究取得进展,其部分已经实现了实用化。

[0004] 作为被期望用于上述生物农药的微生物,已知有例如青霉属菌等丝状菌。其中,作为青霉属菌的完全世代的黄蓝状菌属 (*Talaromyces* 属),已经作为草莓炭疽病或白粉病用的农药用杀菌剂被利用(黄蓝状菌 (*Talaromyces flavus*) 水合剂,农林水产省第 20659 号)。专利文献 1 公开了对草莓炭疽菌具有拮抗作用的黄蓝状菌。

[0005] 另外,专利文献 2 中公开了作为对芒果炭疽病具有拮抗作用的微生物扩展青霉 (*Penicillium expansum*),专利文献 3 公开了对灰霉菌显示防治效果的沙门柏干酪青霉 (*Penicillium camemberti*)。

[0006] 利用这些青霉属菌作为微生物农药或材料时,可使用通过一般的液体培养得到的培养菌丝体。但是由于菌丝体与耐久性的孢子相比缺乏生存性,因而实用性不够。因此期待一种可以大量且低廉地生产耐久性的孢子的技术。

[0007] 目前以来,作为丝状菌的孢子形成方法,可进行固体培养或液体培养。在进行固体培养的情况下,使用米、麦、玉米等谷物类,或者麸子等来源于谷物的固体成分等,但对固体培养进行灭菌需要很长时间,同时也难以进行无菌管理,另外也难以控制培养过程中的温度、水分、pH 等的环境因素。另外,这些固体成分与孢子间的分离很困难,且培养时间也长,培养成本也高。

[0008] 另一方面,液体培养由于可利用许多的通用性培养装置,因而具有灭菌容易,且培养中温度、氧气供给量、pH 等的环境控制也容易这样的优点,但存在孢子形成困难的问题。

[0009] 为解决该问题,出现了例如使用半乳糖和/或果糖作为碳源的方法(参见专利文献 4),使用镁盐和/或钾盐作为培养基成分的方法(参见专利文献 5),添加果糖 0.1~5%、氯化钙 0.01~0.5%、谷氨酸 0.01~0.5% 的丝状菌的液体培养方法(参见专利文献 6)。

[0010] 另外,作为对丝状菌的孢子形成有效的培养基,有人报导了在糖蜜 5~20g/l、玉米浆 (CSL) 10~25g/l、氯化钠 5~15g/l、硫酸钙 0.1~0.5g/l、磷酸二氢钾 0.001~0.01g/l、硫酸镁 7 水合物 0.001~0.01g/l、硫酸铜 0.001~0.005g/l、硫酸铁 0.0009~0.005g/l 中含有消泡剂或琼脂等固化剂的培养基(参见专利文献 7)等。进而,已知添加钙盐对于青霉属菌的孢子的形成有效(参见非专利文献 1)。

- [0011] 专利文献 1 :特开平 10-229872 号公报
[0012] 专利文献 2 :特开 2001-39810 号公报
[0013] 专利文献 3 :特开 2004-231626 号公报
[0014] 专利文献 4 :特开平 9-322759 号公报
[0015] 专利文献 5 :特开平 11-276158 公报
[0016] 专利文献 6 :特开 2000-201669 号公报
[0017] 专利文献 7 :United State Patent 6593127 号公报
[0018] 非专利文献 1 :Trans. Br. Mycol. Soc. ,80 (2) , pp319-325, 1983

发明内容

[0019] 发明所要解决的技术问题

[0020] 在以丝状菌作为微生物农药或材料而实用化时,存在根据现有的培养方法仍然难以得到足够量的孢子形成量的技术问题。而且,由于 BSE 问题等,对于使用的培养基成分的碳源或氮源,希望由来源于动物的培养基成分置换成安全的来源于植物的培养基成分。

[0021] 因此,本发明的目的在于提供一种可形成足以作为微生物农药或材料的实用化的充分量的丝状菌孢子,并且安全的技术。

[0022] 解决技术问题的手段

[0023] 本发明人针对液体培养生产用作微生物农药或材料的丝状菌的孢子的技术,进行了深入的研究,结果发现,通过使用适合的来源于植物的成分作为培养基的碳源或氮源,并且向其中添加合适的无机成分,可以生产足以作为用于植物病害防治的微生物农药或材料的实用化的充分量的孢子。

[0024] 首先,本发明提供丝状菌孢子的制造方法。该制造方法中,由于可利用许多的通用性培养装置,因而具有灭菌容易,且培养中温度、氧气供给量、pH 等的环境控制也容易等优点,因此选择液体培养。

[0025] 然后,在该液体培养基中,作为碳源和氮源,含有玉米浆或来源于大豆的胨,且来源于碳源和氮源的无机成分的量,由目标丝状菌的液体培养时的孢子形成个数来判断,当不足必需量时,首先可使其含有氯化钙,进而如有必要,使其含有硫酸镁,在此基础上如还有必要,使其含有磷酸氢二钾,采用这种液体培养基培养丝状菌,形成孢子。

[0026] 作为碳源和氮源的上述玉米浆或上述来源于大豆的胨,使其在液体培养基中含有 0.1 ~ 10%,进而作为无机成分的上述氯化钙,使其含有 0.2 ~ 5.0%,优选 0.4 ~ 3.5%。

[0027] 此时作为无机成分,在不过量的程度以内,也可加入硫酸镁、磷酸氢二钾。用于补充而不至于不足培养基中的镁盐、钾盐的必需量。这时,希望添加至含有硫酸镁 0.001 ~ 10%,优选 0.005 ~ 5.0%。另外希望添加至含有磷酸氢二钾 0.001 ~ 0.3%,优选 0.05 ~ 0.2%。

[0028] 上述丝状菌是青霉 (Penicillium) 属的丝状菌,作为一合适例,可采用 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516) 或黄蓝状菌。对于上述两种菌,在判断来源于碳源和氮源的无机成分的量满足必需量时,液体培养时的孢子形成个数为约 10^8 个以上在孢子制造上是有效的。因此,当液体培养时的孢子形成个数低于约 10^8 个时,希望在液体培养基中,作为无机成分首先添加氯化钙,必要时添加硫酸镁,更有必要时添加磷酸氢二钾。

[0029] 下面,本发明提供一种将通过使用含有玉米浆或来源于大豆的胨作为碳源和氮源、且至少含有氯化钙作为无机成分的液体培养基,培养丝状菌而形成的孢子进行回收,使该孢子接触植物体的植物病害防治方法。此外,所谓“接触”,是指广义地含有向植物体散布、浸渍、混合、涂布等方法,另外也可以是将上述孢子在土壤中混合、灌注后,播种植物体种子使其“接触”,不能狭义地解释。

[0030] 此时,作为无机成分,在不过量的程度以内,也可在上述液体培养基中加入磷酸氢二钾、硫酸镁。用于补充而不至于不足培养基中的镁盐、钾盐的必需量。这时,希望添加至含有硫酸镁 0.001 ~ 10%,优选 0.005 ~ 5.0%。另外希望添加至含有磷酸氢二钾 0.001 ~ 0.3%,优选 0.05 ~ 0.2%。

[0031] 此外,上述本发明中,所谓“玉米浆(Corn Steep Liquor:简称CSL),是指制糖(玉米淀粉)制造过程中产生的有机副产物。所谓“来源于大豆的胨”,是将大豆蛋白质通过蛋白质分解酶或酸部分地水解而得到的产物,以寡肽、氨基酸为主要成分。它们中的任何一种,在丝状菌的培养中都作为供给碳源和氮源的有机成分而发挥作用。

[0032] 发明效果

[0033] 根据本发明的方法培养青霉属丝状菌,可大量且低廉地产业化生产一般液体培养中难以形成的丝状菌孢子。用本方法得到的孢子,作为微生物农药和生物材料有用。另外由于未使用任何动物性的有机成分来培养,因而无 BSE 问题,是安全的。

附图说明

[0034] [图 1] 是显示实施例 3 的结果的图,是显示孢子数随培养时间而变化的图。

[0035] 具体实施方式

[0036] 下面,对于本发明的实施方式进行说明。此外本发明并不狭义地限定于以下说明的实施方式或实施例。

[0037] 首先,本发明中作为丝状菌孢子的液体培养所采用的碳源和氮源,使用玉米浆、或者来源于大豆的胨。根据情况也可以使用上述两种。可以使用大豆粉或黄豆面等,但会导致其与培养后孢子的分离变得困难。另外动物性胨得不到充分的孢子形成量。

[0038] 对于“玉米浆”没有特别限定,但可适当使用例如昭和产业公司制、北海道糖业公司制、日本食品化工公司制、Oriental 酵母公司制(ソルリス AST、095MPE 等)等。对于“来源于大豆的胨”也没有特别限定,但可使用例如日本制药公司制 Polypeptone-S 等。

[0039] 玉米浆或来源于大豆的胨的合适的添加量为 0.1% ~ 10%、优选 0.5 ~ 10%、更优选 1 ~ 5%。添加过量的量,会增加不溶物的沉淀,与孢子的分离变得困难。本发明中,仅仅添加玉米浆或来源于大豆的胨,就可生产充分量的孢子,但通常也可进一步添加一般使用的碳源。例如可进一步添加葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖、甘油、淀粉、来源于甘蔗或甜菜的废糖蜜等。其中,主要基于价格便宜的理由,希望采用废糖蜜。例如当利用甜菜糖蜜时,可以使用添加了 0.5% ~ 10% 的培养基。

[0040] 本发明中除了上述碳源和氮源,还加入碳酸或磷酸等的盐类、钾、钠、铁、镁等的金属盐作为无机成分。基于青霉属菌增殖的必需要素的理由,特别优选磷酸氢二钾和硫酸镁。

[0041] 进而,作为促进孢子形成的成分,添加钙盐。作为该钙盐,主要基于溶解度的考虑,优选氯化钙。作为氯化钙浓度,为 0.2 ~ 5.0%,优选 0.4 ~ 3.5%。添加过量的氯化钙,会

增加不溶物的沉淀,与孢子的分离变得困难。此外,可自由地向培养基中添加各种表面活性剂作为消泡剂。

[0042] 通过在培养温度为 20℃~40℃、优选 25℃~35℃,培养基的初始 pH 为 4.0~8.0、优选 5.0~7.0,液体振荡培养、基于发酵罐的通气搅拌培养等需氧条件下来进行培养。

[0043] 培养结束后,首先利用漂白棉、纱布或者玻璃棉等过滤培养物,除去菌丝。然后,将得到的滤液离心分离,分离孢子。加水离心分离,进行洗涤。多次重复进行这些工序,回收洗涤的孢子。另外,洗涤水可以使用离子交换水、蒸馏水、使用各种滤膜调配的纯水、自来水等。

[0044] 该孢子显示与由马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)等固体培养基得到的孢子相同的保存性、防治效果,可作为生物农药、生物材料而使用。

[0045] 此外,本发明中可作为培养对象的丝状菌,例如为青霉属菌丝状菌。该青霉属菌丝状菌,没有特别限定,例如可列举 *Eupenicillium* sp. B-408 (FERM BP-08517)、*Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516)、*Penicillium* sp. B-453 (FERM BP-08515)、黄蓝状菌、扩展青霉、沙门柏干酪青霉等。优选 *Eupenicillium* sp. B-408 (FERM BP-08517)、*Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516)、*Penicillium* sp. B-453 (FERM BP-08515)、黄蓝状菌,但更优选 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516) 或黄蓝状菌。

[0046] *Eupenicillium* sp. B-408 (FERM BP-08517)、*Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516)、*Penicillium* sp. B-453 (FERM BP-08515) 保藏于独立行政法人产业技术综合研究所特许生物保藏中心(邮政编码 305-8566 日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央代 6)。

[0047] 实施例 1

[0048] 实施例 1 中,对于菌孢子的培养,考察改变液体培养基的组成时的培养孢子数的不同。另外,实验例 1 至 3 是本发明涉及的丝状菌孢子的制造方法。

[0049] (实验例 1)

[0050] 将组成为玉米浆(Oriental 酵母公司制)3%、磷酸氢二钾 0.1%、硫酸镁 7 水合物 0.05%、氯化钙 2 水合物 1% (pH7.0) 的培养基 50ml 分注于 300ml 的三角烧瓶中进行灭菌(120℃、20 分钟)。在 PDA 培养基中向前培养的 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516)、或黄蓝状菌中加入灭菌水,调配至孢子浓度为 1×10^6 个/ml。在上述液体培养基中接种 0.5ml 的 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516) 孢子液、或黄蓝状菌孢子液,再在振荡培养机(150rpm、25℃)中培养 7 天。培养结束后,利用血细胞计算盘测定孢子数。另外,黄蓝状菌是从市售的农药制剂分离而使用的。

[0051] (实验例 2)

[0052] 将组成为玉米浆(昭和产业公司制)3%、甜菜糖蜜(北海道糖业公司制)0.5%、磷酸氢二钾 0.1%、硫酸镁 7 水合物 0.05%、氯化钙 2 水合物 1% (pH7.0) 的培养基 50ml 分注于 300ml 的三角烧瓶中进行灭菌(120℃、20 分钟)。接种 0.5ml 的根据实施例 1 调配的 *Talaromyces* sp. B-422 (FERMBP-08516) 孢子液、或黄蓝状菌孢子液,再在振荡培养机(150rpm、25℃)中培养 7 天。培养结束后,利用血细胞计算盘测定孢子数。

[0053] (实验例 3)

[0054] 将组成为来源于大豆的胨(Peptone-S、日本制药公司制)3%、磷酸氢二钾 0.1%、

硫酸镁 7 水合物 0.05%、氯化钙 2 水合物 1% (pH7.0) 的培养基 50ml 分注于 300ml 的三角烧瓶中进行灭菌 (120℃、20 分钟)。接种 0.5ml 的根据实施例 1 调配的 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516) 孢子液、或黄蓝状菌孢子液, 再在振荡培养机 (150rpm、25℃) 中培养 7 天。培养结束后, 利用血细胞计算盘测定孢子数。

[0055] (比较实验例 1)

[0056] 将组成为甜菜糖蜜 (北海道糖业公司制) 0.75%、玉米浆 (昭和产业公司制) 2%、氯化钠 1%、硫酸钙 0.025%、磷酸氢二钾 0.0006%、硫酸镁 7 水合物 0.0005%、硫酸铜 0.0001%、硫酸铁 0.0002% (pH7.0) 的培养基 50ml 分注于 300ml 的三角烧瓶中进行灭菌 (120℃、20 分钟)。接种 0.5ml 的根据实施例 1 调配的 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516) 孢子液、或黄蓝状菌孢子液, 再在振荡培养机 (150rpm、25℃) 中培养 7 天。培养结束后, 利用血细胞计算盘测定孢子数。

[0057] (比较实验例 2)

[0058] 将组成为半乳糖 2%、氯化钙 2 水合物 2.5%、硝酸钠 0.6%、磷酸氢二钾 0.15%、硫酸镁 7 水合物 0.05% (pH7.0) 的培养基 50ml 分注于 300ml 的三角烧瓶中进行灭菌 (120℃、20 分钟)。接种 0.5ml 的根据实施例 1 调配的 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516) 孢子液、或黄蓝状菌孢子液, 再在振荡培养机 (150rpm、25℃) 中培养 7 天。培养结束后, 利用血细胞计算盘测定孢子数。

[0059] (比较实验例 3)

[0060] 将组成为果糖 1%、脱脂奶粉 2%、氯化钙 2 水合物 0.2%、谷氨酸 0.1% (pH7.0) 的培养基 50ml 分注于 300ml 的三角烧瓶中进行灭菌 (120℃、20 分钟)。接种 0.5ml 的根据实施例 1 调配的 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516) 孢子液、或黄蓝状菌孢子液, 再在振荡培养机 (150rpm、25℃) 中培养 7 天。培养结束后, 利用血细胞计算盘测定孢子数。

[0061] (比较实验例 4)

[0062] 将组成为马铃薯葡萄糖肉汤 (Difco 公司制) 2.4% (pH7.0) 的培养基 50ml 分注于 300ml 的三角烧瓶中进行灭菌 (120℃、20 分钟)。接种 0.5ml 的根据实施例 1 调配的 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516) 孢子液、或黄蓝状菌孢子液, 再在振荡培养机 (150rpm、25℃) 中培养 7 天。培养结束后, 利用血细胞计算盘测定孢子数。

[0063] (比较实验例 5)

[0064] 将组成为复合胨 (日本制药公司制) 3%、磷酸氢二钾 0.1%、硫酸镁 7 水合物 0.05%、氯化钙 2 水合物 1% (pH7.0) 的培养基 50ml 分注于 300ml 的三角烧瓶中进行灭菌 (120℃、20 分钟)。接种 0.5ml 的根据实施例 1 调配的 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516) 孢子液、或黄蓝状菌孢子液, 再在振荡培养机 (150rpm、25℃) 中培养 7 天。培养结束后, 利用血细胞计算盘测定孢子数。

[0065] 上述实验例 1 ~ 3、及比较实验例 1 ~ 5 所得到的培养液中的孢子浓度如以下的“表 1”所示。

[0066] [表 1]

[0067]

	<i>Talaromyces</i> sp. B-422 孢子数 (单位: 个 / ml)	黄蓝状菌孢子数 (单位: 个 / ml)
实验例 1	1.5×10^8	8.7×10^7

实验例 2	1.6×10^8	—
实验例 3	1.2×10^8	—
比较实验例 1	3.2×10^7	$<1.0 \times 10^4$ (菌丝状)
比较实验例 2	1.5×10^6	2.3×10^6
比较实验例 3	1.4×10^6	$<1.0 \times 10^4$
比较实验例 4	$<1.0 \times 10^4$ (菌丝状)	1.3×10^4 (菌丝状)
比较实验例 5	$<1.0 \times 10^4$ (菌丝状)	$<1.0 \times 10^4$ (菌丝状)

[0068] 由上述“表 1”的结果可清楚地看到,对于任意一种菌,实验例 1~3 中的孢子生产量都要显著地比比较实验例 1~5 的孢子生产量多。此外,使用 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516) 时的比较实验例 4、5、及使用黄蓝状菌时的比较实验例 1、4、5 中,孢子形成困难,呈菌丝状(参见表 1)。

[0069] 实施例 2

[0070] 实施例 2 中,考察本发明的丝状菌孢子的制造方法中所使用的最佳氯化钙浓度。

[0071] 采用与实施例 1 的实验例 1 相同的方法,仅将氯化钙 2 水合物的浓度改变为 0.1%、0.5%、3.0%,考察培养的 *Talaromyces* sp. B-422 (FERMBP-08516) 孢子数。结果如表 2 所述。

[0072] [表 2]

[0073]

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	CSL	K_2HPO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	<i>Talaromyces</i> sp. B-422 孢子数 (单位:个/ml)
0.1%	3.0%	0.1%	0.05%	6.7×10^6
0.5%	3.0%	0.1%	0.05%	9.1×10^7
3.0%	3.0%	0.1%	0.05%	1.4×10^8

[0074] 实施例 3

[0075] 实施例 3 中,考察本发明的丝状菌孢子的制造方法中孢子数随培养时间的变化。

[0076] 将组成为玉米浆(日本食品化工公司制)3%、磷酸氢二钾 0.1%、硫酸镁 7 水合物 0.05%、氯化钙 2 水合物 1% (pH7.0) 的培养基 2L 分注于 3L 的发酵罐中进行灭菌(120℃、60 分钟)。在三角烧瓶中接种 0.1% 的前培养的 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516) 培养液,使用同样的培养基在搅拌速度 300rpm、温度 25℃、通气量 0.5vvm 下进行 5 天的培养。经时取样,利用血细胞计算盘测定孢子数。孢子数随培养时间的变化如图 1 所示。由该图 1 所示的结果可知,培养 3 天的孢子数几乎达到 1×10^8 个/ml。

[0077] 实施例 4

[0078] 实施例 4 使用上述实施例 3 所用的培养基,进行孢子的生存性的确认。

[0079] 将实施例 4 中使用的组成的培养基 50ml 分注于 300ml 的三角烧瓶中进行灭菌(120℃、20 分钟)。在 PDA 培养基中接种 0.5ml 的前培养的 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516) 孢子液,再在振荡培养机(150rpm、25℃)中培养 7 天。培养结束后,利用漂白棉过滤培养液除去菌丝。将得到的滤液进行离心分离,收集孢子。加蒸馏水离心分离,进行洗涤。重复操作 2 次,回收洗涤的孢子,在自来水中调配,以使显微镜下计数的孢子数约为 2×10^8 个/ml。

[0080] 用于比较的固体培养基中形成的孢子,使用在 PDA 培养基中、25℃下、培养 10 天的孢子。向培养皿中加入蒸馏水用笔记录表面后,进行与液体培养的情况相同的操作,调配同样浓度的孢子液。保持在 5℃、20℃下,测定 3 个月后的活菌数。得到的结果如下列“表 3”

所示。

[0081] [表 3]

[0082]

B422 孢子液	调配后的活菌数 (CFU/ml)	5℃下保存 3 个 月后的活菌数 (CFU/ml)	20℃下保存 3 个月后的活菌 数 (CFU/ml)
由液体培养基 的调配	1.4×10^8	1.7×10^8	1.2×10^8
由固体培养基 的调配	1.5×10^8	0.8×10^8	1.6×10^8

[0083] 由上述“表 3”所示的结果可知,液体培养得到的孢子显示与固体培养基中得到的孢子相同的生存性。

[0084] 实施例 5

[0085] 实施例 5 中,检验 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516) 液体培养孢子液和固体培养孢子液的对稻恶苗病的防治效果。

[0086] 将与实施例 3 同样得到的 *Talaromyces* sp. B-422 (FERM BP-08516) 液体培养孢子液和固体培养孢子液在 5℃下保存 1 个月后用于本实验。

[0087] 将稻恶苗病多发农场中自然感染的水稻罹病种子(2001 年产、品种:短银坊主)以浴比 1:1 的比例浸渍于调配的 *Talaromyces* sp. B-422 (FERMBP-08516) 孢子液中 24 小时,然后在 15℃下浸渍 4 天(浴比 1:1),在 30℃下催芽 1 天后,在装满市售的育苗用粒状培土(商品名:くみあい粒状培土、株式会社 Kureha 制)的育苗用箱中每箱播种相当于 5g 干稻壳(1 区域反复 3 次)。

[0088] 然后在出芽器中,在 30℃下使其出芽 3 天,之后在玻璃温室内育苗。播种 14 天后考察各试验区的徒长苗率,求出防治价值。其结果如下列“表 4”所示。另外,防治价值以下列算式 1 计算。

[0089] [算式 1]

[0090] 防治价值 = $(1 - (\text{处理区的徒长苗率} \div \text{无处理区的徒长苗率})) \times 100$

[0091] [表 4]

[0092]

B422 孢子液	孢子浓度 (个/ml)	徒长苗率 (%)	防治价值
由液体培养基的调配	1×10^6	1.5	99
由固体培养基的调配	1×10^6	4.4	96
无处理		100	

[0093] 供试稻壳:短银坊主(2001 年产、自然感染稻壳)

[0094] 种子处理 :24 小时浸渍

[0095] 浸种 :15℃ 4 天

[0096] 催芽 :30℃ 1 天

[0097] 出芽 :30℃ 1 天

[0098] 由上述“表 4”所示结果可知,液体培养中得到的孢子显示与固体培养基中得到的孢子相同的效果(防治价值)。

[0099] 产业实用性

[0100] 本发明可以作为制造用于植物病害防治的生物农药或材料中可使用的丝状菌孢子的技术、或者植物病害技术而得到利用。

[0101]

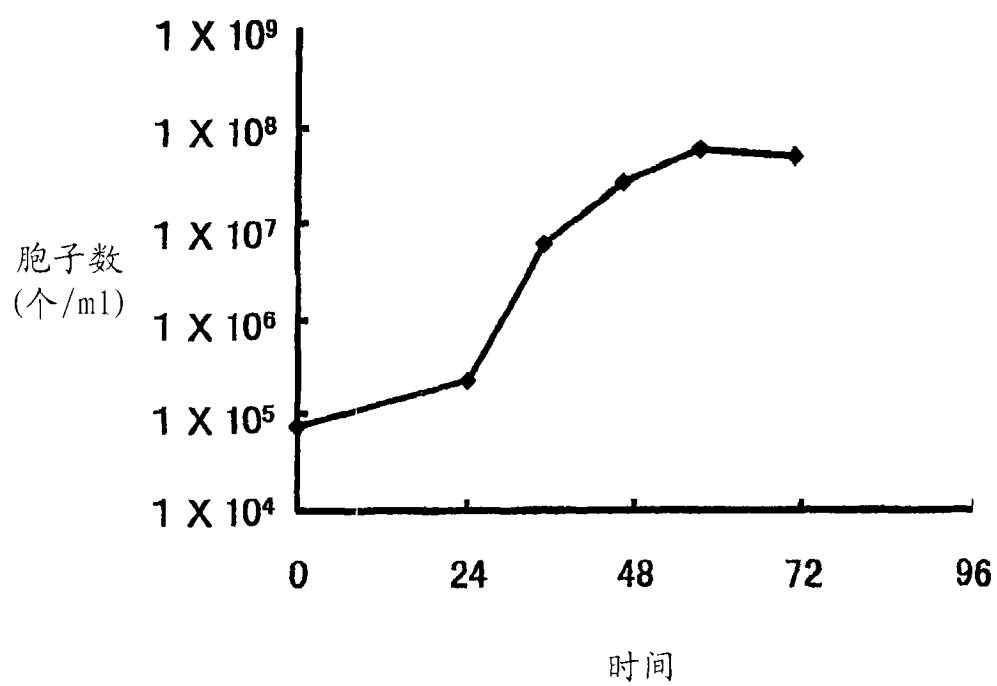


图 1