



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109688821 A

(43)申请公布日 2019.04.26

(21)申请号 201780054954.2

(22)申请日 2017.09.07

(30)优先权数据

2016-175861 2016.09.08 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/032354 2017.09.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/047918 JA 2018.03.15

(71)申请人 揖斐电株式会社

地址 日本岐阜县

(72)发明人 大野胜也 高田久美子 野原偏弘

横田晃章 植村谦太 高木博子

中井通

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 孟伟青 庞东成

(51)Int.Cl.

A01N 63/02(2006.01)

A01G 7/06(2006.01)

A01P 21/00(2006.01)

C05F 11/08(2006.01)

权利要求书1页 说明书13页 附图4页

(54)发明名称

植物活化剂和植物活化剂的制造方法

(57)摘要

本发明的目的在于提供土壤污染和毒性低、抗性诱导效果和成长促进效果优异的植物活化剂及其制造方法。一种植物活化剂,其包含脂肪酸代谢物,该脂肪酸代谢物是在0.1~8mg/l的溶解氧浓度环境下使变形菌对碳原子数为4~30的脂肪酸进行代谢而得到的;以及一种包含脂肪酸代谢物的植物活化剂的制造方法,其包括脂肪酸代谢工序,该脂肪酸代谢工序中,在0.1~8mg/l的溶解氧浓度环境下使变形菌对碳原子数为4~30的脂肪酸进行代谢。

1. 一种植物活化剂,其包含脂肪酸代谢物,该脂肪酸代谢物是在0.1mg/l~8mg/l的溶解氧浓度环境下使变形菌对碳原子数为4~30的脂肪酸进行代谢而得到的。

2. 如权利要求1所述的植物活化剂,其中,所述脂肪酸是在20℃为液体的脂肪酸。

3. 如权利要求1或2所述的植物活化剂,其中,所述变形菌是预培养至菌数为 1×10^8 个细胞/ml~ 9×10^{10} 个细胞/ml的变形菌。

4. 如权利要求1~3中任一项所述的植物活化剂,其中,所述代谢为在选自Mg、P、Na和K中的至少一种以上矿物质的存在下的代谢。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的植物活化剂,其中,该植物活化剂包含生物表面活性剂。

6. 如权利要求1~5中任一项所述的植物活化剂,其中,所述代谢是在10℃~40℃的条件下的代谢。

7. 如权利要求1~6中任一项所述的植物活化剂,其中,该植物活化剂作为抗性诱导剂发挥机能。

8. 如权利要求1~7中任一项所述的植物活化剂,其中,该植物活化剂作为茄科植物的青枯病预防剂发挥机能。

9. 一种包含脂肪酸代谢物的植物活化剂的制造方法,其包括脂肪酸代谢工序,该脂肪酸代谢工序中,在0.1mg/l~8mg/l的溶解氧浓度环境下使变形菌对碳原子数为4~30的脂肪酸进行代谢。

10. 如权利要求9所述的植物活化剂的制造方法,其中,所述脂肪酸是在20℃为液体的脂肪酸。

11. 如权利要求9或10所述的植物活化剂的制造方法,其中,所述变形菌是预培养至菌数为 1×10^8 个细胞/ml~ 9×10^{10} 个细胞/ml的变形菌。

12. 如权利要求9~11中任一项所述的植物活化剂的制造方法,其中,在选自Mg、P、Na和K中的至少一种以上矿物质的存在下实施所述脂肪酸代谢工序。

13. 如权利要求9~12中任一项所述的植物活化剂的制造方法,其中,该制造方法是包含生物表面活性剂的植物活化剂的制造方法。

14. 如权利要求9~13中任一项所述的植物活化剂的制造方法,其中,在10℃~40℃的条件下实施所述脂肪酸代谢工序。

15. 如权利要求9~14中任一项所述的植物活化剂的制造方法,其中,该制造方法是作为抗性诱导剂发挥机能的植物活化剂的制造方法。

16. 如权利要求9~15中任一项所述的植物活化剂的制造方法,其中,该制造方法是作为茄科植物的青枯病预防剂发挥机能的植物活化剂的制造方法。

植物活化剂和植物活化剂的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物活化剂和植物活化剂的制造方法。

背景技术

[0002] 自古以来,为了促进植物的生长,已经进行了优化温度条件、日照条件或进行施肥等对策。但是,这些对策有局限性。例如,即使增加施肥中使用的肥料的量,也无法期待一定以上的生长促进效果,不仅如此,若肥料施用过多,则反而会成为植物生长的障碍,进而还可能会污染土壤。

[0003] 因此,除了上述对策以外,还有报告提出了基于植物活化剂的生长促进等,所述植物活化剂具有生长促进(为包括叶茎的扩大、块茎块根的生长促进等的概念)、休眠抑制、针对植物应力的抗性的赋予、抗老化等的植物生长调节作用等。例如,在专利文献1中记载了一种具有碳原子数为4~24的酮醇脂肪酸作为有效成分的植物活化剂。

[0004] 另一方面,植物病虫害的防除在很大程度上依赖于化学合成农药,但从土壤污染和对人的健康危害的方面出发,优选削减农药用量。

[0005] 以往,作为在不使用农药的情况下对植物进行病虫害防除的方法,已知有基于病害抗性诱导剂的对策。作为病害抗性诱导剂,可以举出例如噻菌灵、异噻菌胺、阿拉酸式苯-S-甲基(ASM)、3'-氯-4,4'-二甲基-1,2,3-噻二唑-5-甲酰苯胺(噻酰菌胺)、多效霉素等。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本特开2001-131006号公报

[0009] 专利文献2:日本特开平6-305921公报

发明内容

[0010] 发明所要解决的课题

[0011] 基于专利文献1所述的植物活化剂的效果并不充分,要求活化作用更为优异的植物活化剂。另外,现有的抗性诱导剂为化学合成品,具有毒性非常高的问题。上述的噻菌灵、异噻菌胺、阿拉酸式苯-S-甲基(ASM)、3'-氯-4,4'-二甲基-1,2,3-噻二唑-5-甲酰苯胺(噻酰菌胺)对应于以病原菌或病毒为激发子(elicitor)的基于水杨酸的系统获得抗性的诱导(水杨酸途径),但对于基于茉莉酮酸(和乙烯)(该茉莉酮酸(和乙烯)作为基于害虫的虫害或伤害的应答而合成出)的抗性的诱导(茉莉酮酸途径)无效。另外,多效霉素针对茄科植物的青枯病被认为是有效的,但例外的是其对番茄产生药害,因而具有无法使用的问题。另外,专利文献2中公开了将化学合成的亚油酸的过氧化物用于植物生长调节剂中的内容,但其病害预防效果不充分。

[0012] 已知以过氧化脂质为代表的脂肪酸氧化物显示出了抗菌作用。另外,还已知有以亚麻酸等脂肪酸为原料在植物体内生物合成茉莉酮酸等的技术。但是,脂肪酸通过微生物代谢被氧化而得到的脂肪酸代谢物具有抗性诱导这一点尚未为人所知。

[0013] 此外,这些抗性诱导剂或过氧化脂质等在水中非常难溶,在处理时需要强力的乳化剂、分散剂。

[0014] 鉴于上述课题,本发明的目的在于提供土壤污染和毒性低、抗性诱导效果和生长促进效果优异的植物活化剂及其制造方法。

[0015] 用于解决课题的手段

[0016] 本发明涉及一种植物活化剂,其包含脂肪酸代谢物,该脂肪酸代谢物是在0.1~8mg/l的溶解氧浓度环境下使变形菌对碳原子数为4~30的脂肪酸进行代谢而得到的。

[0017] 植物活化剂中,优选上述脂肪酸是在20℃为液体的脂肪酸。

[0018] 植物活化剂中,优选上述变形菌是预培养至菌数为 $1 \times 10^8 \sim 9 \times 10^{10}$ 个细胞/ml的变形菌。

[0019] 植物活化剂中,优选上述代谢为在选自Mg、P、Na和K中的至少一种以上矿物质的存在下的代谢。

[0020] 上述植物活化剂优选为包含生物表面活性剂的植物活化剂。

[0021] 植物活化剂中,优选上述代谢为在10~40℃的条件下的代谢。

[0022] 上述植物活化剂优选为作为抗性诱导剂发挥机能的植物活化剂。

[0023] 上述植物活化剂优选为作为茄科植物的青枯病预防剂发挥机能的植物活化剂。

[0024] 另外,本发明涉及一种包含脂肪酸代谢物的植物活化剂的制造方法,其包括脂肪酸代谢工序,该脂肪酸代谢工序中,在0.1~8mg/l的溶解氧浓度环境下使变形菌对碳原子数为4~30的脂肪酸进行代谢。

[0025] 植物活化剂的制造方法中,优选上述脂肪酸是在20℃为液体的脂肪酸。

[0026] 植物活化剂的制造方法中,优选上述变形菌是预培养至菌数为 $1 \times 10^8 \sim 9 \times 10^{10}$ 个细胞/ml的变形菌。

[0027] 植物活化剂的制造方法中,优选在选自Mg、P、Na和K中的至少一种以上矿物质的存在下实施上述脂肪酸代谢工序。

[0028] 植物活化剂的制造方法优选为包含生物表面活性剂的植物活化剂的制造方法。

[0029] 植物活化剂的制造方法中,优选在10~40℃的条件下实施上述脂肪酸代谢工序。

[0030] 植物活化剂的制造方法优选为作为抗性诱导剂发挥机能的植物活化剂的制造方法。

[0031] 植物活化剂的制造方法优选为作为茄科植物的青枯病预防剂发挥机能的植物活化剂的制造方法。

[0032] 发明的效果

[0033] 本发明的植物活化剂的土壤污染和毒性低,抗性诱导效果和生长促进效果优异。另外,根据本发明的植物活化剂的制造方法,能够制造出土壤污染和毒性低、抗性诱导效果和生长促进效果优异的植物活化剂。

附图说明

[0034] 图1是示出拟南芥的基因表达量的图。

[0035] 图2是基于实时PCR的PR1基因的扩增曲线。

[0036] 图3是示出茄根中的生长促进结果的照片。

[0037] 图4是示出茄根中的生长促进结果的照片。

具体实施方式

[0038] 植物活化剂

[0039] 本发明的植物活化剂的特征在于,其包含脂肪酸代谢物,该脂肪酸代谢物是在0.1~8mg/l的溶解氧浓度环境下使变形菌对碳原子数为4~30的脂肪酸进行代谢而得到的。

[0040] 可以通过将上述脂肪酸代谢物喷雾或涂敷至植物的根、茎或叶而对植物诱导抗性、或促进生长。这被认为是由于在脂肪酸代谢物中包含可活化与抗性诱导相关的水杨酸途径或茉莉酮酸途径的物质或该物质的前体所致的。另外,由于还确认到了生长促进效果,因而认为也包含可活化生长的物质。

[0041] 上述代谢是指以碳原子数为4~30的脂肪酸作为材料、在规定的溶解氧浓度环境下通过变形菌外分泌或内分泌的酶等进行分解或合成。例如可以举出在规定的溶解氧浓度环境下利用含有上述脂肪酸的培养基对变形菌进行培养的方法。

[0042] 本发明中使用的脂肪酸的碳原子数为4~30、优选为10~20。碳原子数小于4的情况下,熔点/沸点低,因而在培养时的温度下的挥发性高,具有不容易残留在培养基中的倾向。另外,在上述碳原子数超过30的情况下,由于熔点/沸点增高,因而在培养时的温度下为固体,具有无法与培养基混合而发生分离的倾向。但是,根据氢键数目的不同,熔点有时也并非仅取决于碳原子数。

[0043] 从代谢效率的方面和抑制在培养基中固化的方面出发,本发明中使用的脂肪酸优选在20~30℃为液体、更优选在20℃为液体。

[0044] 上述脂肪酸可以为饱和脂肪酸或不饱和脂肪酸中的任一种、或者为包含两者的混合物。另外,可以使用植物油或甘油酯的形态、或者游离脂肪酸,出于分解速度优异的理由,优选游离脂肪酸(单羧酸)。

[0045] 作为碳原子数为4~30的游离脂肪酸,可以举出丁酸(丁酸)、戊酸(戊酸)、己酸、庚酸(庚酸)、辛酸、壬酸、癸酸、月桂酸、十四酸、十五酸、棕榈酸、棕榈油酸、十七酸、硬脂酸、油酸、异油酸、亚油酸、 α -亚麻酸、 γ -亚麻酸、桐酸、花生酸、二十碳三烯酸(mead acid)、花生四烯酸、山萘酸、木蜡酸、神经酸、蜡酸、褐煤酸、蜂花酸等,其中优选碳原子数为10~20的癸酸、月桂酸、十四酸、十五酸、棕榈酸、棕榈油酸、十七酸、硬脂酸、油酸、异油酸、亚油酸、 α -亚麻酸、 γ -亚麻酸、桐酸、花生酸、二十碳三烯酸、花生四烯酸,更优选碳原子数为18的油酸、亚油酸、 α -亚麻酸、 γ -亚麻酸。

[0046] 在使用含有上述脂肪酸的培养基的情况下的脂肪酸的含量优选为100g/l以下、更优选为60g/l以下、进一步优选为12g/l以下。该脂肪酸的含量超过100g/l的情况下,难以与培养基的水分发生乳化,代谢效率可能变差或者可能会抑制变形菌的生长。另外,脂肪酸的含量的下限没有特别限定,优选为1.0g/l以上。

[0047] 此外,含有上述脂肪酸的培养基优选含有矿物质成分。作为矿物质成分没有特别限定,可以举出在微生物培养中使用的矿物质成分。例如可以举出具有镁(Mg)、磷(P)、钠(Na)或钾(K)的成分。这些成分可以单独使用,也可以将多种合用。需要说明的是,培养基中的矿物质成分的含量没有特别限定,可以为现有的需氧性细菌的培养方法。

[0048] 本发明中使用的变形菌只要无损于本发明的效果就没有特别限定。从脂肪酸的代

谢效率、生长效率的方面出发,优选适于增殖的温度(最佳温度)为10~40℃的变形菌,更优选该温度为20~30℃的变形菌。

[0049] 出于脂肪酸的代谢效率优异的理由,上述变形菌优选为经预培养的变形菌,更优选预培养至菌数为 $1 \times 10^8 \sim 9 \times 10^{10}$ 个细胞/ml。

[0050] 本发明中,代谢中的溶解氧浓度为0.1mg/l以上。溶解氧浓度小于0.1mg/l的情况下,变形菌的活动降低,具有脂肪酸的代谢效率极低的倾向。另外,溶解氧浓度为8mg/l以下、优选为5mg/l以下、更优选为3mg/l以下。溶解氧浓度超过8mg/l的情况下,在培养基中的氧的作用下脂肪酸会发生氧化,具有植物活化效果降低的倾向。需要说明的是,溶解氧浓度为利用株式会社堀场制作所制造的溶解氧仪在P0电极上通过隔膜伽伐尼电极法或隔膜极谱法进行测定而得到的值。

[0051] 上述代谢中的温度可以根据所使用的变形菌适宜地调整,从脂肪酸的代谢效率的方面出发,优选为10~40℃、更优选为20~30℃。

[0052] 从脂肪酸和脂肪酸代谢物可溶于水、代谢效率和处理性的方面出发,优选本发明的植物活化剂除了含有脂肪酸代谢物以外还含有生物表面活性剂。需要说明的是,本发明的生物表面活性剂是来源于变形菌的表面活性剂。

[0053] 本发明的植物活化剂的土壤污染和毒性低,具有作为抗性诱导剂和生长促进剂的优异效果。特别是作为抗性诱导剂能够活化水杨酸途径和茉莉酮酸途径这两种抗性诱导,这一点优于现有的抗性诱导剂。另外,通过对植物的根、叶或茎的一部分进行处理,能够活化植物整株的抗性诱导和生长。

[0054] 如上所述,作为针对茄科植物的青枯病的抗性诱导剂而已知的多效霉素例外地对番茄产生药害,因而无法使用,但本发明的植物活化剂即使对番茄也不会产生药害,可发挥出针对青枯病的抗性诱导效果。

[0055] 本发明的植物活化剂可应用于一般植物。例如可以举出茄科、葫芦科等双子叶类植物、禾本科等单子叶类植物。另外,作为使用方法,可以举出涂敷或散布至植物的叶、茎、根等的方法;散布或灌注在土壤中的方法;等等。

[0056] 制造方法

[0057] 本发明的包含脂肪酸代谢物的植物活化剂的制造方法的特征在于,其包括脂肪酸代谢工序,该脂肪酸代谢工序中,在0.1~8mg/l的溶解氧浓度环境下使变形菌对碳原子数为4~30的脂肪酸进行代谢。

[0058] 上述脂肪酸代谢工序是以碳原子数为4~30的脂肪酸作为材料、在规定的溶解氧浓度环境下通过变形菌外分泌或内分泌的酶等进行分解或合成的工序。例如可以举出在规定的溶解氧浓度环境下利用含有上述脂肪酸的培养基对变形菌进行培养的方法。

[0059] 上述脂肪酸代谢工序中的溶解氧浓度为0.1mg/l以上。溶解氧浓度小于0.1mg/l的情况下,变形菌的活动降低,具有脂肪酸的代谢效率极低的倾向。另外,溶解氧浓度为8mg/l以下、优选为5mg/l以下、更优选为3mg/l以下。溶解氧浓度超过8mg/l的情况下,在培养基中的氧的作用下脂肪酸会发生氧化,具有植物活化效果降低的倾向。需要说明的是,溶解氧浓度为利用株式会社堀场制作所制造的溶解氧仪在P0电极上通过隔膜伽伐尼电极法或隔膜极谱法进行测定而得到的值。

[0060] 上述溶解氧浓度可以通过培养容器、振荡数、通气量等进行调整。

[0061] 上述脂肪酸代谢工序中的培养条件中,除了使溶解氧浓度为规定的范围以外,可以与现有的需氧性细菌的培养条件为同样的条件。例如可以举出烧瓶振荡、利用基于旋转烧瓶或发酵槽的通气培养进行3~7天培养的方法。

[0062] 培养天数优选为充分进行脂肪酸的乳化、分解等的天数,但培养天数根据搅拌、菌量而变化。需要说明的是,关于脂肪酸代谢工序的终止,优选通过波长230nm处的吸光度、薄层色谱法(TLC)、高效液相色谱(HPLC)、气相色谱质谱分析(GC/MS)、液相色谱质谱分析(LC/MS)等来确认脂肪酸的分解状态。

[0063] 脂肪酸代谢工序中的温度可以根据所使用的变形菌适宜地调整,从脂肪酸的代谢效率的方面出发,优选在10~40℃的条件下实施、更优选在20~30℃的条件下实施。

[0064] 脂肪酸代谢工序中的脂肪酸和变形菌可以使用本发明的植物活化剂的说明中的上述物质。

[0065] 需要说明的是,作为变形菌的预培养工序没有特别限定,可以为现有的需氧性细菌的培养方法。经预培养的变形菌优选通过离心分离等仅回收菌体,用于脂肪酸代谢工序中。

[0066] 从脂肪酸和脂肪酸代谢物可溶于水、代谢效率和处理性的方面出发,优选由本发明的制造方法得到的植物活化剂除了含有脂肪酸代谢物以外还含有生物表面活性剂。需要说明的是,本发明的生物表面活性剂是来源于变形菌的表面活性剂。

[0067] 本发明的植物活化剂以培养液的形式得到,该培养液为其与培养基、包含生物表面活性剂的变形菌的外分泌物、菌体等的混合物。可以将该培养液作为本发明的植物活化剂,也可以通过离心分离等从该培养液中除去菌体来使用。培养液也可以直接使用原液,但在原液的情况下,在高温时矿物质成分蒸发浓缩,在渗透压的影响下,对植物进行处理的部分可能会收缩,因而优选进行稀释。作为稀释倍率,只要可发挥出本发明的效果就没有特别限定,优选稀释100~500倍。需要说明的是,所除去的菌体可以再次用含有脂肪酸的培养基进行培养,由此反复进行脂肪酸代谢工序。

[0068] 实施例

[0069] 基于实施例说明本发明,但本发明并不仅限于实施例。

[0070] 试验用植物活化剂的制备

[0071] <预培养工序>

[0072] 在玻璃制三角烧瓶内的1l水中溶解蛋白胨(Difco制造的蛋白质酶水解物)20g、硫酸镁七水合物1.5g、磷酸氢二钾1.5g,进行121℃、20分钟的高压釜灭菌,冷却至室温后,接种变形菌的菌液。需要说明的是,培养容器口塞上硅胶塞。将接种后的容器使用BioShaker(TAITEC株式会社制造的BR-23UM)在20℃、120rpm的条件下进行24小时培养。培养液中的菌数为 5×10^8 个细胞/ml。培养后,将培养液在15,000×G、20℃的条件进行离心分离,由此将菌体从培养液中分离出并回收菌体。

[0073] <脂肪酸代谢工序>

[0074] 在玻璃制三角烧瓶内的1l灭菌水中加入亚油酸(和光纯药工业株式会社制造的一级亚油酸)12g、硫酸镁七水合物1.5g、磷酸氢二钾1.5g和由预培养工序得到的全部量的菌体。将其使用BioShaker(TAITEC株式会社制造的BR-23UM)在20℃、120rpm、溶解氧浓度4mg/l的条件下进行4天培养。需要说明的是,亚油酸的分解如下进行确认:利用株式会社岛津制

作所制造的分光光度计BioSpec-mini测定波长230nm的吸光度,由此对培养液进行分析,通过作为亚油酸中间产物之一的氧化脂质的生成程度来确认亚油酸的分解。培养后,将包含菌体的培养液作为试验用植物活化剂,进行下述的评价。

[0075] 黄瓜叶的灰霉病菌

[0076] • 实施例1

[0077] 将用水稀释至500倍的试验用植物活化剂用壶喷雾至生长中的黄瓜的本叶。喷雾后24小时后,使浸渗了灰霉病菌的孢子悬浮液的滤纸与喷雾处理后的本叶接触,由此接种病原菌。其后在 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、高湿度的环境下使其生长5天,对病原菌接种部位的病征进行评价。将结果示于表1。另外,预防效果基于下述的基准进行判断。

[0078] ◎:无病征

[0079] ○:稍微确认到由坏死等所致的褐变等病征

[0080] △:明显确认到坏死等褐变症状或者病原菌接种部位整体黄变等病征

[0081] ×:确认到接种部位整体呈由坏死等所致的褐变症状、或者褐变面积不大但在病原菌接种部位开孔的程度的病征

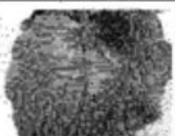
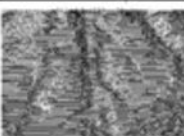
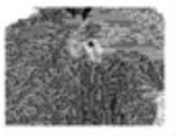
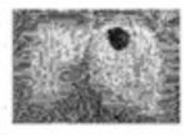
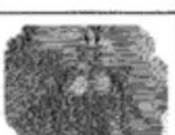
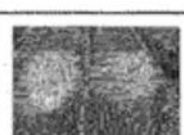
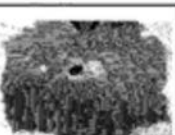
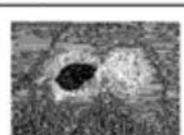
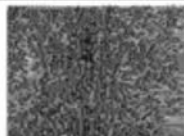
[0082] • 比较例1~5

[0083] 除了使用水、500倍稀释木醋液、0.04%山梨糖醇酐脂肪酸水溶液、0.2%碳酸氢钾与0.01%聚氧乙烯壬基苯基醚的混合水溶液、乳化后的0.08%四氯间苯二甲腈水溶液来代替试验用植物活化剂以外,与实施例1同样地进行处理观察。将结果示于表1。

[0084] [表1]

[0085] 表1

[0086]

		处理剂	病征			预防效果
			整体照片	放大照片	评价	
实施例	1	试验用植物活化剂			无病征	◎
比较例	1	水			有坏死、变色	×
	2	木醋液			有坏死、变色	×
	3	山梨糖醇酐脂肪酸水溶液			有部分坏死、变色	△
	4	碳酸氢钾+聚氧乙烯壬基苯基醚			有坏死、变色	×
	5	四氯间苯二甲腈水溶液			无病征	◎

[0087] 根据表1所示的结果可知,本发明的植物活化剂诱导出了针对黄瓜灰霉病的抗性。

[0088] 拟南芥的根

[0089] • 实施例2~4

[0090] 通过灌注稀释至10倍、100倍和500倍的试验用植物活化剂而对用土壤栽培中的拟南芥的根进行处理。处理后24小时后对地上的叶茎接种软腐病菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)。之后在 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、高湿度的环境下使其生长3天,截止1周后对病原菌接种部位的病征进行评价。将结果示于表2。发病抑制基于下述的基准进行判断。

[0091] ◎:与无处理相比,每总叶面积的无病征叶的面积为1.60倍以上

[0092] ○:与无处理相比,每总叶面积的无病征叶的面积为1.40~1.59倍

[0093] △:与无处理相比,每总叶面积的无病征叶的面积为1.20~1.39倍

[0094] ×:与无处理相比,每总叶面积的无病征叶的面积小于1.20倍

[0095] 进一步在处理24小时后从各拟南芥中提取RNA,制作cDNA,利用实时PCR研究水杨酸途径基因和茉莉酮酸途径基因的表达量。需要说明的是,基因表达量是将管家基因的表达量作为阴性对照来进行测量的。将水杨酸途径的PR1、PR2、PR5、茉莉酮酸途径的PR3、PR4和PDF1的表达量示于图1。将PR1在实时PCR中的PCR扩增曲线示于图2。

[0096] • 比较例6~13

[0097] 除了使用水、过氧化脂质、噻菌灵、异噻菌胺、阿拉酸式苯-S-甲基 (ASM)、3'-氯-4,

4'-二甲基-1,2,3-噻二唑-5-甲酰苯胺(噻酰菌胺)、酮醇脂肪酸水溶液1和酮醇脂肪酸水溶液2来代替试验用植物活化剂以外,与实施例2同样地进行处理观察。将结果示于表2。

[0098] 比较例7中使用的过氧化脂质通过下述的制备方法来制备。

[0099] 在三角烧瓶中加入蒸馏水100ml、32%氢氧化钠水溶液1ml,用搅拌子进行搅拌,用热水浴使其为50℃。进一步加入亚油酸(和光纯药工业株式会社制造的一级亚油酸)1.2g、35%过氧化氢0.53ml,在热水浴中在大气压下在50℃回流反应3天。关于反应进展,使用硅胶板(玻璃板上的Merck公司制造的60F254)、展开溶剂为氯仿:甲醇=10:1、通过硫酸显色进行确认。在原料斑点的正下有UV吸收且可用硫酸显色的斑点为过氧化脂质,在其相对于原料估计为约4~5成时使反应终止。将所得到的反应物用5%盐酸中和,加入氯仿,回收氯仿层,利用分液漏斗用水和饱和食盐水进行清洗,用无水芒硝脱水后,仅过滤回收氯仿层,进行浓缩、真空干燥,得到糊浆状的亚油酸氧化物。将所得到的亚油酸氧化物0.6g、磷酸氢二钾75mg、硫酸镁七水合物75mg一起悬浮在蒸馏水中,制成过氧化脂质。

[0100] 比较例12中使用的酮醇脂肪酸水溶液1通过下述的制备方法来制备。

[0101] 将大豆来源的脂肪氧化酶(SIGMA-ALDRICH公司制造)10mg加入到由亚油酸1g、磷酸二氢钾0.15g和蒸馏水100ml构成的亚油酸悬浮液中,搅拌1昼夜,生成过氧化脂质1。需要说明的是,过氧化脂质的生成通过基于TLC(展开溶剂氯仿:乙醇=20:1、硫酸显色)的与标准物质的比较以及OD_{234nm}的提高来确认。另外,通过NMR确认到过氧化脂质1的主要成分为13HPODE((9Z,11E)-13-(氢过氧化)-9,11-十八碳二烯酸)。

[0102] 在所得到的过氧化物质1中加入丙二烯氧化物合酶(SIGMA-ALDRICH公司制造)0.1mg,搅拌1昼夜,由此制成酮醇脂肪酸,之后在冰冷却下添加稀盐酸,使反应液的pH为3.0,由此使酶反应停止。之后将pH调整为6.5,制成酮醇脂肪酸水溶液1。

[0103] 比较例13中使用的酮醇脂肪酸水溶液2通过下述的制备方法来制备。

[0104] 将玉米胚芽10g用研钵磨碎,加入蒸馏水30ml,进一步在研钵上磨碎,制成悬浮液。将所得到的悬浮液在16000rpm离心分离15分钟,将由此得到的上清作为含有来自玉米胚芽的脂氧合酶的物质。

[0105] 将含有来自玉米胚芽的脂氧合酶的物质10mg加入到由亚油酸1g、磷酸二氢钾0.15g和蒸馏水100ml构成的亚油酸悬浮液中,搅拌1昼夜,生成过氧化脂质2。需要说明的是,过氧化脂质的生成通过基于TLC(展开溶剂氯仿:乙醇=20:1、硫酸显色)的与标准物质的比较以及OD_{234nm}的提高来确认。另外,通过NMR确认到过氧化脂质2的主要成分为9HPODE((9S,10E,12Z)-9-(氢过氧化)-10,12-十八碳二烯酸)。

[0106] 在所得到的过氧化物质2中加入丙二烯氧化物合酶(SIGMA-ALDRICH公司制造)0.1mg,搅拌1昼夜,由此制成酮醇脂肪酸,之后在冰冷却下添加稀盐酸,使反应液的pH为3.0,由此使酶反应停止。之后将pH调整为6.5,制成酮醇脂肪酸水溶液2。

[0107] [表2]

[0108] 表2

[0109]

		处理剂	发病抑制
实施例	2	10 倍稀释 试验用植物活化剂	◎
	3	100 倍稀释 试验用植物活化剂	◎
	4	500 倍稀释 试验用植物活化剂	○
比较例	6	水	×
	7	过氧化脂质	△
	8	噻菌灵	△
	9	异噻菌胺	△
	10	ASM	◎
	11	噻酰菌胺	×
	12	酮醇脂肪酸 水溶液 1	×
	13	酮醇脂肪酸 水溶液 2	×

[0110] 由表2和图1所示的结果可知,本发明的植物活化剂诱导出了针对拟南芥的软腐病的抗性。另外可知,基因的表达量在水杨酸途径、茉莉酮酸途径中均高于ASM、噻菌灵。

[0111] 番茄的叶茎(盆栽培)

[0112] • 实施例5

[0113] 将试验用植物活化剂的原液10ml灌注到用盆栽培了3周的番茄(桃太郎(Momotaro))的叶茎。需要说明的是,在灌注前将盆中的土(约100g)充分润湿。在灌注后1小时后和24小时后将青枯病菌接种至叶茎。之后在30℃、高湿度的环境下使其生长7天,对青枯病的发病率和药害的发生率进行评价。将结果示于表3。

[0114] 进一步从接种后24小时后和72小时后的各番茄中提取RNA来制作cDNA,通过实时PCR对水杨酸途径基因和茉莉酮酸途径基因的表达量进行研究。需要说明的是,基因表达量以将无处理的表达量设为1的情况下的指数来表示。将结果示于表3。

[0115] • 比较例14和15

[0116] 除了使用水和脂肪酸(亚油酸)来代替试验用植物活化剂以外,与实施例5同样地进行处理、观察。将结果示于表3。

[0117] [表3]

[0118] 表3

[0119]

		处理剂	发病率	药害 发生率	基因表达量			
					水杨酸途径		茉莉酮酸途径	
					24 小时后	72 小时后	24 小时后	72 小时后
实施例	5	试验用 植物活化剂	50%	0%	11.0	7	3	3.5
比较例	14	无处理	100%	0%	1	1	1	1
	15	脂肪酸	100%	0%	0	0	0.5	1

[0120] 由表3所示的结果可知,本发明的植物活化剂可在不会产生药害的情况下诱导出针对番茄的青枯病的抗性。另外可知,基因的表达量在水杨酸途径、茉莉酮酸途径中均很高。

[0121] 番茄的叶茎(农田)

[0122] • 实施例6

[0123] 将番茄(丽夏(Reika))苗以60cm的株间种植在爆发了青枯病的农田中,将用水稀释至50倍的试验用植物活化剂每周实施喷雾(20ml/株)和/或土壤灌注(200ml/株)。其后4周每周对青枯病的发病率和药害的发生率进行评价。将结果示于表4。

[0124] • 比较例16和17

[0125] 除了使用无处理和多效霉素来代替试验用植物活化剂以外,与实施例6同样地进行处理、观察。将结果示于表4。

[0126] [表4]

[0127] 表4

[0128]

		处理剂	发病率				药害发生率			
			第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
实施例	6	试验用 植物活化剂	0%	0%	0%	33%	0%	0%	0%	0%
比较例	16	无处理	0%	0%	42%	75%	0%	0%	0%	0%
	17	多效霉素	0%	0%	0%	67%	100%	100%	100%	100%

[0129] 由表4所示的结果可知,本发明的植物活化剂可抑制番茄的药害的发生,同时诱导出了针对青枯病的抗性。

[0130] 迷你蔷薇的叶茎(栽植器)

[0131] • 实施例7

[0132] 将用水稀释至100倍的试验用植物活化剂在刚种植后和以1周间隔喷雾(50ml/株左右)至种植在室外栽植器中的迷你蔷薇(红色)的叶茎,在第1周和第4周对自然发生的病害(霜霉病和黑星病)进行评价。将结果示于表5。

[0133] • 比较例18和19

[0134] 除了使用无处理和0.02%啞菌胺来代替试验用植物活化剂以外,与实施例7同样

地进行处理、观察。将结果示于表5。

[0135] [表5]

[0136] 表5

[0137]

		处理剂	发病率			
			霜霉病		黑星病	
			第 1 周	第 4 周	第 1 周	第 4 周
实施例	7	试验用植物活化剂	12.5%	20.8%	0%	0%
比较例	18	无处理	29.1%	25.0%	0%	0%
	19	噬菌胺	20.0%	30.0%	0%	15%

[0138] 由表5所示的结果可知,本发明的植物活化剂诱导出了针对迷你蔷薇的霜霉病和黑星病的抗性。

[0139] 迷你蔷薇的叶茎(盆)

[0140] • 实施例8~10

[0141] 将用水稀释至10倍、100倍和500倍的试验用植物活化剂在刚种植后、1周后、2周后和3周后喷雾(50ml/株左右)至盆栽的迷你蔷薇(红色)的叶茎,转移到铺有湿纸巾的密封箱中,在多湿条件下栽培。1周后以相对于无处理的比较区域的防病率对于自然发生的病害(灰霉病)进行评价。将结果示于表6。

[0142] [表6]

[0143] 表6

[0144]			处理剂	防病率
	实施例	8	10 倍稀释 试验用植物活化剂	100%
		9	100 倍稀释 试验用植物活化剂	89%
		10	500 倍稀释 试验用植物活化剂	100%

[0145] 由表6所示的结果可知,本发明的植物活化剂诱导出了针对迷你蔷薇的灰霉病的抗性。

[0146] 草坪草的生长促进(发芽率)

[0147] • 实施例11

[0148] 在培养皿中铺上湿滤纸,在其上等间隔排列30粒混合草坪草(西洋芝)的种子。将用水稀释至500倍的试验用植物活化剂注入至滤纸,在培养皿加盖的状态下,在 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 在植物培育光照环境16小时、暗条件8小时的反复条件下,对3天后和5天后主根的发芽率进行评价。将结果示于表7。

[0149] • 比较例20

[0150] 除了使用水来代替试验用植物活化剂以外,与实施例11同样地进行处理、观察。将

结果示于表7。

[0151] [表7]

[0152] 表7

[0153]			处理剂	发芽率	
				第 3 天	第 5 天
	实施例	11	试验用 植物活化剂	53%	80%
比较例	20	水	27%	47%	

[0154] 由表7所示的结果可知,本发明的植物活化剂促进了混合草坪草的发芽。

[0155] 草坪草的生长促进(叶茎生长)

[0156] • 实施例12~14

[0157] 在72孔的单元格托盘(cell tray)中放入种植用培土,播种草坪草的种子,将用研钵粉碎的红玉土过筛覆薄土。将该单元格托盘置于不锈钢制造的容器(タッパー)中,铺设1cm左右的水进行底面给水。将其在 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 在植物培育光照环境16小时、暗条件8小时的反复条件下进行培育。需要说明的是,在底面的水不完整的时刻进行水的补给。之后,在确认到全部单元格的发芽后,将稀释至10倍、100倍和500倍的试验用植物活化剂通过喷雾以各单元格分别为5ml进行喷雾处理,测定14天的叶茎的长度并进行评价。将结果示于表8。

[0158] • 比较例21

[0159] 除了使用水来代替试验用植物活化剂以外,与实施例12同样地进行处理、观察。将结果示于表8。

[0160] [表8]

[0161] 表8

[0162]

		处理剂	叶长(cm)			
			第7天	第10天	第12天	第14天
实施例	12	10倍稀释 试验用植物活化剂	3.0	5.1	5.7	6.2
	13	100倍稀释 试验用植物活化剂	3.8	4.8	5.2	5.7
	14	500倍稀释 试验用植物活化剂	2.8	4.1	4.6	5.5
比较例	21	水	2.5	3.5	3.9	5.1

[0163] 由表8所示的结果可知,本发明的植物活化剂促进了混合草坪草的茎叶的生长。

[0164] 茄的生长促进

[0165] • 实施例15

[0166] 将在盆中生长至15cm以上的茄(砧木:红茄、接穗:“千两(Senryo)”茄)苗17株以株间60cm种植,适宜地将化成肥料、配方肥料和有机质肥料作为基肥,并进行追肥。将用水稀释至50~100倍的试验用植物活化剂在刚种植后和以1周间隔进行喷雾(20~50ml/株左右)

和灌注(100~300ml/株左右)。之后,每周收获15cm以上的果实,对收获个数进行评价。另外,关于整枝,全部整枝(仕立て)成3枝,种植1周后测定主茎的茎长,进行评价。将结果示于表9。

[0167] 此外,在种植后2、3个月后,对莖充分给水使其柔软后,一边拆分植株根部一边将植株拔出。拔出后,在地上部1cm处切断,对根侧进行水洗,常温下干燥1天后,用60℃的恒温干燥器(三洋电机株式会社制造的MOV-112U)干燥24小时,用电子天平(株式会社岛津制作所制造的UX220H)测量干燥重量。将针对任意选择的3株的测量结果示于表10。另外,对干燥后的根进行拍摄,将照片示于图3和图4。

[0168] • 比较例22

[0169] 除了以无处理来代替试验用植物活化剂以外,与实施例15同样地进行处理、观察。将结果示于表9和表10以及图3和图4。

[0170] [表9]

[0171] 表9

[0172]

		处理剂	平均主茎长(cm)					每1株收获果实数(个)				
			第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周
实施例	15	试验用植物活化剂	35.8	47.2	54.3	65.2	76.2	0.9	0.2	0.6	0.8	2.0
比较例	22	无处理	35.6	45.5	51.7	58.4	70.4	0.9	0.1	0.5	0.5	0.9

[0173] [表10]

[0174] 表10

[0175]			处理剂	干燥重量(g)			平均	标准偏差
	实施例	15	试验用 植物活化剂	11.606	10.476	8.163	10.08	1.755
	比较例	22	无处理	6.313	5.721	6.561	6.20	0.4316

[0176] 由表9和表10以及图3和图4所示的结果可知,本发明的植物活化剂促进了茄的生长。

[0177] 由上述结果可知,本发明的植物活化剂和通过本发明的制造方法制造出的植物活化剂是土壤污染和毒性低、抗性诱导效果和生长促进效果优异的植物活化剂。

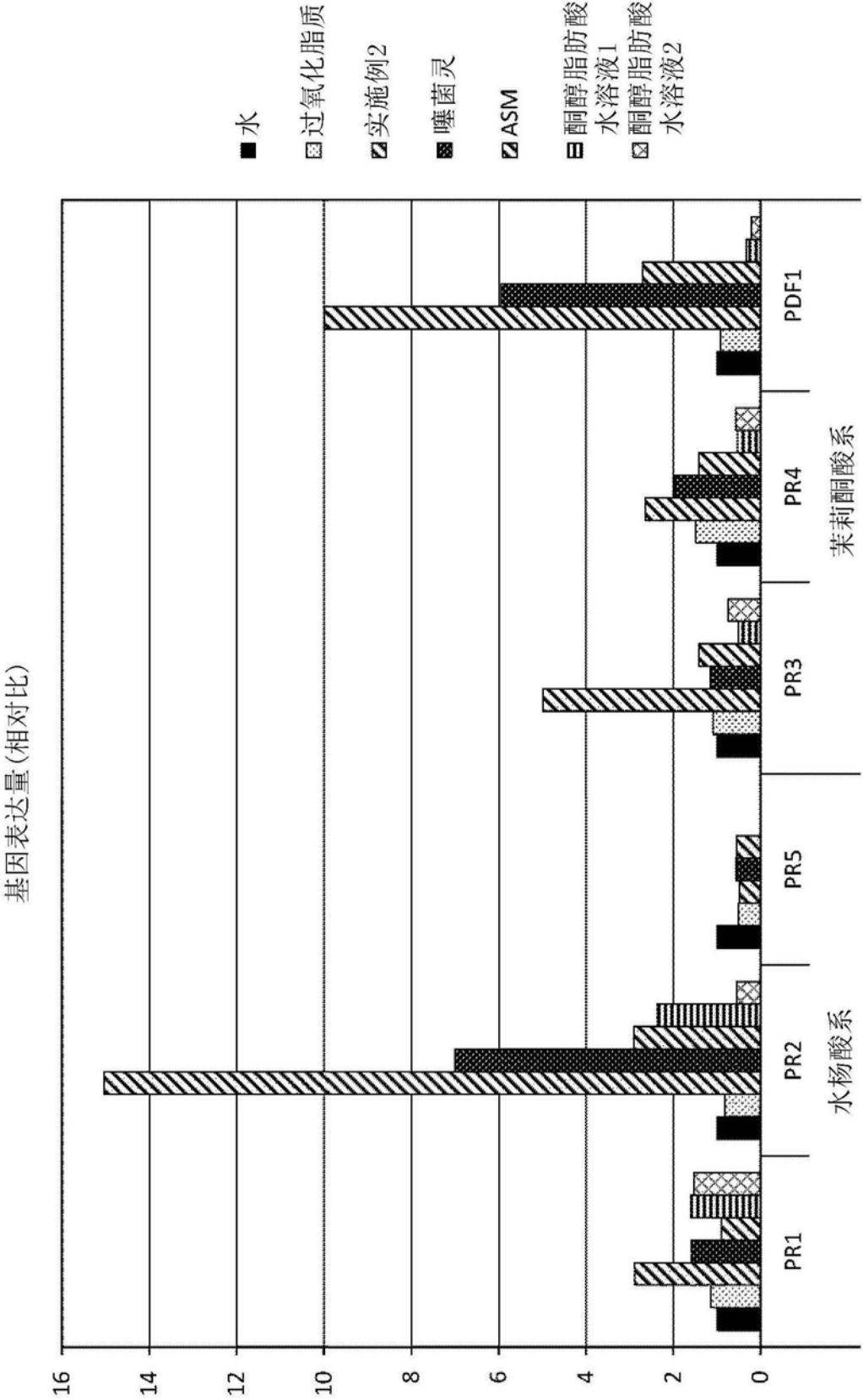


图1

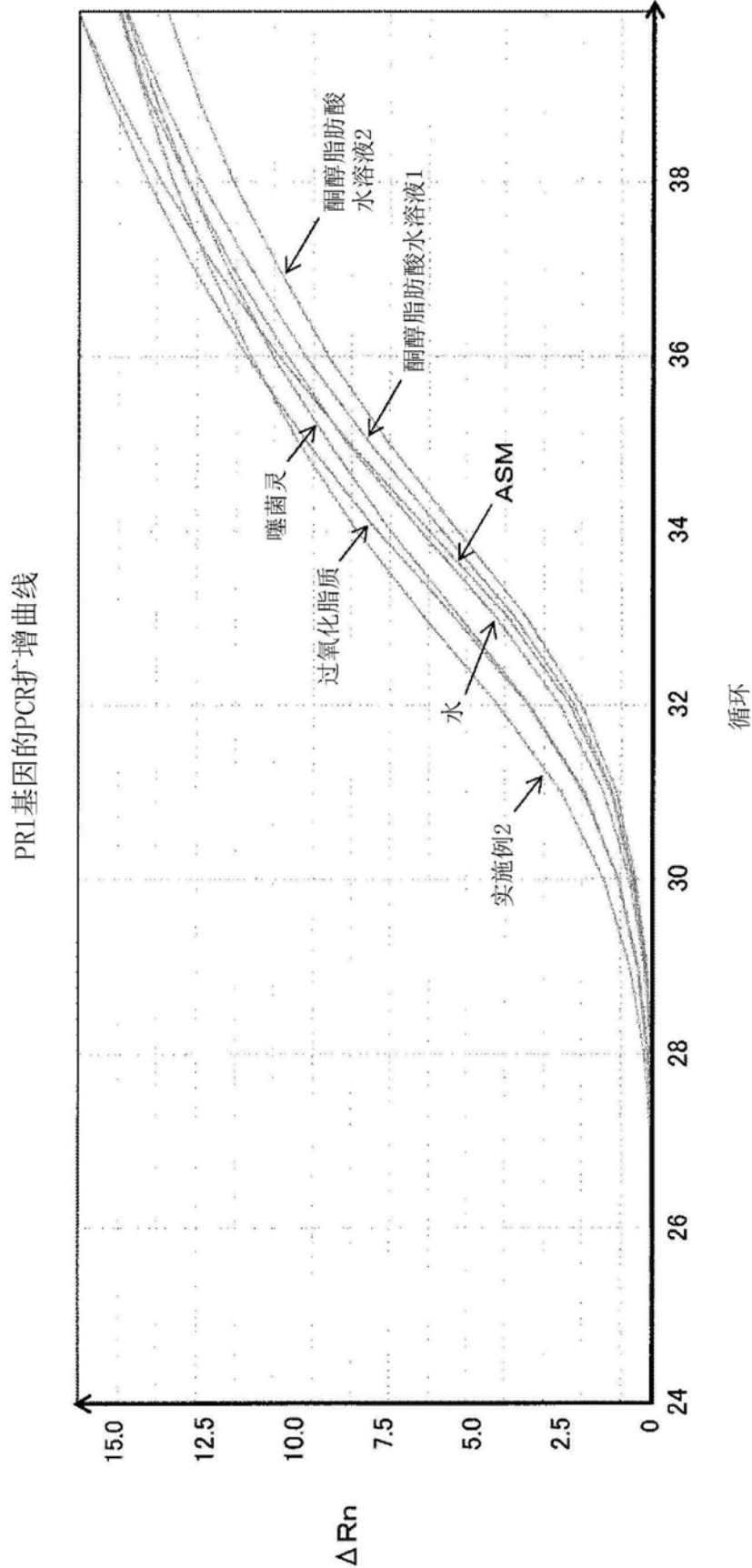
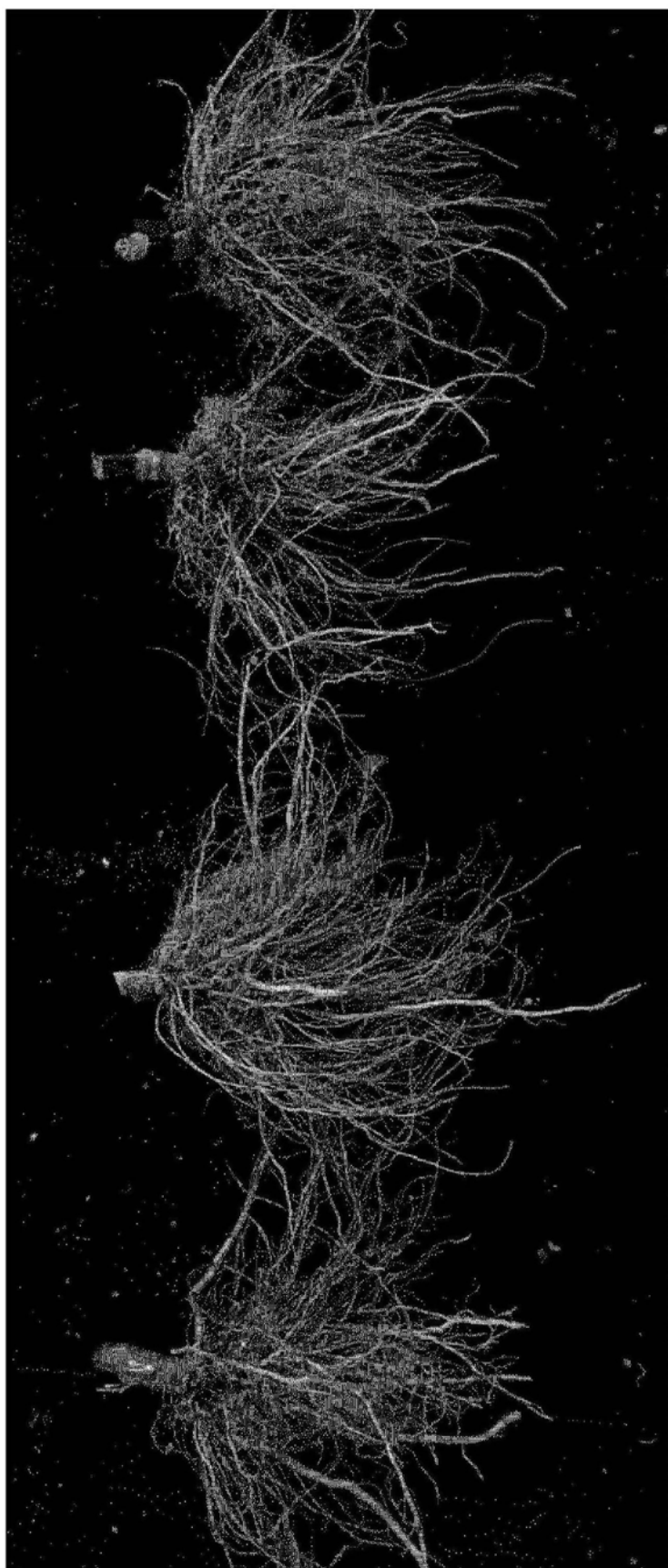


图2



比较例22

实施例15

图3

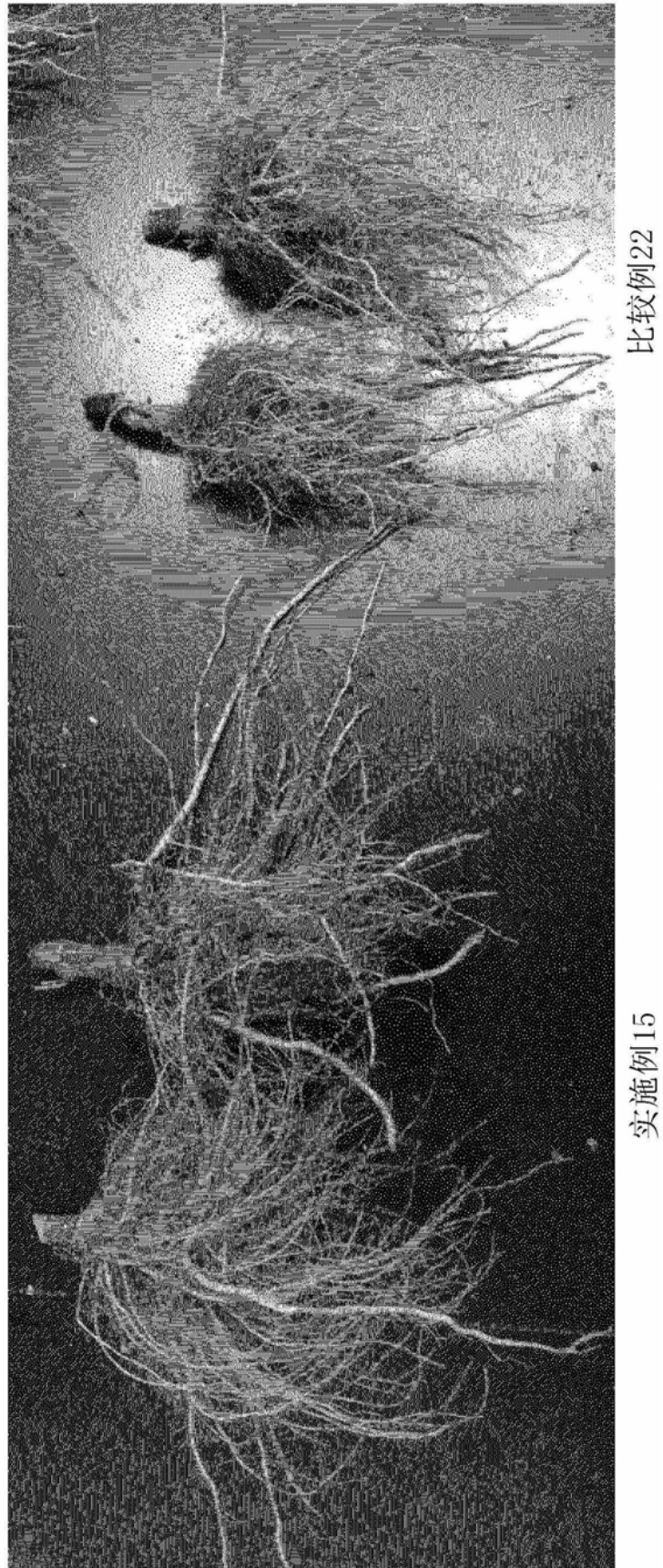


图4