

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6054392号
(P6054392)

(45) 発行日 平成28年12月27日 (2016. 12. 27)

(24) 登録日 平成28年12月9日 (2016. 12. 9)

(51) Int. Cl.	F 1	
AO 1 N 63/00 (2006. 01)	AO 1 N 63/00	F
AO 1 N 47/24 (2006. 01)	AO 1 N 47/24	Z
AO 1 P 5/00 (2006. 01)	AO 1 P 5/00	
AO 1 M 1/20 (2006. 01)	AO 1 M 1/20	A
AO 1 N 47/34 (2006. 01)	AO 1 N 47/34	C
請求項の数 17 (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-522939 (P2014-522939)	(73) 特許権者	507124988
(86) (22) 出願日	平成24年7月24日 (2012. 7. 24)		バイエル クロップサイエンス エルピー
(65) 公表番号	特表2015-502912 (P2015-502912A)		BAYER CROPSCIENCE L
(43) 公表日	平成27年1月29日 (2015. 1. 29)		P
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/047963		アメリカ合衆国 27709 ノースカロ
(87) 国際公開番号	W02013/016328		ライナ州 リサーチ トライアングル パ
(87) 国際公開日	平成25年1月31日 (2013. 1. 31)		ーク ティ. ダブリュ. アレクサンダー
審査請求日	平成27年5月22日 (2015. 5. 22)		ドライブ 2
(31) 優先権主張番号	61/511, 508	(74) 代理人	100114188
(32) 優先日	平成23年7月25日 (2011. 7. 25)		弁理士 小野 誠
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100119253
(31) 優先権主張番号	61/661, 763		弁理士 金山 賢教
(32) 優先日	平成24年6月19日 (2012. 6. 19)	(74) 代理人	100124855
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 坪倉 道明
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 線虫の生物学的防除

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

植物及び / 又は植物生育の場所に、有効量の枯草菌 (Bacillus subtilis) Q S T 7 1 3 を適用する工程を含む、線虫防除方法。

【請求項 2】

前記適用の前に、前記植物及び / 又は前記植物生育の場所に処理が必要であることを確認する工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記場所が土壌である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記枯草菌 Q S T 7 1 3 を植物の植え付け前に、植物の植え付け時に、畝間に、または、植物の植え付け後に適用する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記枯草菌 Q S T 7 1 3 を、土壌灌注処理の場合は 1 エーカー当たり $2 \times 10^{12} \sim 6 \times 10^{13}$ cfu、又は畝間処理の場合は 1 列 1000 フィート当たり $6 \times 10^{10} \sim 4 \times 10^{12}$ cfu の割合で適用する、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記割合が、1 エーカー当たり $1 \times 10^{13} \sim 6 \times 10^{13}$ cfu、又は 1 列 1000 フィート当たり $7.5 \times 10^{11} \sim 4 \times 10^{12}$ cfu である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記枯草菌 Q S T 7 1 3 を、植物の根と接触している土壌、又は植物の基部にある土壌に適用する、請求項 3 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記枯草菌 Q S T 7 1 3 を、1 回適用として土壌 1 グラム当たり $7 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ c f u の割合で適用する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記枯草菌 Q S T 7 1 3 を、1 回適用として土壌 1 グラム当たり $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ c f u の割合で適用する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記枯草菌 Q S T 7 1 3 を、複数回適用で土壌灌注処理の場合は適用ごとに 1 エーカー当たり $2 \times 10^{12} \sim 6 \times 10^{13}$ c f u の割合で適用する、請求項 5 に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記枯草菌 Q S T 7 1 3 を、複数回適用で適用ごとに土壌 1 グラム当たり $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ c f u の割合で適用する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 12】

前記枯草菌 Q S T 7 1 3 を種子に適用する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 13】

第 2 の殺線虫剤を適用する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

20

前記枯草菌 Q S T 7 1 3 を、植物の植え付け時に前記第 2 の殺線虫剤と組み合わせて適用し、その後の適用では枯草菌 Q S T 7 1 3 を単独で適用する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記第 2 の殺線虫剤がオキサミルである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

枯草菌 Q S T 7 1 3 と、生物学的殺線虫剤から選択される第 2 の殺線虫剤とを含む、線虫防除用組成物。

【請求項 17】

枯草菌 Q S T 7 1 3 を含む、殺線虫剤。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

[0001] 本出願は、米国特許法第 119 条により以下の仮特許出願、すなわち 2011 年 7 月 25 日出願の米国仮特許出願第 61 / 511, 508 号、2011 年 11 月 4 日出願の米国仮特許出願第 61 / 556, 016 号、及び 2012 年 6 月 19 日出願の米国仮特許出願第 61 / 661, 763 号に基づく優先権を主張する。上記仮出願はそれぞれ、参照により全体を組み込むものとする。

【0002】

40

(技術分野)

[0002] 本発明は植物寄生線虫の防除に関する。

【背景技術】

【0003】

[0003] 植物寄生線虫は広範な作物に重大な損害を引き起こし、その結果、世界的作物収量の損失は年間 5% ~ 12% の範囲になると推定される。線虫による根の損傷は一般的であり、発育阻害の植物につながり、これは根系が小型化し、葉にミネラル欠乏の徴候を示して萎れやすい。線虫による損傷は、植物が多種多様な植物病理学的菌類及び細菌類に感染する素因ともなる。

【0004】

50

[0004] 線虫と戦い、防除するために、農家は通常、化学的殺線虫剤を使用する。それは、臭化メチル及びククロピクリンなどの気体及び液体燻蒸から、チオナジン及びオキサミルなどの有機リン酸塩及びカルバミン酸塩の適用にまで及ぶ。これらの化学的殺線虫剤の使用は数十年間続いている。標的線虫を防除する上で化学的殺線虫剤は効果的であるが、これらの方法には深刻な限界がある。1つの限界は、化学的殺線虫剤が既に根に侵入している線虫には作用できないことである。別の限界は、化学的殺線虫剤の生産及び使用に伴う危険性である。化学的殺線虫剤は毒性が強く、ヒトの中毒及び死につながることもある。その結果、複数の国が特定の農薬を制限し、時には禁止している。特に臭化メチルはオゾン層破壊効果により大部分の国で禁止されている。

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

[0005] これらの制限及び禁止により、実行可能な線虫解決策が不足している。本発明は、化学的農薬の使用に取って代わるか、その使用を低減する安全で効果的な手段を提供する。線虫が植物の根に侵入することを阻止することと、次にこの最初のバリアを何とか克服した線虫の成熟を防止することという双方の解決策を提供するという点でもユニークである。

【0006】

[0006] 本発明は、植物寄生線虫を防除する方法及び組成物を提供する。本発明は、線虫を防除する方法であって、植物、植物の部分及び/又は植物の所在地に有効量の枯草菌 Q S T 7 1 3、枯草菌 Q S T 7 1 3 の変異体及び/又は枯草菌 Q S T 7 1 3 の代謝産物を適用することを含む方法を提供する。幾つかの実施形態では、枯草菌 Q S T 7 1 3 は、枯草菌 Q S T 7 1 3、その代謝産物、及び任意選択で残留発酵培養液 (residual fermentation broth) を含む発酵生成物として適用される。一実施形態では、発酵生成物は実質的に枯草菌 Q S T 7 1 3 の細胞又は枯草菌 Q S T 7 1 3 の変異体の細胞で構成される。

20

【課題を解決するための手段】

【0007】

[0007] 本発明の枯草菌系組成物は、ネコブセンチュウの卵を減少させ、ネコブセンチュウの植物侵入を低減し、及び/又は植物に侵入するネコブセンチュウの成熟を阻害する。幾つかの実施形態では、標的線虫 (すなわち、防除される線虫) は病害を引き起こすネコブセンチュウである。特定の場合では、線虫はメロイドギネ種である。他の実施形態では、本発明の組成物の標的線虫はシストセンチュウである。特定の場合、標的線虫はヘテロデラ種である。他の実施形態では、標的線虫はグロボデラ種である。他の実施形態では、標的線虫は以下の種、すなわち、パラティレンクス種、プラティレンクス種、パラトリコドルス種、クリコネメラ種、ヘリコチレンクス種、メロイドギネ種、及びクリコネモイド種である。特定の場合、線虫はヘリコチレンクス・シュードロブスタス (Helicotylenchus pseudorobustus) (らせん H P) 又はヘリコチレンクス・ディゴニカス (Helicotylenchus digonicus) (らせん H D) である。

30

【0008】

[0008] 幾つかの実施形態では、上記組成物を少なくとも1つの他の農薬、例えば殺菌剤、殺虫剤、殺線虫剤又は除草剤と混合する。一実施形態では、農薬は殺線虫剤である。特定の実施形態では、本発明の枯草菌系組成物を、市販品でもよい配合殺線虫剤とタンク混合する。他の実施形態では、複数の活性物質が1つの生成物を形成するように、枯草菌系組成物を活性成分 (すなわち、菌、昆虫、線虫又は雑草に対して活性がある化合物) と混合し、その後不活性物質が配合される。一実施形態では、他の殺線虫剤の活性成分はカルバメート又は有機リン酸塩である。別の実施形態では、それは生物学的殺線虫剤である。

40

【0009】

[0009] 本発明は、枯草菌 Q S T 7 1 3 又はその変異体、及び第2の線虫防除剤を含む組成物を提供する。幾つかの実施形態では、第2の線虫防除剤はカルバメート又は有機リン

50

酸塩である。

【 0 0 1 0 】

[0010] 本発明はさらに、配合不活性物質又は他の配合成分、例えば多糖類（デンプン、マルトデキストリン、メチルセルロース、ホエータンパクなどのタンパク質、ペプチド、ガム）、糖類（乳糖、トレハロース、蔗糖）、脂質（レシチン、植物油、鉱物油）、塩（塩化ナトリウム、炭酸カルシウム、クエン酸ナトリウム）、及びケイ酸塩（粘土、非晶質シリカ、ヒュームド/沈降シリカ、ケイ酸塩）などをさらに含む本発明の組成物のいずれかを提供する。組成物を土壌に適用するような幾つかの実施形態では、本発明の組成物は、土壌内への組成物の取り込みを促進する水又は鉱物、又は泥炭などの有機物質のような担体を含む。組成物を種子処理に、又は根の浸液として使用するような幾つかの実施形態では、担体は、種子又は根への組成物の付着を促進する結合剤又は固着剤である。組成物を種子処理剤として使用する別の実施形態では、配合成分は着色剤である。他の組成物では、配合成分は保存剤である。

10

【 0 0 1 1 】

[0011] 幾つかの実施形態では、植え付け前に、植物、植物部分、又は土壌などの植物の所在地に組成物を適用する。他の実施形態では、植え付け時に組成物を適用する。さらに他の実施形態では、植え付け後に組成物を適用する。

【 0 0 1 2 】

[0012] 特定の実施形態では、組成物を適用する前に、成長するために植物及び/又は植物の所在地が処理を必要とすることを確認することを含むステップがある。幾つかの実施形態では、確認は、植物成長のための場所が線虫侵襲の経済的閾値（economic threshold）を超えていることを判定することを含む。

20

【 0 0 1 3 】

[0013] 幾つかの実施形態では、本発明は、枯草菌 Q S T 7 1 3 又はその変異体、及び殺線虫剤としてそれを使用するための指示書を含むキットを包含する。幾つかの実施形態では、これらの指示書は製品ラベルである。幾つかの実施形態では、指示書は枯草菌 Q S T 7 1 3 又はその変異体を 1 エーカー当たり約 2×10^{12} c f u ~ 約 6×10^{13} c f u の間の割合で使用するように使用者に指示する。幾つかの実施形態では、これらの指示書は、化学的殺線虫剤との組み合わせで枯草菌を殺線虫剤として使用するためのものである。特定の場合、指示書は、単独処理として使用する場合、製品ラベルで化学的殺線虫剤に推奨される割合よりも低い割合で化学的殺線虫剤を使用するように使用者に指示する。幾つかの他の実施形態では、指示書は、枯草菌 Q S T 7 1 3 又はその変異体を、植物の根と接触している土壌に、植物の基部の土壌に、又は植物の基部の周囲で特定の距離以内（例えば植物の基部の周囲約 5 c m、約 1 0 c m、約 1 5 c m、約 2 0 c m、約 2 5 c m、約 3 0 c m、約 3 5 c m、約 4 0 c m、約 4 5 c m、約 5 0 c m、約 5 5 c m、約 6 0 c m、約 6 5 c m、約 7 0 c m、約 7 5 c m、約 8 0 c m、約 8 5 c m、約 9 0 c m、約 9 5 c m、約 1 0 0 c m 以上）の土壌に適用するように使用者に指示することができる。指示書は、枯草菌 Q S T 7 1 3 又はその変異体を約 1 0 日 ~ 約 1 8 日の間隔で、及び/又は適用ごとに土壌 1 グラムにつき約 7×10^5 c f u ~ 約 1×10^7 c f u の割合で複数回適用するように使用者に指示することもできる。指示書はさらに、枯草菌 Q S T 7 1 3 又はその変異体を植物の植え付け時に化学的殺線虫剤と組み合わせで使用し、その後の適用では枯草菌 Q S T 7 1 3 又はその変異体を単独で使用するように使用者に指示することができる。一実施形態では、指示書は、枯草菌 Q S T 7 1 3 又はその変異体を、1 回適用として土壌 1 グラムにつき約 7×10^5 c f u ~ 約 1×10^7 c f u の割合で適用するように使用者に指示する。別の実施形態では、指示書は、枯草菌 Q S T 7 1 3 又はその変異体を、複数回適用として土壌 1 グラムにつき約 1×10^5 c f u ~ 約 3×10^6 c f u の割合で適用するように指示する。

30

40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 4 】

【図 1】 [0014] ネコブセンチュウが侵襲した根こぶ形成に及ぼす Q S T 7 1 3 全培養液処

50

理の効果を示す。本図及び他の図でQ S T 7 1 3全培養液をA Q 7 1 3と呼ぶことに留意されたい。本図では未処理の対照を「U T C」と呼ぶ。

【図2】[0015]様々な割合のS E R E N A D E（登録商標）A S Oでの処理がネコブセンチュウに侵襲された実生に及ぼす効果を示す。特に、結果は、根こぶ形成及び侵入の程度、及び線虫の発育に対する効果を示す。各処理（5.0%、2.5%及び1.0%のS E R E N A D E A S O及びU T C）に対応する棒3本の各セットで、最初の棒はこぶ形成を、2番目の棒は線虫の侵入を、3番目は線虫の発育を表す。

【図3】[0016]未処理の植物（本図ではU T Cと呼ぶ）と比較してA Q 7 1 3全培養液の様々なパッチで処理した植物1本当たりのネコブセンチュウの卵を表す。

【図4】[0017]単独で、又はI N L I N E製品（1, 3-ジクロロプロペン+クロロピクリンの活性成分）と組み合わせてS E R E N A D E S O I L（登録商標）製品で処理した植物1本当たりのネコブセンチュウの卵を、未処理の植物（U T Cと呼ぶ）及びI N L I N E製品のみで処理した植物と比較して表す。表2で述べた様々な処理を、本図ではT 1、T 2、T 3及びT 4と呼ぶ。

【図5】[0018]A Q 7 1 3全培養液で処理し、1日、6日、9日及び14日間隔（T 1、T 6、T 9及びT 14）で線虫幼体で攻撃した植物根の1本ごとのネコブセンチュウの侵入（図5A）、及び植物根の1本ごとのネコブセンチュウの発育（図5B）を示す。図5Aでは、点線は未処理対照（「U T C」）を表し、実線はA Q 7 1 3での処理を表す。

【図6】[0019]0日目（T 0）に植物をA Q 7 1 3全培養液で灌漑し、1週間、2週間又は3週間（T 7、T 14又はT 21）に線虫で攻撃した後、植物根1本ごとにネコブセンチュウが産生した卵の合計を表す。未処理対照（U T C）が、各接種日に設けた棒の各対の最初の棒である。各対の2番目の棒はA Q 7 1 3で処理した結果を表す。

【図7】[0020]S E R E N A D E（登録商標）A S O製品の1回又は複数回適用で処理した植物のこぶ等級（図7A）、根1本当たりの卵の合計（図7B）及び新鮮な苗条の重量（図7C）を表す。

【図8】[0021]様々な用量のS E R E N A D E（登録商標）A S Oの1回適用で処理した植物の根1グラム当たりの卵の合計を表す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

[0022] すべての出版物、特許及び特許出願は、本明細書の任意の図面及び補足を含め、個々の出版物又は特許出願が参照により特異的にかつ個々に組み込まれるものと示されている場合と同程度に参照により組み込むものとする。

【0016】

[0023] 以下の説明は、本発明の理解に有用となり得る情報を含む。本明細書で提供される情報のいずれも、先行技術でも現在請求されている発明に関するものでもなく、特異的に又は明示的に参照される出版物のいずれも先行技術ではないことが認められる。

【0017】

[0024] S E R E N A D E（登録商標）製品（E P A登録番号69592-12）は、枯草菌の独特の特許取得株（株Q S T 7 1 3）、及び相乗的に作用して病原体を破壊し、優れた抗菌力を提供する多くの異なるリポペプチドを含有する。S E R E N A D E（登録商標）製品は、野菜、果物、堅果及び蔓作物などの植物を、火傷病、ボトリチス、酸腐れ、サビ病、菌核菌、ウドンコ病、細菌性斑点症及び白カビなどの病害から保護するために使用される。S E R E N A D E（登録商標）製品は、液体又は乾燥製剤として入手可能であり、茎葉及び/又は土壌処理として適用することができる。S E R E N A D E（登録商標）A S O、S E R E N A D E（登録商標）M A X、及びS E R E N A D E S O I L（登録商標）などのS E R E N A D E（登録商標）製品のE P Aマスタラベルのコピーは、全米農薬情報検索システム（N P I R S（登録商標））のU S E P A / O P P農薬製品ラベルシステム（P P L S）により公的に入手可能である。

【0018】

[0025] S E R E N A D E（登録商標）A S O（水性懸濁液・有機物質）は、活性成分と

10

20

30

40

50

しての乾燥 Q S T 7 1 3 を 1 . 3 4 %、他の成分を 9 8 . 6 6 % 含有する。S E R E N A D E (登録商標) A S O は、最低 1×10^9 c f u / g の Q S T 1 3 を含有するように配合され、Q S T 7 1 3 の最大量は $3 . 3 \times 10^{10}$ c f u / g になるように決定されている。S E R E N A D E (登録商標) A S O の代替商品名には S E R E N A D E B I O F U N G I C I D E (登録商標)、S E R E N A D E S O I L (登録商標) 及び S E R E N A D E (登録商標) G A R D E N D I S E A S E がある。さらなる情報については、2 0 1 0 年 1 月 4 日付けの S E R E N A D E (登録商標) の米国 E P A マスタラベル及び S E R E N A D E S O I L (登録商標) を参照されたい。これらはそれぞれ、参照により全体を本明細書に組み込むものとする。

【 0 0 1 9 】

[0026] S E R E N A D E (登録商標) M A X は、活性成分としての Q S T 7 1 3 を 1 4 . 6 %、他の成分を 8 5 . 4 % 含有する。S E R E N A D E (登録商標) M A X は、最低 $7 . 3 \times 10^9$ c f u / g の Q S T 7 1 3 を含有するように配合され、Q S T 7 1 3 の最大量は $7 . 9 \times 10^{10}$ c f u / g になるように決定されている。さらなる情報については、S E R E N A D E (登録商標) M A X の米国 E P A マスタラベルを参照されたい。これは参照により全体を本明細書に組み込むものとする。

【 0 0 2 0 】

[0027] 枯草菌 Q S T 7 1 3、その変異体、その上澄み、及びそのリポペプチド代謝産物、及び植物の病原体及び昆虫を防除するためのこれらの使用方法が、米国特許第 6 , 0 6 0 , 0 5 1 号、第 6 , 1 0 3 , 2 2 8 号、第 6 , 2 9 1 , 4 2 6 号、第 6 , 4 1 7 , 1 6 3 号、及び第 6 , 6 3 8 , 9 1 0 号に詳細に記述され、これらはそれぞれ参照によりその教示全体を特異的に及び完全に本明細書に組み込むものとする。これらの米国特許では菌株を A Q 7 1 3 とし、これは Q S T 7 1 3 と同義語である。枯草菌 Q S T 7 1 3 は、特許手続上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約の規定により、1 9 9 7 年 5 月 7 日に受け入れ番号 B 2 1 6 6 1 で N R R L に寄託されている。本明細書で Q S T 7 1 3 に言及する場合、それはすべて N R R L に受け入れ番号 B 2 1 6 6 1 で寄託されているか、又は S E R E N A D E (登録商標) 製品の生産をシミュレートした状態でバイオリアクタ又は振盪フラスコ中で調製した S E R E N A D E (登録商標) 製品中に存在している状態の枯草菌 Q S T 7 1 3 (A Q 7 1 3 と呼ぶ) を指す。

【 0 0 2 1 】

[0028] 以上で言及した特許は、線虫カエノラブディティス・エレガンスの N 2 種に対して枯草菌 Q S T 7 1 3 全培養液の上澄みを試験したと述べている。このような試験は、上澄みには殺線虫剤の活性がないことを示した。

【 0 0 2 2 】

[0029] 上記特許に対応する米国特許出願第 0 9 / 0 7 4 , 8 7 0 号を 1 9 9 8 年に出願した時点で、Q S T 7 1 3 株は、古典的な生理学的、生化学的及び形態学的方法に基づいて枯草菌と呼ばれた。それ以来、バチルス種の分類法が、特に遺伝学及び配列決定テクノロジーの進歩の見地から発展し、したがって種の命名法は、1 9 9 8 年に使用されていた方法ではなく主に D N A 配列に基づいている。バチルス・アミロリクエファシエンス F Z B 4 2、枯草菌 1 6 8 及び Q S T 7 1 3 からのタンパク質配列を整合させると、バチルス・アミロリクエファシエンス F Z B 4 2 に見られるタンパク質のおよそ 9 5 % が Q S T 7 1 3 のタンパク質と 8 5 % 以上が同一である一方、枯草菌 1 6 8 中のタンパク質は 3 5 % しか Q S T 7 1 3 のタンパク質と 8 5 % 以上同一ではなかった。しかし、遺伝学に対する信頼性が向上しても、関係する科学文献及び法規文書にはなお分類上の曖昧性があり、この 1 5 年間のバチルスの分類法に関する理解が進化中であることを反映している。例えば、F Z B 4 2 と同様に Q S T 7 1 3 と密接に関連する枯草菌株 F Z B 2 4 に基づく農薬製品は、環境保護局の文書では枯草菌変種アミロリクエファシエンスと分類される。このような命名法の複雑さにより、この特定のバチルス種は文書によって枯草菌、バチルス・アミロリクエファシエンス、及び枯草菌変種アミロリクエファシエンスと様々に呼ばれる。したがって、専ら配列の比較及び推論される分類法に基づき現在予測されるように、バチル

10

20

30

40

50

ス・アミロリクエファシエンスに変更するのではなく Q S T 7 1 3 という枯草菌の命名を使用し続けてきた。

【 0 0 2 3 】

[0030] 「変異体」という用語は、Q S T 7 1 3 に由来する遺伝的変種を指す。一実施形態では、変異体は少なくとも親 Q S T 7 1 3 株と同様に線虫を防除する。特定の場合、変異体は Q S T 7 1 3 株の同定する特徴をすべて有する。別の実施形態では、変異体は Q S T 7 1 3 株に対して約 8 5 % より大きい、約 9 0 % より大きい、約 9 5 % より大きい、約 9 5 % より大きい、約 9 8 % より大きい、又は約 9 9 % より大きい配列同一性を有する遺伝子配列を有する遺伝的変種である。変異体は、Q S T 7 1 3 細胞を化学物質又は照射で処理する、又は Q S T 7 1 3 細胞の集団（ファージ抵抗性変異体など）から自然突然変異体を選択するか、又は当業者に周知の他の手段によって取得することができる。

10

【 0 0 2 4 】

[0031] 本発明の組成物は、米国特許第 6 , 0 6 0 , 0 5 1 号に記載された培地及び他の方法を使用するなど、当技術分野で周知の方法により枯草菌 Q S T 7 1 3 又はその変異体を培養することにより獲得することができる。従来の大規模微生物培養プロセスには、液中発酵、固相発酵、又は液面培養がある。発酵の最後に向かって、養分が枯渇するにつれ、枯草菌細胞が増殖相から孢子形成相への移行を開始し、従って発酵の最終生成物は大部分が孢子、代謝産物及び残留発酵培地である。孢子形成は枯草菌の自然な生活サイクルの一部であり、通常は細胞が養分の制限に回答して開始する。発酵は、枯草菌の高レベルのコロニー形成単位を獲得し、孢子形成を促進するように構成される。発酵の結果である培地中の細菌細胞、孢子及び代謝産物は、直接使用するか、遠心分離、タンジェント流フィルトレーション、デプスフィルトレーションなどの従来産業方法で濃縮することができる。発酵培養液及び培養液濃縮物の両方を、本明細書では「発酵生成物」と呼ぶ。本発明の組成物には発酵生成物が含まれる。幾つかの実施形態では、濃縮発酵培養液を、例えばダイアフィルトレーションプロセスにより洗浄し、残留発酵培養液及び代謝産物を除去する。

20

【 0 0 2 5 】

[0032] 発酵培養液又は培養液濃縮物は、担体を追加した状態又は追加しない状態で、噴霧乾燥、凍結乾燥、箱形乾燥、流動層乾燥、ドラム乾燥、又は蒸発などの従来乾燥プロセス又は方法を使用し、乾燥することができる。

30

【 0 0 2 6 】

[0033] その結果の乾燥生成物は、微粉碎又は顆粒化などによってさらに処理し、特定の粒子サイズ又は物理的フォーマットを達成することができる。以下に記載する担体も乾燥後に追加することができる。

【 0 0 2 7 】

[0034] 本発明のバチルスの新規の変種及び菌株の発酵培養液の無細胞標本は、発酵培養液の抽出、遠心分離及び/又はフィルトレーションなどの当技術分野で知られている任意の手段で獲得することができる。いわゆる無細胞標本は細胞が全くないわけではなく、細胞を除去するために使用した技術（例えば遠心分離の速度）に応じてほとんど無細胞であるか、基本的に無細胞であることが当業者には認識される。その結果の無細胞標本は、乾燥し、及び/又は植物又は植物成長培地に適用する際に補助する成分を配合することができる。上記発酵培養液の濃縮法及び乾燥技術は、無細胞標本にも適用可能である。

40

【 0 0 2 8 】

[0035] 枯草菌の代謝産物は、米国特許第 6 , 0 6 0 , 0 5 1 号に記載された方法により入手することができる。本明細書で使用する「代謝産物」という用語は、半純粋及び純粋又は基本的に純粋な代謝産物を、又は枯草菌から分離されていない代謝産物を指すことがある。幾つかの実施形態では、発酵培養液の遠心分離によって無細胞標本を作成した後、代謝産物は、L H - 2 0、G 1 0、及び G 1 5 及び G 2 5 などのセファデックス樹脂のようなサイズ排除フィルトレーションによって精製することができ、これは、リポペプチドが 8 0 0 ダルトンと 1 6 0 0 ダルトンの間であるので、約 2 0 0 0 ダルトン未満、約 1 5

50

00ダルトン未満、約1000ダルトン未満などのような分子量カットオフに基づいて代謝産物を様々なフラクションに分類する。

【0029】

[0036] 上記発酵培養液の配合の濃縮法及び乾燥技術は、代謝産物にも適用可能である。

【0030】

[0037] 本発明の組成物は、効力、安定性、及び有用性を改善する、及び/又は処理、包装及び最終用途の適用を容易にするために、細胞、無細胞標本又は代謝産物を含む組成物に添加した配合不活性物質を含むことができる。このような配合不活性物質及び成分は、担体、安定剤、養分、又は物理的改質剤を含むことができ、これは個々に、又は組み合わせて添加することができる。幾つかの実施形態では、担体は水、油、及び他の有機又は無機溶剤などの液体物質、及びミネラル、ポリマー、又は生物学的又は化学的合成により誘導されたポリマー錯体などの固体物質を含むことができる。幾つかの実施形態では、担体は、種子又は根などの植物部分への組成物の付着を容易にする結合剤又は接着剤である。例えば、Taylor, A.G.他の「Concepts and Technologies of Selected Seed Treatments」(Annu. Rev. Phytopathol, 28:321,339(1990))を参照されたい。安定剤は固化防止剤、酸化防止剤、乾燥剤、保護剤又は保存剤を含むことができる。養分は炭素、窒素、及び糖、多糖、油、タンパク質、アミノ酸、脂肪酸及びリン酸塩などのリン源を含むことができる。物理的改質剤は充填剤、湿潤剤、増粘剤、pH調節剤、流動学的調節剤、分散剤、補助剤、界面活性剤、凍結防止剤又は着色剤を含むことができる。幾つかの実施形態では、細胞、無細胞標本又は発酵により生成された代謝産物を含む組成物は、希釈剤としての水がある状態、又は水がない状態で任意の他の配合標本なしで直接使用することができる。幾つかの実施形態では、配合不活性物質は、発酵培養液を濃縮した後、乾燥中及び/又は乾燥後に添加する。

【0031】

[0038] 本発明の組成物は担体を含むことができ、これは、回収率、効力又は物理的特性を改善する、及び/又は包装及び適用を補助するために、リポペプチド含有発酵生成物、リポペプチドの無細胞標本、又はリポペプチドの精製、半精製又は粗抽出物を含む組成物に添加される不活性配合成分である。このような担体は個々に、又は組み合わせて添加することができる。

【0032】

[0039] 本発明の組成物は、他の化学的及び非化学的添加剤、補助剤及び/又は処理剤と混合し、及び/又はそれと輪番で使用することができ、このような処理剤には化学的及び非化学的殺菌剤、殺虫剤、殺ダニ剤、殺線虫剤、肥料、養分、ミネラル、オーキシム、生育促進剤などが含まれるが、これらに限定されない。

【0033】

[0040] 本発明の枯草菌系組成物と混合することができる殺線虫剤は、化学的又は生物学的殺線虫剤でよい。本明細書で使用する「化学的殺線虫剤」という用語は燻蒸剤を除き、「燻蒸剤」という用語は植え付け前に土壌に適用され、土壌を通して(土壌空気及び/又は土壌水中に)拡散し、臭化メチルなどの気体、クロロピクリンなどの揮発性液体、又はダゾメットなどの揮発性固体として適用することができる広範囲の農薬化学物質を包含する。

【0034】

[0041] 幾つかの実施形態では、化学的又は生物学的殺線虫剤は市販されている配合製品であり、本発明の組成物とタンク混合され、及び/又はそれと輪番で使用される。他の実施形態では、化学的又は生物学的殺線虫剤の活性成分(不活性成分を除く)は、組成物が1つの配合製品を形成するように、(不活性物質を)配合する前に枯草菌QST713系組成物と混合する。

【0035】

[0042] このような混合又は輪番プログラムに使用する化学的殺線虫剤はカルバメート、オキシムカルバメート及び有機リン殺線虫剤である。カルバメート殺線虫剤にはベノミル

10

20

30

40

50

、カルボフラン（FURADAN（登録商標））、カルボスルファン及びクロエトカルブが含まれる。オキシムカルバメートにはアラニカルブ、アルジカルブ（TEMIK（登録商標））、又はAVICTA（登録商標）の一部としてSyngentaからのComplete Pak種子処理）、アルドキシカルブ、（STANDAK（登録商標））、オキサミル（VYDATE（登録商標））、チオジカルブ（Bayer Crop ScienceからのAERIS（登録商標）種子適用システムの一部）及びティルペートが含まれる。有機リン殺線虫剤にはフェンスルホチオン（DANSANIT（登録商標））、エトプロップ（MOCAP（登録商標））、ジアミダフォス、フェナミホス、ホスチエタン、ホスファミドン、カズサホス、クロルピリホス、ジクロフェンチオン、ジメトエート、ホスチアザート、ヘテロホス、イサミドホス、イサゾホス、ホレート、ホスホカルブ、テルブホス、チオナジン、トリアゾホス、イミシアホス、及びメカルホンが含まれる。各化合物の後に挿入された名称は、以上の化学物質各々の代表的な市販製剤である。このような混合に有用な他の化学的殺線虫剤にはスピロテトラマト（MOVENTO（登録商標））、MON37400殺線虫剤及びフィプロニルが含まれる。

10

【0036】

[0043] このような混合及び輪番プログラムに使用する生物学的殺線虫剤には、キチン質と尿の混合物、堆肥抽出物及び茶（曝気及び非曝気の両方）と、真菌ミロセシウム・ベルカリア及び/又はその代謝産物（DITERA（登録商標）として市販されている）を含む組成物と、真菌ペシロミセス・リラシヌス（例えばMELOCON（登録商標）又はBIOACTとして市販されている）を含む組成物と、P. usgaeを含む細菌パスツリア（例えばECONEM（登録商標）として販売されている）を含む組成物と、パチルス・フィルムス（1995年5月29日にフランスのパスツール研究所の国立微生物培養物コレクションにCNMC I-1582として寄託され、例えばVOTIVO（登録商標）として販売されている菌株を含む）、枯草菌、パチルス・アミロリクエファシエンス、パチルス・プミルス（1999年1月14日にB-30087としてNRRLに寄託された菌株及びその変異体を含む）、及びパチルス・セレウスを含むパチルス種からの細菌を含む組成物と、ストレプトミセス・リディカス（ACTINOVATE（登録商標）として販売されている）などの殺線虫剤ストレプトミセス種を含む組成物とが含まれる。生物学的殺線虫剤には、ニーム植物（該植物からの種子又は油を含む）又はニーム種子の2次代謝産物であるアジディラクチンをベースにした生成物、ゴマ油系生成物（DRAGONFIRE（登録商標）など）カルバクロール、及び植物抽出物（チリのキラヤ・サボナリア木から得たNEMA-Q（登録商標）など）をベースにした生成物のような植物系殺線虫剤も含まれる。生物学的殺線虫剤には、アバメクチン（アバメクチンB1aとB1bの組み合わせで構成される）及びアベルメクチンB2aを含むストレプトミセス・アベルメンティリスによって生成されるメクチン、及び元々はエルウィニア・アミロボラで確認され、ハルピン_{E A}及びハルピン_{E A}を含むハルピタンパク質など、細菌によって生成された分離化合物も含まれる。

20

30

【0037】

[0044] 本発明の組成物は、メロイドギネ種、ヘテロデラ種、グロボデラ種、プラティレンクス種、及びクリコネメラ種を含む、例えばネコブセンチュウ、シストセンチュウ、ネグサレセンチュウ及びワセンチュウなどの植物寄生線虫の防除に有用である。組成物は、チレンクルス・セミペネトランス、トリコドラス種、ロンギドルス種、ロチレンクルス種、キシフィネマ種、ペロノライムス種（B・ロンギカウダタスなど）、クリコネモイデス種、チレンコリンカス種、ホプロライムス種、ロチレンクス種、ヘリコチレンクス種（ヘリコチレンクス・シュードロブスタス（らせんHP）及びヘリコチレンクス・ディゴニクス（らせんHD）など）、ラドホルス種（R・シトロフィリス及びR・シミリスなど）、ジチレンクス種、パラトリコドルス種、及び他の植物寄生線虫の防除にも有用である。幾つかの実施形態では、標的はヘテロデラ・グリシネス（ダイズシストセンチュウ）、ヘテロデラ・シャクティイ（ピーツシストセンチュウ）、ヘテロデラ・アベナエ（シリアルシストセンチュウ）、メロイジギネ・インコグニタ（ワタ（又は南）ネコブセンチュウ）、

40

50

グロボデラ・ロストチエンシス及びグロボデラパリダ（ジャガイモシストセンチュウ）などのシストセンチュウである。他の実施形態では、標的はM・インコグニタ（ワタネコブセンチュウ）、M・ジャパニカ（ジャワネコブセンチュウ）、M・ハブラ（北ネコブセンチュウ）、及びM・アレナリア（ラッカセイネコブセンチュウ）などのネコブセンチュウである。

【0038】

[0045] 本明細書で使用する「防除」という用語は、死滅させる、数を減少させる、及び/又は成長、栄養補給又は正常な生理学的発育、例えばネコブセンチュウの場合は根に侵入して根中で発育する能力を低下させることを意味する。有効量は、線虫の増殖、栄養補給、根への侵入、根中での成熟、及び/又は正常な線虫の全体的生理学的発育、及び/又はこぶ又は根及び/又は植物の生育低下などの線虫感染に由来する植物宿主の徴候を顕著に低下させることが可能な量である。幾つかの実施形態では、徴候及び/又は線虫は少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、又は少なくとも約90%低下する。

10

【0039】

[0046] 本発明の組成物は、種子、農産物、及び造園のために成長させるものなど、多種多様な農業及び/又は園芸作物の処理に使用される。本発明の組成物を使用して処理することができる代表的な植物には球根野菜、穀物、柑橘類（グレープフルーツ、レモン、及びオレンジなど）、ワタ及び他の繊維作物、ウリ科、結実野菜、葉物野菜（セロリ、タマチシャ及びチリメンチシャ、及びほうれん草など）、豆果、脂肪種子作物、落花生、仁果（リンゴ及びナシなど）、堅果（アーモンド、ペカン、及びクルミなど）、根菜、塊茎野菜、球茎野菜、タバコ、莓及び他のベリー類、アブラナ属（ブロッコリ及びキャベツなど）、ブドウ、パイナップル、及び顕花植物、花壇用花卉、及び観賞植物（シダ及びギボウシなど）が含まれるが、これらに限定されない。本発明の組成物はバナナ及びコーヒーなどのプランテーション作物など、及び森林、公園又は造園地に存在するような多年生植物の処理にも使用される。

20

【0040】

[0047] 本明細書に記載する組成物は、植物寄生線虫を防除するために、植物、種子、根、根茎、球茎、球根、又は塊茎などの植物部分、及び/又は土壌などの植物又は植物部分が成長する場所に適用される。本発明の組成物は、葉面散布として、種子/根/塊茎/根茎/球根/球茎処理として、及び/又は土壌処理として適用することができる。種子/根/塊茎/根茎/球根/球茎は、植え付け前、植え付け中、又は植え付け後に処理することができる。

30

【0041】

[0048] 本明細書に記載する組成物は、線虫を防除し、それにより作物収量を増加させるために、植物、種子、根茎、球茎又は塊茎などの植物部分、及び/又は土壌などの植物又は植物部分が生育する場所にも適用される。幾つかの実施形態では、作物収量は少なくとも約5%、他の実施形態では少なくとも約10%、さらに他の実施形態では少なくとも約15%、さらに他の実施形態では少なくとも約20%増加する。

40

【0042】

[0049] 種子処理として使用される場合、本発明の組成物は、種子のサイズに応じて種子1個当たり約 1×10^2 ~ 約 1×10^9 cfuの割合で適用される。幾つかの実施形態では、適用の割合は種子1個当たり約 1×10^3 ~ 約 1×10^8 cfu、又は種子1個当たり約 1×10^4 ~ 約 1×10^7 cfuである。

【0043】

[0050] 本発明の組成物は、植物の根系ごとに約 1×10^3 ~ 約 1×10^8 cfuの割合で根浸液として適用することもできる。

【0044】

[0051] 土壌処理として使用する場合、本発明の組成物は、土壌表面灌注、シャンクイン

50

、注入及び/又は畝間適用として、又は灌漑用水との混合によって適用することができる。灌漑土壌処理は植え付け時、種まき中又は種まき後、又は移植後及び植物が成長する任意の段階で適用することができ、その適用量は1エーカー当たり約 4×10^7 ~ 約 8×10^{14} cfu、又は1エーカー当たり約 4×10^9 ~ 約 8×10^{13} cfu、又は1エーカー当たり約 4×10^{11} ~ 約 8×10^{12} cfu、又は1エーカー当たり約 2×10^{12} ~ 約 6×10^{13} cfu、又は1エーカー当たり約 2×10^{12} ~ 約 3×10^{13} cfuである。幾つかの実施形態では、適用量は1エーカー当たり約 1×10^{12} ~ 約 6×10^{12} cfu、又は1エーカー当たり約 1×10^{13} ~ 約 6×10^{13} cfuである。植え付け時に適用される畝間処理の適用量は、1列1000フィート(304.8m)当たり約 2.5×10^{10} ~ 約 5×10^{11} cfuである。幾つかの実施形態では、適用量は1列1000フィート(304.8m)当たり約 6×10^{10} ~ 約 3×10^{12} cfu、又は1列1000フィート(304.8m)当たり約 6×10^{10} ~ 約 4×10^{11} cfu、又は1列1000フィート(304.8m)当たり約 6×10^{11} ~ 約 3×10^{12} cfu、又は1列1000フィート(304.8m)当たり約 6×10^{11} ~ 約 4×10^{12} cfuである。全面処理及び他のそれほど一般的ではない土壌処理に対する割合の調節方法は、当業者には理解される。

【0045】

[0052] 本発明の組成物は、植え付け前又は種子の発芽前に土壌に導入することができる。本発明の組成物は、植物の根に接触している土壌、植物の基部にある土壌、又は植物基部の周囲の(例えば植物基部の周囲又は下に約5cm、約10cm、約15cm、約20cm、約25cm、約30cm、約35cm、約40cm、約45cm、約50cm、約55cm、約60cm、約65cm、約70cm、約75cm、約80cm、約85cm、約90cm、約95cm、約100cm、又はそれ以上の距離以内の)土壌に導入することもできる。組成物は、点滴灌漑、スプリンクラー、土壌注入又は土壌灌漑を含むが、これらに限定されない様々な技術を使用して適用することができる。組成物は、異なる植物の所在地に移植する前に、プラグトレイ内の土壌及び/又は植物に、又は実生にも適用することができる。土壌灌漑処理を含め、植物の根に接触している土壌、植物基部、又は植物基部の周囲で特定の距離以内の土壌に適用する場合、組成物は1回適用として、又は複数回適用として適用することができる。組成物は、灌漑処理については上記の割合で、又は土壌1グラム当たり約 1×10^5 ~ 約 1×10^8 cfu、土壌1グラム当たり 1×10^5 ~ 約 1×10^7 cfu、土壌1グラム当たり 1×10^5 ~ 約 1×10^6 cfu、土壌1グラム当たり 7×10^5 ~ 約 1×10^7 cfu、土壌1グラム当たり 1×10^6 ~ 約 5×10^6 cfu、又は土壌1グラム当たり 1×10^5 ~ 約 3×10^6 cfuの割合で適用することができる。一実施形態では、本発明の組成物を1回適用として土壌1グラム当たり約 7×10^5 ~ 約 1×10^7 cfuの割合で適用する。別の実施形態では、本発明の組成物を1回適用として土壌1グラム当たり約 1×10^6 ~ 約 5×10^6 cfuの割合で適用する。他の実施形態では、本発明の組成物を複数回適用として土壌1グラム当たり約 1×10^5 ~ 約 3×10^6 cfuの割合で適用する。

【0046】

[0053] 本発明の組成物を複数回適用として適用する場合、これらの適用は約1日間~約28日間、約1日間~約21日間、約1日間~約14日間、約7日間~約28日間、約7日間~約21日間、約7日間~約14日間、又は約10日間~約18日間の間隔で実行することができる。

【0047】

[0054] 本発明の枯草菌系組成物は、独立して、又は化学的及び生物学的殺線虫剤など、1つ又は複数の他の殺線虫剤と組み合わせて適用することができる。幾つかの実施形態では、枯草菌QST713は少なくとも1つの他の殺線虫剤と同時配合し、同時配合した生成物を植物又は植物の所在地に適用する。幾つかの他の実施形態では、枯草菌系組成物を市販されている化学的又は生物学的殺線虫剤の製剤とタンク混合し、植物及び植物の所在地に適用する。他の実施形態では、市販されている化学的又は生物学的殺線虫剤の製剤の

直前又は直後に、本発明の枯草菌系組成物を植物及び/又は植物の所在地に適用する。他の実施形態では、市販されている化学的又は生物学的殺線虫剤の製剤と輪番で、本発明の枯草菌系組成物を植物及び/又は植物の所在地に適用する。殺線虫剤を何回か適用する輪番プログラムでは、本発明の組成物を単独で、又は他の殺線虫剤と組み合わせて適用することができる。1つの場合、枯草菌系組成物を種子処理として、或いは畝間又は灌注処理として、以下でさらに詳細に検討するように適用する。

【0048】

[0055] 出願人はいかなる特定の理論にも束縛されることを望まないが、枯草菌 Q S T 7 1 3 は処理した植物の誘導全身抵抗性 (I S R) によって線虫を防除すると考えられる。 I S R の説明については、Bakker, P.A.H.M. の「Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp.」(*Phytopathology* 97(2): 239-243(2007)) を参照されたい。 I S R は、枯草菌 Q S T 7 1 3 で処理した時間からその後に線虫が植物を攻撃するまでの間の特定の誘導期の後にのみ効力を生じることができる。幾つかの実施形態では、植え付け時に枯草菌系組成物を第2の殺線虫剤と組み合わせて適用し、その後の適用時に枯草菌系組成物を単独で、又は別の殺線虫剤と組み合わせて適用する。第2の殺線虫剤を用いた初期処理が、枯草菌系組成物が I S R をトリガするまでの誘導期中に植物を保護することができる。上記実施形態の幾つかの場合、市販されている第2の化学的又は生物学的殺線虫剤の製剤を、単独の殺線虫剤処理として使用するためのラベルの推奨値より低い割合で適用する。一実施形態では、植え付け時に枯草菌 Q S T 7 1 3 をオキサミル (V Y D A T E (登録商標)) とともに適用し、その後の適用では枯草菌 Q S T 7 1 3 を単独で適用する。

10

20

【0049】

[0056] 他の実施形態では、燻蒸剤を適用した後、本発明のバチルス系組成物を植物及び/又は植物の所在地に適用する。燻蒸剤はシャंक注入によって、通常は地下最低8インチ (20 . 32 c m) で適用することができる。燻蒸剤の液体製剤は、表面ドリップ化学溶液灌水法で適用し、燻蒸剤を地下8インチ (20 . 32 c m) 以上の深さで適用することもできる。処理された土層は、燻蒸剤を土壤中に数日間保持するためにビニール防水シートで覆う。これは植え付け前に実行され、植え付ける前に空気を逃がしておく。本明細書に記載するバチルス系組成物は、このように空気を逃がした期間の後、植え付け前、植え付け時又は植え付け後に適用される。幾つかの場合、燻蒸剤は製品ラベル上で推奨される割合より低い割合で適用される。

30

【0050】

[0057] 化学的及び生物学的殺線虫剤について以上で説明した。燻蒸型殺線虫剤には、クロロピクリン (C H L O R - O - P I C) などのハロゲン化炭化水素；臭化メチル (M E T H - O - G A S) 及びその組み合わせ (B R O M - O - G A S 及び T E R R - O - G A S など) ； 1 , 3 - ジクロロプロペン (T E L O N E I I , T E L O N E E C , C U R F E W) 及び 1 , 3 - ジクロロプロペンとクロロピクリンとの組み合わせ (T E L O N E E C - 17 , T E L O N E C - 35 , 及び I N L I N E) ；ヨウ化メチル (M I D A S) ；ナトリウムメチルジチオカルバメート (V A P A M , S O I L P R E P , M E T A M - S O D I U M) などのメチルイソシアネート遊離促進物質； 1 , 3 - ジクロロプロペンとメチルイソチオシアネートの組み合わせ (V O R L E X) ；及びテトラチオ炭酸ナトリウム (E N Z O N E) などの二硫化炭素遊離促進物質；及び二硫化ジメチル又は D M D S (P A L A D I N O) が含まれる。以上の燻蒸剤それぞれの市販製剤の例は、化学名の後のカッコ内で提供されている。

40

【0051】

[0058] 本発明の組成物は、総合的害虫駆除 (「 I P M 」) プログラムの一部として適用することもできる。このようなプログラムは様々な出版物、特に大学の連携公開講座で説明されている。線虫については、このようなプログラムは、標的線虫の宿主となり得ない作物との輪作、栽培及び耕作の実践、及び移植の使用を含む。例えば、バチルス系組成物は、生育期の後にカラシ又は他の線虫抑制作物と一緒に適用することができる。

50

【 0 0 5 2 】

[0059] 幾つかの実施形態では、植物、植物の部分又は植物の所在地へと本発明の組成物を適用する前に処理を必要とする場所を確認する。このような確認は、萎黄病、発育阻害、ネクロシス、又は萎れる（すなわち、栄養が欠乏しているように見える）ような植物を目で見た確認を、通常は線虫問題の履歴に関する知識、植物のサンプリング及び/又は土壌のサンプリングと組み合わせて実行することができる。植物サンプリングは、生育期中に、又は最終収穫の直後に実行することができる。植物を土壌から取り出し、その根を検査して、用地内の線虫問題の性質及び程度を決定する。ネコブセンチュウの場合、根こぶの重症度は、こぶがある根系の割合を測定することによって決定する。ネコブセンチュウによって引き起こされたこぶは、こぶは根から容易に分離されないため、窒素を固定する土壌細菌の根こぶから区別することができる。ネコブセンチュウの土壌生物個体群レベルは根こぶの重症度とともに上昇する。幾つかの場合、いかなるレベルの根こぶでも検出された場合、それは感染しやすい作物の植え付けに、特にサンプリング区域又はその付近でネコブセンチュウの問題があることを示唆する。シストセンチュウは、植物のサンプリング及びシストを探す根の精査によっても確認することができる。

10

【 0 0 5 3 】

[0060] 土壌のサンプリングは、土壌又は根の特定の体積に寄生する線虫及び/又は線虫の卵の数を決定する手段を提供する。土壌サンプリングは、問題が最初に疑われた時、最終収穫時、又は新しい作物を植え付ける前の任意の時、例えば以前の作物の廃棄前に実施することができる。大学の連携公開講座プログラムは、フロリダ大学、オレゴン州立大学及びネブラスカ-リンカーン大学などの土壌サンプリングサービスを提供する。また、このようなプログラムはサンプリングの採集方法のガイドラインを提供する。例えば、収穫後の予測サンプリングの1つの方法で、サンプルは（作物の価値に応じて、作物の価値が高いほどサンプリングするエーカー数を少なくして）5又は10エーカーにわたる10～20の用地から深さ6～10インチ（15.24～25.4cm）の深さの土壌で規則的なジグザグのパターンにして採集する。定着した植物を試験する方法では、症状があるが枯れたり枯れそうになったりしていない、すなわち、分解していない疑わしい植物から、6～10インチ（15.24～25.4cm）の深さの土壌で根及び土壌のサンプルを取り出す。

20

【 0 0 5 4 】

[0061] 幾つかの実施形態では、確認は、線虫侵襲の経済的閾値、すなわち、処理しない場合に予想される経済的損失が処理の費用を超える点に到達しているか否かを決定することを含む。経済的閾値は、作物、地勢、気候、植え付けの時、土壌のタイプ、及び/又は土壌温度に応じて変化する。この主題に関しては多数の論文が発表されており、様々な地域の大学の連携公開講座プログラムからガイドラインが入手可能である。例えばRobb, J. G.他の「Factors Affecting the Economic Threshold for *Heterodera schachtii* Control in Sugar Beet」(Economics of Nematode Control January-June 1992)、Hafez, Saad L.の「Management of Sugar Beet Nematode」(University of Idaho Current Information Series (CIS) 1071 (1998))、及び「UCIPM Pest Management Guidelines: Tomato」(UC ANR Publication 3470 Nematodes A. Ploeg, Nematology, UC Riverside (January 2008))を参照されたい。特定の季節に特定の作物の経済的閾値を決定することについては、十分に当業者の技能の範囲に入る。

30

40

【 0 0 5 5 】

[0062] 幾つかの実施形態では、土壌サンプリングは、線虫侵襲により収量が侵襲していない土壌の標準値の約80%、約90%、又は約95%になることを明らかにする。

【 0 0 5 6 】

[0063] 幾つかの実施形態では、土壌サンプル1キログラム当たりの根こぶ幼体（root knot juveniles）の経済的閾値は、少なくとも約250、少なくとも約300、少なくとも約500、少なくとも約750、少なくとも約1000、少なくとも約2000、少なくとも約3000、少なくとも約4000、少なくとも約5000、又は少なくとも約6

50

000である。

【0057】

[0064] 幾つかの実施形態では、土壌1cm³当たりのシストセンチュウの卵及び幼生の経済的閾値は少なくとも約0.5、少なくとも約1、少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約4である。上記のHafez(1998)によると、1個のシストは500個の生存卵及び幼生と概算することができる。

【0058】

[0065] 以下の実施例は純粋に例証のためにあり、本発明を限定する目的はない。

【0059】

実施例

10

実施例1

メロイドギネ・ジャバニカ(Meloidogyne javanica)に対する枯草菌QST713の活性
[0066] キュウリの種子変種サルタン(Sultan)で調査を実施し、ネコブセンチュウであるメロイドギネ・ジャバニカに対するQST713の活性を判定した。20gの砂及び出芽していない種子1個を入れた50mLの遠心管を、様々な割合のQST713の全培養液又は市販されているSERENADE(登録商標)ASO製品で処理した。全培養液とSERENADE(登録商標)ASO製品とは、製品の方がコロニー形成単位(cfu)及び代謝産物に関して濃度はるかに高く、製品が全培養液より少なくとも1log大きいcfuを有する点で異なる。また、製品は特に保存剤が配合されており、したがって製品は全培養液より酸性が高い。QST713の全培養液培養物を得るために、ルリア培養液(Luria Broth; LB)を入れた種子フラスコにQST713を接種し、30で一晚増殖させた。翌日、各種子フラスコのアリコート、1Lの振盪フラスコに入れた200mLのダイズ系培地に接種し、孢子形成まで増殖させた。簡潔に言うと、振盪フラスコ培養物を30~32の間の温度に維持し、振盪装置を200~220rpmに設定した。細胞の増殖及び代謝産物の産生が停止したインキュベート後およそ3日で、培養液を採取した。処理した種子は、温室内で発芽し、生育できるようにした。処理後4~5日(DAT)で、第二段階幼体ネコブセンチュウ100個を接種した。10DATで、実生に0~4のスケールで根こぶ形成率の得点をつけ、それを表1に示す。

20

【0060】

[0067] 次に、線虫の侵入及び発育を観察するために根を酸フクシンで染色し、ライカ解剖顕微鏡で観察した。線虫の侵入に関しては、各根中の線虫幼体総数をカウントした。線虫の発育については、後期第二段階幼体(J2)及び第三段階幼体(J3)を含む肥満幼体総数をカウントした。根への線虫の侵入及び侵入後の線虫の発育は、表1で詳述するように得点をつけた。使用した技術の詳細については、C.O. Omwega他の「A Nondestructive Technique for Screening Bean Germ Plasm for Resistance to Meloidogyne incognita」(Plant Disease (1988) 72(11):970-972)を参照されたい。

30

【0061】

[0068] 表1. 細菌全培養液の線虫拮抗作用の評定方式。こぶ形成指数は、根こぶ形成の割合に基づいている。侵入尺度は、未処理対照(UTC)中の幼若線虫の数に対する幼若線虫の平均総数として計算した。発育尺度は、根の中にいる肥満幼若線虫(後期J2段階/J3段階)の総数を反映している。

40

【表1】

こぶ形成指数		侵入尺度		発育尺度	
0	なし	0	なし	0	なし
1	1-24%	1	1-10%	1	1-3
2	25-49%	2	11-50%	2	3-10
3	50-74%	3	51-75%	3	11-30
4	>75%	4	76-100%	4	>30

【0062】

[0069] 図1は、QST713全培養液を適用すると根こぶ形成が減少することを示す。図2は、様々な割合のSERENADE(登録商標)ASOを適用すると、未処理対照と

50

比較して、こぶ形成、侵入及び発育が低下することを示す。データは上記評定システムに基づいているので、常に用量反応を観察することが可能だとは限らないことに留意されたい。

【 0 0 6 3 】

実施例 2

トマトのネコブセンチュウ卵を防除する A Q 7 1 3 の有効性

[0070] ネコブセンチュウの卵に対する Q S T 7 1 3 の有効性を試験するために、トマト種子で別の実験を実施した。A Q 7 1 3 - バッチ 1 は、実施例 1 で述べたように調製した全培養液培養物であった。A Q 7 1 3 - バッチ 2 及び A Q 7 1 3 - バッチ 3 をバイオリアクタ内で調製した。簡潔に言うと、保存培養物のバイアルを解凍し、ディフコ栄養培養液 (Difco Nutrient Broth) の滅菌フラスコに移した。次に、フラスコ培養物を 2 8 ~ 3 2 の間の温度、2 0 0 ~ 2 2 0 r p m の回転速度の回転振盪装置でインキュベートし、細胞の増殖を促進して、高密度細胞を獲得し、次に 1 2 L のサイズ系増殖培地を 2 0 L のバイオリアクタに加えた。バイオリアクタは、3 0 ~ 3 2 の間の温度設定、5 0 0 ~ 1 0 0 0 r p m の攪拌設定、6 ~ 8 の間に緩衝した pH、及び 0 . 5 ~ 1 . 0 V V M の曝気に設定した。細胞の増殖及び代謝産物の産生が停止したインキュベート後およそ 3 日で、培養物培養液を採取した。3 週間のトマトの苗を灌注によって Q S T 7 1 3 で処理した。次に、植木鉢を温室内で 1 0 日間保管してから、植木鉢 1 個当たり 5 0 0 0 個のネコブセンチュウ (「 R K N 」) の卵を接種した。線虫接種から 4 2 日後に苗を採取した。Huss ey RS、Barker KR の 「 A Comparison of Methods of Collecting Inocula of Meloidogyne spp., Including a New Technique 」 (Plant Disease Reporter, 1973; 57:1025-1028) で詳述されているように、1 % の N a O C l 溶液を使用してトマトの苗の根から卵を採集した。A Q 7 1 3 は、苗 1 本あたりに観察されたネコブセンチュウ卵の数を減少させた。データは、採点システムではなく卵を直接カウントした結果を表す。未処理サンプル (U T C) と比較した結果を図 3 に示す。

10

20

【 0 0 6 4 】

実施例 3

様々な線虫に対する S E R E N A D E S O I L (登録商標) 製品の有効性

[0071] 「埋土バッグ」調査を実施して、イチゴ畑で様々なタイプの線虫に対する S E R E N A D E S O I L (登録商標) 製品の有効性を判定した。埋土バッグは、土壌処理、特に燻蒸剤の有効性を評価するために一般的に使用されている。既知の濃度の線虫を入れた土壌サンプルをナイロンの網バッグに入れ、イチゴ苗床の約 6 ~ 8 インチ (1 5 . 2 4 ~ 2 0 . 3 2 c m) の深さに埋土した。様々な処理を表 2 に示すように適用した。I N L I N E 製品を S E R E N A D E S O I L (登録商標) 製品と組み合わせて、陽性対照として使用した。

30

【表 2】

表 2

処理番号	処理名	割合	施用コード	施用日
1	未処理チェック	-		-
2	SERENADE SOIL (登録商標)	4 クォート/エーカー	BCD	11/24/11, 01/27/11, 04/1/11
3	INLINE、後に SERENADE SOIL (登録商標)	20 ガロン/エーカー 4 クォート/エーカー	A BCD	11/3/10 11/24/10, 01/27/11, 04/1/11
4	INLINE	20 ガロン/エーカー	A	11/3/10

40

【 0 0 6 5 】

[0072] 処理 B の後、2 0 1 0 年 1 2 月 8 日にバッグを採集し、線虫 (成虫及び幼虫) をカウントした。結果を以下に示す。

【表 3】

評価した線虫	未処理 対照	4 クォートでの SERENADE SOIL (登録商 標)	20 ガロンで の INLINE	20 ガロンでの INLINE +4 クォートでの SERENADE SOIL (登録商標)
ネコブセンチュウ (<i>Meloidogyne</i>)	578a	69b	18b	20b
ワセンチュウ (<i>Criconemella</i>)	1,322a	36b	10b	10b
ピンセンチュウ (<i>Paratylenchus</i>)	15a	2a	11a	6a

10

【0066】

[0073] 同じ文字が後に付く平均値は、 $P = 0.05$ で有意に差がない (スチューデント・ニューマン・キュール)。

【0067】

[0074] 以上で示した最後の適用の数週間後、幾つかの苗をプロットから取り出し、実施例 2 で述べたように根のネコブセンチュウを分析した。図 4 は、処理が根 1 本当たりのネコブセンチュウの卵を減少させたことを示す。

【0068】

[0075] その後の実験で、SERENADE SOIL (登録商標) 製品が、未処理対照と比較した場合に、ジャガイモの苗でパラトリコドルス種及びパラティレンクス種の防除に効果的であることが示された。SERENADE SOIL (登録商標) 製品は、未処理対照と比較した場合に、イチゴの苗でヘリコチレンクス・シュードロプスタス (らせん HP)、ヘリコティレンクス・ジゴニクス (らせん HD) 及びクリコネメラ種に対する活性、トマトの苗でクリコネモイデス種に対する活性、ジャガイモでパラティレンクス種に対する活性も示した。

20

【0069】

実施例 4

枯草菌 QST713 での処理の誘導期及びメロイドギネ・ジャバニカに対する有効性

30

[0076] キュウリの苗を使用した以下の実験に、実施例 1 で上述した実験技術を使用した。簡潔に言うと、AQ713 の培養液培養物を調製し、それを使用して 0 日目 (T0) にキュウリ種子 (種子 1 g 当たり 10^5 cfu) を処理した。キュウリの苗は、1 日、6 日、9 日、及び 14 日の間隔 (T1、T6、T9 及び T14) をあけて線虫幼体に攻撃させた。幼体線虫の接種後日数 (Days post-inoculation; DPI) 14 日にて、各時点を採取した。根に侵入したメロイドギネ・ジャバニカのネコブセンチュウ (RKN) の数 (図 5 A 参照)、さらに発育した幼体の数 (図 5 B 参照) を数量化した。各データ点は、キュウリ苗 6 本の線虫の平均数を表す。キュウリ苗で AQ713 の処理から線虫の攻撃までの間に 6 日間を超えるラグタイムがあったとき、未処理対照 (UTC) と比較して、AQ713 は RKN の侵入及び発育の防除に効果的であった。

40

【0070】

[0077] 処理と線虫攻撃の間に何らかの誘導期がある場合に AQ713 が良好に作用するという観察結果を確認するために、4 週間のトマト実生を 0 日目 (T0) に AQ713 全培養液 (砂 1 g 当たり 10^5 cfu) で灌注し、実施例 2 で述べたように 1 週間、2 週間、又は 3 週間 (T7、T14 又は T21) 後に植木鉢 1 個当たり 1000 個の RKN 幼体で攻撃させた。42 DPI で各時点を採取し、根 1 本当たりの卵の総数をカウントした。各データ点は、トマトの苗 5 本の卵の平均数を表す。トマトの苗の RKN の卵数を未処理対照 (UTC) より減少させる効力のために、AQ713 の処理とその後の線虫攻撃との間に必要なラグタイムは、この実験では約 14 日以上であった (図 6 参照)。

【0071】

50

実施例 5

1 回適用と比較した SERENADE (登録商標) ASO の複数回適用

[0078] 表 3 に詳述するように複数回適用で処理するために、約 8 インチ (20 . 3 2 c m) の直径を有する植木鉢に移植した時点、及びその後は 2 週間に 1 回 (すなわち、2 週間おきに)、トマトの苗に SERENADE (登録商標) ASO 製品を適用した。SERENADE (登録商標) ASO 製品は、苗の基部から約 2 ~ 3 インチ (5 . 0 8 ~ 7 . 6 2 c m) 以内で苗の基部の周囲の土壌に適用した。用量の 6 クォート / エーカーは、土壌 (すなわち、苗の基部から 2 ~ 3 インチ (5 . 0 8 ~ 7 . 6 2 c m) 以内の土壌) 1 g 当たり 1×10^5 c f u とほぼ同等である。次に、植木鉢を温室内に 10 日間おき、植木鉢ごとに 1000 個のネコブセンチュウ J 2 幼虫を接種した。苗は線虫接種の 42 日後に採取し、実施例 1 及び 2 で述べたようにこぶの等級をつけ (図 7 A 参照)、卵の総数をカウントした (図 7 B 参照)。新しい苗条も計量して、苗の生育に対する処理の効果を確認した (図 7 C 参照)。全データ点は、測定 4 回の平均値を表す。SERENADE (登録商標) ASO 製品の複数回適用は、1 回適用と比較して、全体的に線虫防除及び対応する苗の生育を向上させた。

10

【表 4】

表 3

処理	用量	適用
SERENADE ASO	6 クォート / エーカー	移植時
SERENADE ASO	3 クォート / エーカー	2 週間隔で 3 回施用
SERENADE ASO	6 クォート / エーカー	2 週間隔で 3 回施用
SERENADE ASO	12 クォート / エーカー	2 週間隔で 3 回施用
SERENADE ASO	18 クォート / エーカー	2 週間隔で 3 回施用
未処理対照	なし	なし

20

【0072】

実施例 6

移植時に様々な用量で 1 回適用した SERENADE (登録商標) ASO

[0079] SERENADE (登録商標) ASO 製品を、表 4 で詳述するように移植時に様々な用量で植木鉢のトマト苗に適用した。

【表 5】

表 4

処理	用量	適用
SERENADE ASO	4 クォート / エーカー	移植時
SERENADE ASO	20 クォート / エーカー (5x)	2 週間隔で 3 回施用
SERENADE ASO	40 クォート / エーカー (10x)	2 週間隔で 3 回施用
SERENADE ASO	80 クォート / エーカー (20x)	2 週間隔で 3 回施用
SERENADE ASO	160 クォート / A (40x)	2 週間隔で 3 回施用
未処理対照	なし	なし

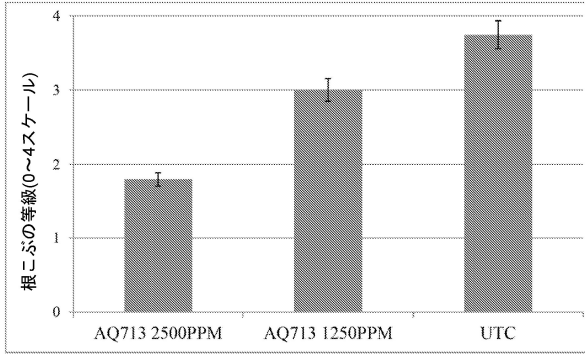
30

【0073】

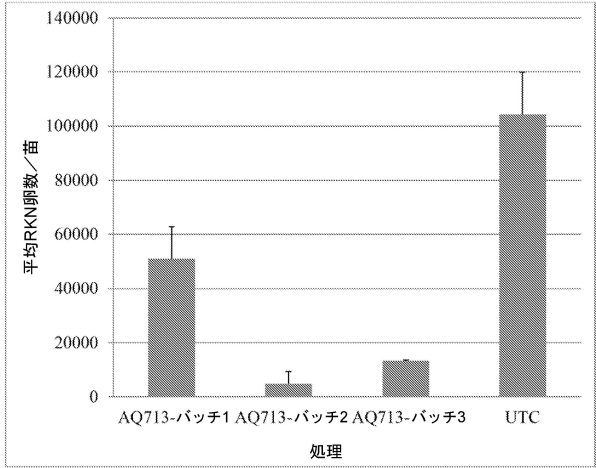
[0080] 上述したように、6 クォート / エーカーという用量は土壌 1 g 当たり 1×10^5 c f u とほぼ同等である。次に、苗を温室内に 10 日間おき、植木鉢ごとに 3000 個のネコブセンチュウの卵を摂取した。苗は線虫接種の 7 週後に採取し、卵の合計をカウントした (図 8 参照)。全データ点は測定 4 回の平均値を表す。一般的に、割合が 4 クォート / エーカーより高くなると、線虫卵産生の防除が向上し、40 クォート / エーカーで処理すると、未処理の苗群と比較して約 70% の防除となる。

40

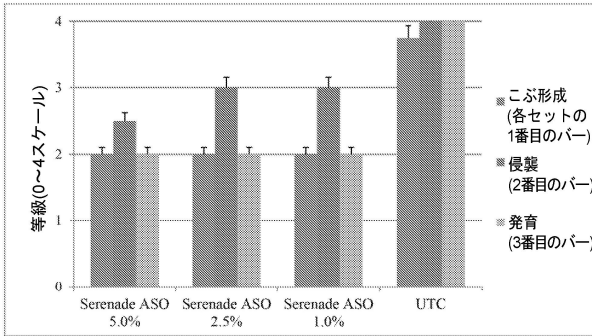
【 図 1 】



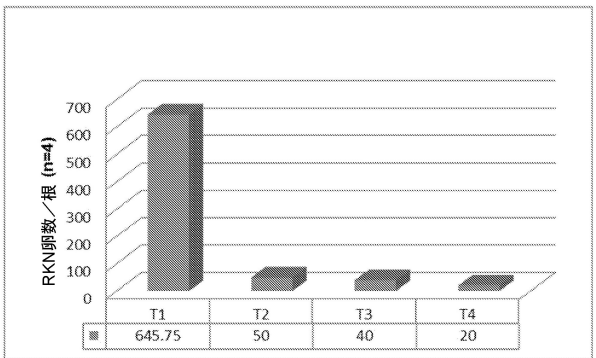
【 図 3 】



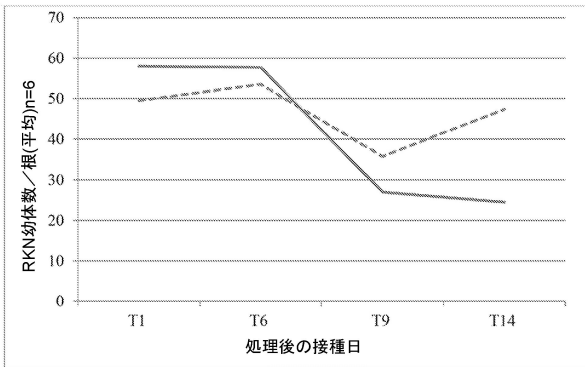
【 図 2 】



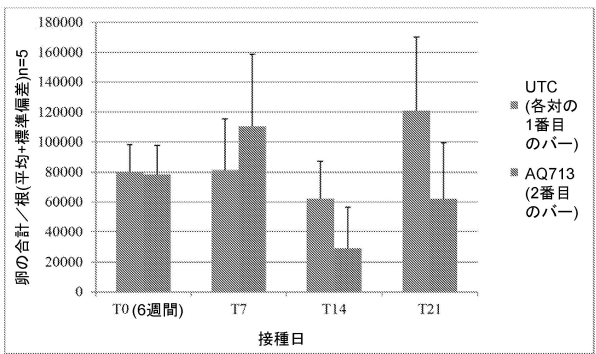
【 図 4 】



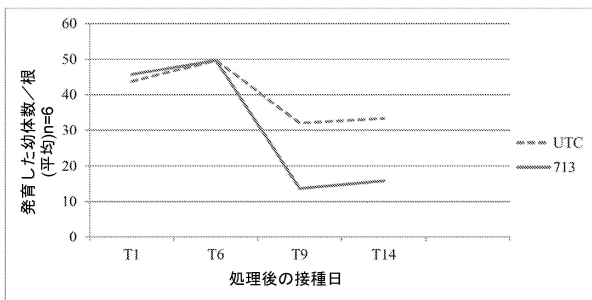
【 図 5 A 】



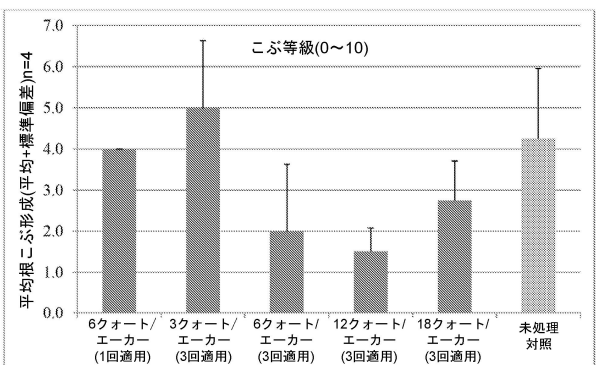
【 図 6 】



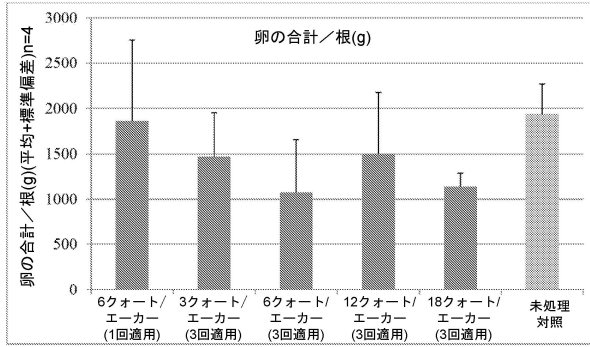
【 図 5 B 】



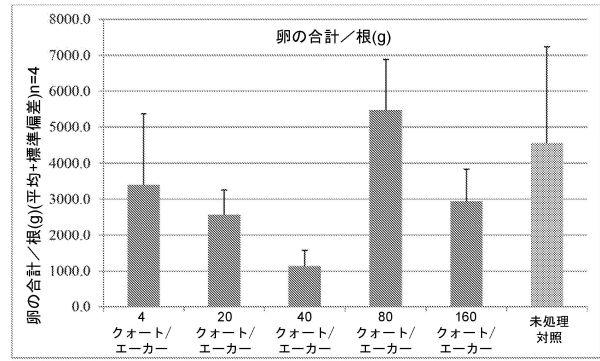
【 図 7 A 】



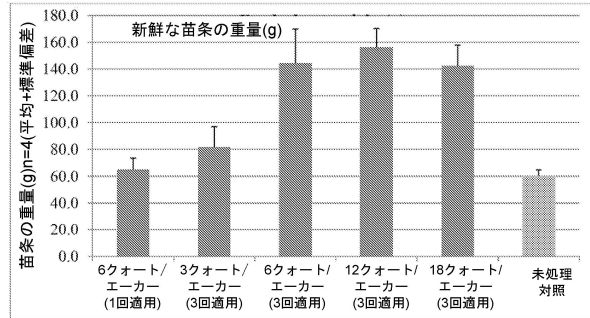
【 図 7 B 】



【 図 8 】



【 図 7 C 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 0 1 N 57/14 (2006.01) A 0 1 N 57/14 D

(31)優先権主張番号 61/556,016

(32)優先日 平成23年11月4日(2011.11.4)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100151448

弁理士 青木 孝博

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100185959

弁理士 今藤 敏和

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 ロイヤルティ, リード, ネイサン

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 5 6 1 6, ディヴィス, エル ドラド プレイス 1 9 2
0

(72)発明者 トーマス, バルゲーゼ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 5 6 1 6, ディヴィス, ソラノ パック サークル 3 8
0 0, アパートメント 3 5 2 3

(72)発明者 ウィットソン, ロイ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 3 7 1 1, フレズノ, ウェスト ブローニング アベニュー
- 2 7 3 2

審査官 吉森 晃

(56)参考文献 国際公開第2010/128003(WO, A1)

特表2012-526073(JP, A)

特表2001-507237(JP, A)

米国特許第00606051(US, A)

特表平11-505105(JP, A)

米国特許第06406690(US, B1)

特表2001-505422(JP, A)

米国特許第00573354(US, A)

米国特許第06015553(US, A)

特開平06-157226(JP, A)

特開平07-285819(JP, A)

特開平11-302647(JP,A)

特表2008-501039(JP,A)

米国特許出願公開第2005/0266036(US,A1)

特表2013-544269(JP,A)

米国特許出願公開第2014/0005047(US,A1)

Microbiol. Res., 2009年, Vol.164, p.493-513

Biological Control of Plant Pathogens, Plant Health Instructor, 2006年, Retrieved from the Internet, URL, <https://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Documents/P HI-BiologicalCntrol.pdf>

Nematol. Medit., 2012年, Vol.40, p.203-206

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

JSTPlus/JSTChina/JST7580(JDreamIII)

CAplus(STN)

A01N

A01P

A01M

A61K

A61P