(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5434597号
(P5434597)

(45)発行日　平成26年3月5日(2014.3.5)　(24)登録日　平成25年12月20日(2013.12.20)

(51)Int.Cl.		F I		
A01N 63/02	(2006.01)	A01N	63/02	Z
A01P 3/00	(2006.01)	A01N	63/02	E
A01N 59/20	(2006.01)	A01P	3/00	
A01N 59/16	(2006.01)	A01N	63/02	C
		A01N	59/20	Z

請求項の数 5　(全 17 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-548967(P2009-548967)
(86)(22)出願日　平成21年1月9日(2009.1.9)
(86)国際出願番号　PCT/JP2009/050216
(87)国際公開番号　WO2009/088074
(87)国際公開日　平成21年7月16日(2009.7.16)
審査請求日　平成23年11月30日(2011.11.30)
(31)優先権主張番号　特願2008-4833(P2008-4833)
(32)優先日　平成20年1月11日(2008.1.11)
(33)優先権主張国　日本国(JP)
(31)優先権主張番号　特願2008-221563(P2008-221563)
(32)優先日　平成20年8月29日(2008.8.29)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　000000066
味の素株式会社
東京都中央区京橋１丁目１５番１号
(74)代理人　100100549
弁理士　川口　嘉之
(74)代理人　100126505
弁理士　佐貫　伸一
(74)代理人　100131392
弁理士　丹羽　武司
(72)発明者　五十嵐　大亮
日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１
味の素株式会社内
(72)発明者　武田　泰斗
日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１
味の素株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】植物用病害耐性増強剤およびそれを用いた植物病害防除法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
Escherichia属細菌、コリネ型細菌、Pantoea属細菌、Bacillus属細菌およびSaccharomyces属酵母から選択される微生物の菌体をｐＨ６以下の酸性溶液中で７０℃以上の温度で１０分以上加熱処理することにより得られる抽出液を含む、植物用病害耐性増強剤。
【請求項２】
葉面散布剤である、請求項１に記載の病害耐性増強剤。
【請求項３】
さらに金属を含む、請求項１または２に記載の病害耐性増強剤。
【請求項４】
金属が亜鉛及び／又は銅である、請求項３に載の病害耐性増強剤。
【請求項５】
請求項１～４のいずれか一項に記載の病害耐性増強剤で植物を処理することを特徴とする、植物の病害を防除する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は微生物を原料として、環境負荷が少なくかつ使用者および消費者にとって安全な植物用病害耐性増強剤と植物の病害防除方法に関する。
【背景技術】

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

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

【０００４】
また、天然物由来の病害耐性誘導物質では、多糖体分解物（例えば、特許文献１参照。）、セレブロシド類（例えば、特許文献２、特許文献３及び非特許文献１参照）、ジャスモン酸（例えば、特許文献４及び非特許文献２参照）、キチンオリゴ糖（例えば、非特許文献３参照）、β-1,3-およびβ-1,6-グルカンオリゴ糖（例えば、非特許文献４、非特許文献５及び非特許文献６参照）、胆汁酸（特許文献５および非特許文献８参照）、ペプチドグリカン(非特許文献９参照)、リポポリサッカライド(非特許文献１０参照)などが報告されている。これら物質はエリシターと呼ばれており、病原菌に対して抗菌活性をもつファイトアレキシン(phytoalexins)の蓄積、病原菌の細胞壁を溶解するキチナーゼやβ-1,3-グルカナーゼなどのPRタンパク（Pathogenesis-related proteins）の蓄積、過敏感細胞死の誘導等の効果があることが知られている（例えば、非特許文献３及び非特許文献７参照）。

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

【特許文献１】特開平5-331016号公報
【特許文献２】特許第2846610号公報
【特許文献３】国際公開98/47364号公報
【特許文献４】特開平11-29412号公報
【特許文献５】特開2006-219372号公報
【特許文献６】特開平6-80530号公報
【非特許文献１】Koga J. et. al., J. Biol. Chem., 1998, 48, 27, p.31985-31991
【非特許文献２】Nojiri H. et. al., Plant Physiol., 1996, 110, p.387-392
【非特許文献３】Yamada A. et. al., Biosci. Biotech. Biochem., 1993, 57, 3, p.405-409
【非特許文献４】Sharp J . K. et al., J. Biol. Chem., 1984, 259, p.11312-11320
【非特許文献５】Sharp J. K. et. al., J. Biol. Chem., 1984, 259, p.11321-11336
【非特許文献６】Yamaguchi T. et. al., Plant Cell, 2000, 12, p.817-826
【非特許文献７】Keen N. T., Plant Mol. Biol., 1992, 19, p.109-122
【非特許文献８】Koga J. et. al., Plant Physiol. 2006, 140, p.1475-1483
【非特許文献９】Gust A. A. et. al., J. Biol. Chem., 2007, 2007 in press
【非特許文献１０】Newman M,.A, Plant J. 2002, 29, p.487－495.

【発明の開示】
【０００６】

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

【０００７】

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

【０００８】

本発明は以下のとおりである。

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

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

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

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

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

（６）金属が亜鉛及び／又は銅である（５）記載の病害耐性増強剤。

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

【図面の簡単な説明】

【０００９】

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

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

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

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

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

【図６】Corynebacterium処理液と亜鉛による、シロイヌナズナのキチナーゼ活性またはグルカナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照（展着剤のみの葉面散布区）、１はCorynebacterium酸性加熱処理液、２はCorynebacterium酸性加熱処理液＋亜鉛（0.01% w/v）

、３は亜鉛（0.01% w/v）を葉面散布したときの活性を示す。上段は処理後24時間、下段は処理後72時間の結果を示す。
【図７】E. coli処理液と亜鉛による、シロイヌナズナのキチナーゼ活性またはグルカナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照（展着剤のみの葉面散布区）、１はE. coli酸性加熱処理液、２はE. coli酸性加熱処理液＋亜鉛（0.01% w/v）、３は亜鉛（0.01% w/v）を葉面散布したときの活性を示す。
【図８】CorynebacteriumとE.coli処理液と銅による、シロイヌナズナのキチナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照(展着剤のみの葉面散布区)、１はCorynebacterium酸性加熱処理液、２はCorynebacterium酸性加熱処理液+Cu(0.01% w/v)、３はE.coli酸性加熱処理液、４はE.coli酸性加熱処理液+Cu(0.01% w/v)をそれぞれ散布したときの活性を示す。
【図９】ペプチドグリカン（Ａ）またはLPS（Ｂ）による、シロイヌナズナのキチナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照（展着剤のみの葉面散布区）、（A）の１はペプチドグリカン100mg/L, (B)の1はLPS 100ｍｇ/Lを葉面散布したときの活性を示す。
【図１０】プロリン発酵液上清（アミノ酸50ppm）による、シロイヌナズナのキチナーゼ活性またはグルカナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照（展着剤のみの葉面散布区）、１はプロリン発酵液上清（アミノ酸50ppm）を葉面散布したときの活性を示す。
【図１１】Corynebacterium酸性加熱処理液による、シロイヌナズナへの黒斑細菌病の感染防除効果を示す図。（A）はシロイヌナズナの葉の写真であり、左の２枚の葉は非処理（対照）、右の２枚の葉はCorynebacterium酸性加熱処理液で前処理した後に病原菌を感染させたものである。（B）は葉の単位重量あたりにおける病原菌の数である。
【図１２】各微生物酸性加熱処理液による、イネのグルカナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照（展着剤のみの葉面散布区）、１はCorynebacterium酸性加熱処理液、２はE. coli酸性加熱処理液、３はPantoea 酸性加熱処理液、４はBacillus酸性加熱処理液を葉面散布したときの活性を示す。
【図１３】Corynebacterium酸性加熱処理液によるイネのいもち病の感染防除効果を示す図。Cは対照（展着剤アプローチBI（花王）散布区）、1は展着剤にCorynebacteriume酸性加熱処理液を加えたもので前処理をしたものであり、グラフの縦軸は葉あたりの病斑数を示す。
【図１４】Corynebacterium酸性加熱処理液によるアスパラガス、イチゴ、ブドウの活性酸素（H_2O_2）発生量を示す図。各植物の葉に処理を行ない、活性酸素の発生量を測定した。値は相対的な蛍光値(RFU; relative fluorescent units)で示した。Cは対照、1はCorynebacterium酸性加熱処理液を分子量分画(5kDa以上、30kDa以下)した後の液(100ppm)を処理したときの活性酸素の発生量を示す。
【図１５】Corynebacterium酸性加熱処理液によるキャベツのキチナーゼ活性に対する効果を示す図。播種後3週間栽培したキャベツの葉に処理液を注入し、48時間後のキチナーゼ活性を測定した。Cは対照、1はCorynebacterium酸性加熱処理液を処理したときの活性を示す。
【図１６】Saccharomyces cerevisiae酸性加熱処理液によるイネのグルカナーゼ活性に対する効果を示す図。Cは対照、1はSaccharomyces cerevisiae酸性加熱処理液を処理したときの活性を示す。
【図１７】Saccharomyces cerevisiae酸性加熱処理液によるイネのいもち病の感染防除効果を示す図。Cは対照（展着剤アプローチBI（花王）散布区）、1は展着剤にSaccharomyces cerevisiae酸性加熱処理液を加えたもので前処理をしたものであり、グラフの縦軸は葉あたりの病斑数を示す。
【図１８】イネの根に対する菌体酸加熱処理液処理による病害抵抗性遺伝子発現誘導効果を示す図。Cは対照、1はCorynebacterium酸性加熱処理液を処理したときのRAc1の発現量で標準化されたPBZ1遺伝子の発現量を示す。
【発明を実施するための最良の形態】
【００１０】
本発明において微生物とは、酵母や菌類などの真核生物と、バクテリアあるいは放線菌

などの原核生物を指し、グラム陽性、グラム陰性菌を限定しない。
好ましくは、コリネ型細菌、バチルス属細菌、エシェリヒア属細菌、パントエア属細菌、乳酸菌、酢酸菌、酵母等が使用できる。

【００１１】

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

【００１２】

エシェリヒア属細菌としては、エシェリヒア・コリ（E. coli）等が挙げられる。
パントエア属細菌としてはパントエア・アナナティス等が挙げられる。
バチルス属細菌としては、バチルス・ズブチリス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・プミルス等が挙げられる。
酵母としては、サッカロミセス・セレビジエ等のサッカロミセス属酵母、ピキア・パストリス等のピキア属酵母、ハンセヌラ・ポリモルファ等のハンセヌラ属酵母、キャンディダ・ユティリス等のキャンディダ属酵母、シゾサッカロミセス・ポンベ等のシゾサッカロミセス属酵母などが挙げられる。
乳酸菌としては、ラクトバチルス・カゼイなどのラクトバチルス属細菌、ラクトコッカス・ラクチスなどのラクトコッカス属細菌、ビフィドバクテリウム・ビフィドゥムなどのビフィドバクテリウム属細菌が挙げられる。
酢酸菌としては、アセトバクター・アセチなどのアセトバクター属細菌が挙げられる。

【００１３】

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

【００１４】

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

【００１５】

酸性加熱処理することによって得られる抽出液（以下、酸性加熱処理液ともいう）は、遠心分離や膜分離などで菌体を除いた後に、病害耐性増強剤として使用することができるが、菌体を含んだまま使用してもよい。
本発明の病害耐性増強剤の施用濃度は植物の種類、生育ステージ、施用方法により適切

な濃度に希釈又は濃縮して調製することができる。また、分子量で分画した画分を用いることもできる。

【００１６】

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

【００１７】

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

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

【００１８】

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

【００１９】

植物の一般的な病害抵抗反応は病原菌に対して非特異的であることから、対象病害としては、糸状菌、細菌、ウイルスを原因とする植物病害すべてが含まれる。例えば、イネいもち病菌（Magnaporthe grisea）、イネごま葉枯病菌（Cochliobolus miyabeanus）、黒斑細菌病、ジャガイモ粉状そうか病菌（Spongospora subterranea）、ジャガイモ疫病菌（Phytophthora infestans）、ダイズべと病菌（Peronospora manshurica）、オオムギうどんこ病菌（Eryshiphe graminis f. sp. hordei）、コムギうどんこ病菌（Eryshiphe graminis f. sp. tritici）、ムギ類赤かび病菌（Gibberella zeae）、エンドウ褐紋病菌（Mycosphaerella pinodes）、ムギ類雪腐大粒菌核病菌（Sclerotinia borealis）、コムギ赤さび病菌（Puccinia recondita）、トウモロコシ黒穂病菌（Ustilago maydis）、オオムギ株腐病菌(Ceratobasidium gramineum)、ジャガイモ黒あざ病菌（Rhizoctonia solani）、イネ紋枯れ病（Rhizoctonia solani）、ジャガイモ夏疫病菌（Alternaria solani）、ダイズ紫斑病菌（Cercospora kikuchii）、サツマイモつる割病菌（Fusarium oxysporum f. sp. batatas）、メロンつる割病菌（Fusarium oxysporum f. sp. melonis）、レタス根腐病菌（Fusarium oxysporum f. sp. lactucae）、トマト萎凋病菌（Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici）、ホウレンソウ萎凋病菌（Fusarium oxysporum f. sp. spinaciae）、トマト半身萎凋病菌（Verticillium dahliae）、アブラナ科根こぶ病菌（Plasmodiophora brassicae）、キュウリ苗立枯病菌（Pythium debaryanum）、イチゴ灰色かび病

菌（Botrytis cinerea）、トマト炭そ病菌（Colletotrichum phomoides）、オオムギ、コムギ黒節病菌（Pseudomonas syringae pv. syringae）、ジャガイモ黒あし病菌（Erwinia subsp. atroseptica）、イネ白葉枯病菌（Xanthomonas campestris pv. oryzae）、ジャガイモそうか病菌（Streptomyces scabies）、ムギ類萎縮ウイルス（Soil-borne wheat mosaic virus）、ダイズモザイクウイルス（Soybean mosaic virus）、アルファルファモザイクウイルス（Alfalfa mosaic virus）、ジャガイモ葉巻ウイルス（Potato leafroll virus）による病害などが挙げられる。

【００２０】

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

【００２１】

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

【実施例】

【００２２】

実施例1 微生物由来の植物用病害耐性増強剤の調製法

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

各菌体は6,000rpmで遠心分離して回収し、純水で3回洗浄を行なった後、1.5-2.0g（乾燥重量）につき純水100mLに懸濁した。H_2SO_4を添加してpH3.2に調整した後、121℃で30分間オートクレーブを用いて加熱処理を行なった。得られた溶液を10,000rpmで遠心分離し、不溶成分を除去した。ここで得られた上清を酸性加熱処理液として以降の実験に用いた。植物体への処理には特に記載のない場合は100倍に希釈した溶液を用いた。

【００２３】

実施例2 酵素活性を指標とした植物病害耐性誘導の評価

（１）植物体の栽培と散布方法

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

【００２４】

【表１】

KPO_4 (pH5.7)	2.5 mM
$MgSO_4$	2 mM
$Ca(NO_3)_2$	3 mM
NH_4NO_3	2.5 mM
KNO_3	2 mM
KCl	2 mM
micro nutrients	
Fe(III)-EDTA	0.1 mM
$MnCl_2$	0.1 mM
$CuSO_4$	0.5 μM
$ZnSO_4$	30 μM
$NaMoO_4$	1 μM
$CoCl_2$	0.1 μM
H_3BO_3	0.1 mM
NaCl	10 μM

【００２５】
（２）酵素抽出
酵素活性測定用に植物をサンプリングした後、直ちに液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。凍結状態のまま植物破砕機MM300(QIAGEN)により破砕し500μLの抽出バッファー[100 mM Na_3PO_4 (pH6.0)、1 mM DTT、protease inhibitor / complete mini EDTA free (Roche)]に溶かした。10,000 rpm 5分間の遠心分離後の上清を0.22 μmフィルターに通し不溶化物を除去した。濃縮および脱塩を目的として限外ろ過フィルターUFV5BG00 (Millipore)に通した。1.5 mlの抽出バッファーを3回に分けて通すことで脱塩を行なった。ここで得られた画分を粗抽出画分とし、Bradford法によるタンパク質濃度測定後、酵素活性測定に用いた。
【００２６】
（３）キチナーゼ活性測定
キチナーゼ活性はMcCreathらによる方法(J. Microbiol. Methods 14:229- 1992)により求めた。基質である4MU-$(GlcNAc)_3$ (SIGMA M5639)は最終濃度0.4mMになるように50% エタノール中に溶解し-20℃で保存した。使用時に10倍に希釈し基質溶液とした。抽出した粗抽出液を6-8μg/μLに調製し50μLを反応に用いた。96穴プレート上で37℃で10分間のプレインキュベーション後に基質溶液50μLを添加し37℃で反応を開始した。反応開始後30分、150分後に反応液に100μLの1M Gly / NaOH buffer (pH 10.2)を添加し反応を停止した。反応、停止は96ウェルプレート上で行い、最終量200μLとした。液面の泡を完全に除去した後に蛍光検出用プレートリーダー（WALLAC 1420 ARVO-SX）を用いて蛍光強度を測定した。蛍光測定では360nmエキサイテイーション、450nmエミッションにより測定した。反応量は4-MU（メチルウンベリフェロン）を基質をして求めた標準値にもとづき1分間に1μmol反応する酵素量を1ユニットと定義した。
【００２７】

（４）グルカナーゼ活性測定

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

【００２８】

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

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

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

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

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

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

【００２９】

比較例 既知の病害耐性誘導物質との効果比較

過去に菌体の細胞壁を構成するペプチドグリカンやリポポリサッカライド（LPS）を植物が認識し、病害耐性誘導が引き起こされることが報告されており、それらの物質との効果の比較を行なった。ペプチドグリカンはinvivogen社製の標品（PGN-ECndss ultrapure）をリポポリサッカライドはシグマ製の標品（L8643）を用い、それぞれ効果があることが示されている100mg/L濃度でシロイヌナズナへの葉面散布を行い24時間後の酵素活性を測定した。図９に示すとおり、これらの物質ではキチナーゼの活性上昇は認められず、菌体酸性加熱処理液の葉面散布時の病害耐性誘導効果がこれらの物質よりも顕著に強いことが示された。

また、プロリン（Pro）発酵液の上清の散布により、病原菌の感染が防除できるとの先

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

【００３０】

実施例３ シロイヌナズナへの黒斑細菌病の感染防除効果

病原菌であるPseudomonas syrinagae pv. maculicolaはYEP培地で24時間培養した。培養後の菌体を3,000rpmで回収し、5x10^6cfu/mLとなるように10mM $MgSO_4$水溶液に懸濁した。菌体懸濁液を針をつけていない1mLシリンジにて葉内に注入し感染させた。感染後3日目に観察を行い、被病性を確認した。

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

【００３１】

実施例４ イネにおける病害耐性誘導とイネいもち病感染防除効果

（１）イネの栽培と散布方法

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

【００３２】

（２）グルカナーゼ活性測定

イネにおけるグルカナーゼ活性測定はInuiらの方法(Biosci Biotechnol Biochem. 61: 975- 1997)に従って行なった。試料（酸性加熱処理液）は本葉4.5葉齢期の第4本葉の表面10ヶ所に2μLずつのせ、24時間後にこの葉を液体窒素で凍結後、ホモジナイズ抽出した。抽出した粗抽出液100μLに900μLの基質溶液（1% Curdlan (SIGMA C7821), 50mM Na_2HPO_4-citric buffer, (pH5.0)）を添加し、37℃で反応を開始した。反応開始60分後に反応液50μLを200μLのDNS溶液（5g/L dinitrosalicylic acid, 16g/L NaOH, 300g/L 酒石酸ナトリウムカリウム4水和物）に添加し、98℃で10分間加熱後、氷上で急冷し発色させた。DNS法はMillerによる方法(Anal Chem 31: 426- 1959)により行い、発色後540nmの吸収量にもとづき活性を求めた。反応量はglucoseを基質として求めた標準値にもとづき1分間に1μmol反応する酵素量を1ユニットと定義した。

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

【００３３】

（３）イネへのイネいもち病の感染防除効果

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

【００３４】

実施例５ 各種植物における活性酸素産生を指標とした病害耐性誘導評価

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

活性酸素（H_2O_2）の測定には、Kunzeらの方法(Plant Cell, 16, 3496- 2004)を変更して行なった。植物の葉を約3mm四方に裁断し、一晩滅菌水に漬けた後に、各菌体（１．Corynebacterium、２．E.coli、３．Bacillus、４．Pantoea、５．Saccharomyces cerevisiae）の酸性加熱処理液を含む水溶液に移しH_2O_2を発生させて、その水溶液を反応液（50mMリン酸バッファー（pH5.8）、５μM Amplex Red （Invitrogen）、1μg/mL Horseradish Peroxidase （Sigma Aldrich P8515） に添加し、Excitation 544nm、Emission 590nmで測定した。各実験は4反復以上繰り返し以下の基準に従って判定を行なった。

（判定方法）

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

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

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

【００３５】

【表２】

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

【００３６】

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

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

14に示す通り、上記分画液はアスパラガス、イチゴ、ブドウへの処理においても顕著な活性酸素産生を誘導することが示された。

【００３７】

実施例７

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

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

【００３８】

実施例８

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

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

【００３９】

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

OptMS無機塩類培養培地（表1）に0.8% Agarを加えた寒天培地を充填した1mLチップをチップラックにセットし、培地上に滅菌済みのイネ（品種：コシヒカリ）の種子を播種した。チップは根が伸展できるよう下端から約20mm以下の部分を切り落とし、乾燥を防ぐため切り口を純水に漬けた状態で1週間栽培した。チップ上で成長したイネ幼苗に厚さ20mmの発泡スチロールの浮きを装着し、OptMS 1Lを入れたフードパック（C-APフルーツ200、 中央化学（株））に浮かべた。この状態でさらに1週間栽培し、トータルで2週間栽培した4.5葉期のイネを実験材料とした。テクノポット（住友ベークライト（株））の底部に処理液を100mL入れ、水耕栽培で2週間生育させたイネを根が処理液に十分浸る状態で発泡スチロールごと浮かべた。処理液は20%濃度のCorynebacterium酸性加熱処理液を用いた。発泡スチロールはあらかじめテクノポットに収まるサイズに調整した。栽培は恒温植物インキュベーター（コイトトロン、小糸工業（株））内で、日周16時間明期8時間暗期、温度28℃、光強度約150μmol m^{-2} s^{-1}で行った。根への処理後15時間後にサンプリングを行ない，サンプルは根全体を1サンプルとした。各サンプルからRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出した。Total RNAをRNase free DNase Set (QIAGEN)を用いてDNase処理した後、逆転写酵素High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いてoligo dT primerから逆転写を行ない、合成した1本鎖cDNAを鋳型として定量PCRを行なった。定量PCRはABI PRISM 7500を用い、反応条件は95℃ 15秒　60℃ 60秒を40サイクルで行った。試薬はPower SYBR Green PCR Master Mix（Applied Biosystems）を用いた。定量する遺伝子にはハウスキーピング遺伝子としてRAc1 (RAP code、 Os11g0163100)、病害抵抗性関連遺伝子としてPBZ1 (RAP code、 Os12g0555200)を用いた。各遺伝子発現用プライマーは以下を用いた：5’-CCCCTTGTGTGTGACAATGG -3’（配列番号１）と5’-CCCTGGGCGCATCGT-3’ （配列番号２）(RAc1)、 5’-GGAGCAGGAGAAGATGATCG-3’（配列番号３）と5’-TTCTTCTCACATGCGACCAC-3’ （配列番号４）(PBZ1)。PBZ1の発現量はRAc1の発現量で標準化した。結果を図18に示す。根に処理した場合、根においてはPBZ1遺伝子発現量が増加することが示された。

【産業上の利用可能性】

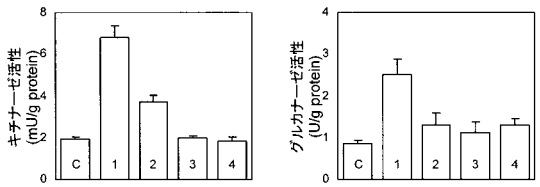
【００４０】

本発明の病害耐性増強剤はアミノ酸等の発酵を行なった後の各種微生物菌体残渣や有機性汚泥に含まれる微生物菌体を酸性溶液中で加熱処理（酸性加熱処理）することで容易に得られ、さらに低濃度(例えば、菌体乾燥重量200mg/Lを酸性加熱処理)で効果が発揮され

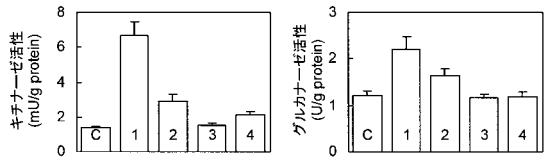
ることから、コスト面、大量調製が容易に達成されることができる。

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

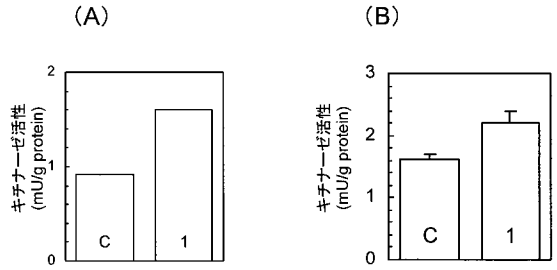
【図１】



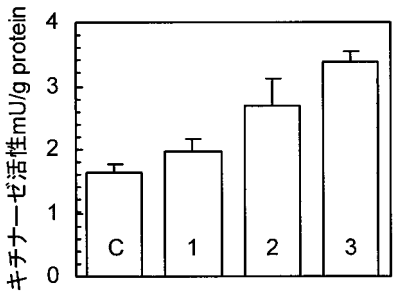
【図２】



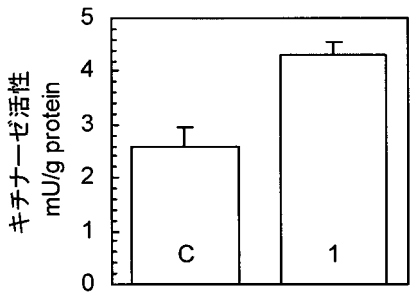
【図３】



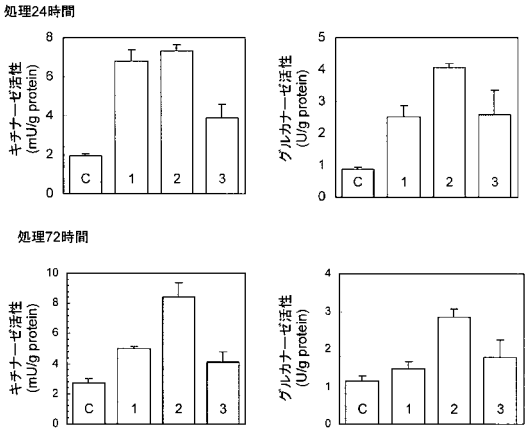
【図４】



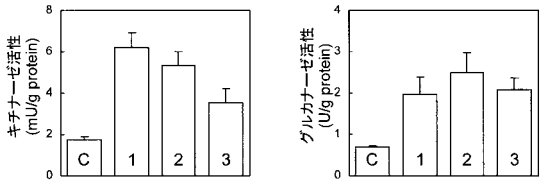
【図５】



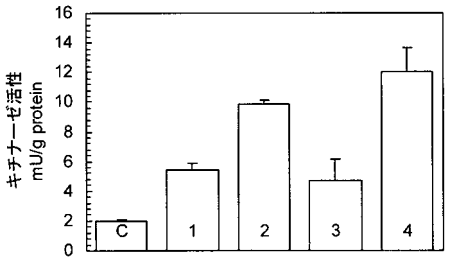
【図６】



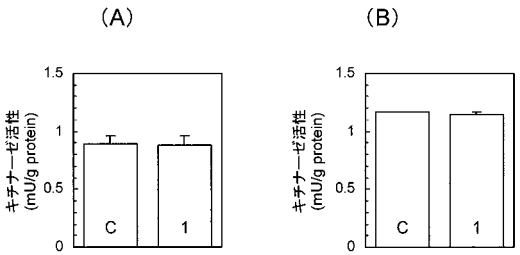
【図７】



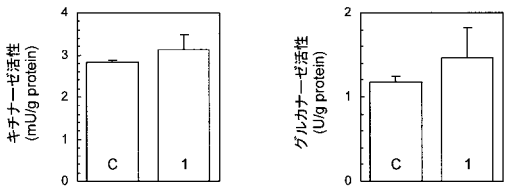
【図８】



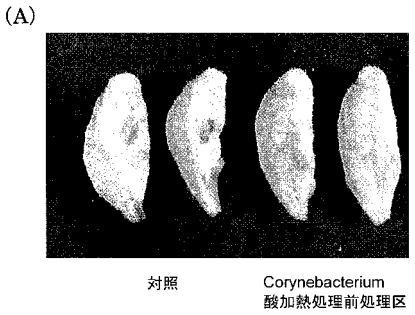
【図９】



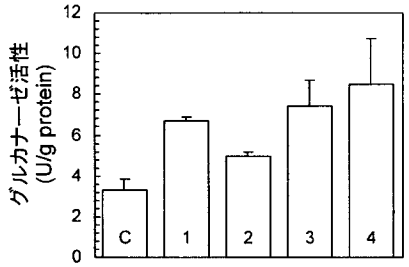
【図１０】



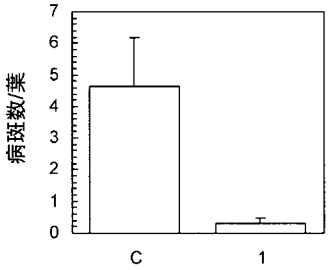
【図１１】



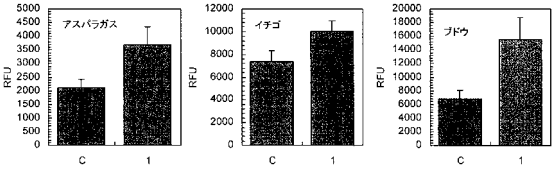
【図１２】



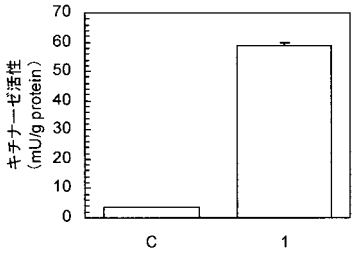
【図１３】



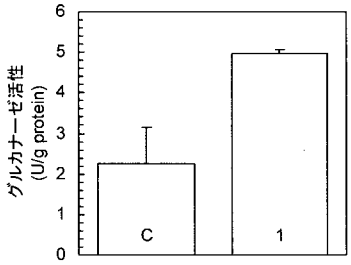
【図１４】



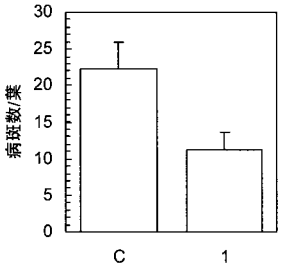
【図１５】



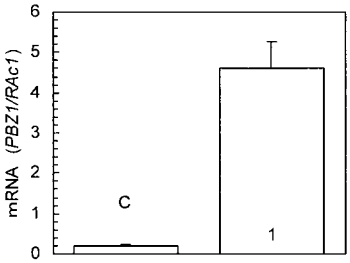
【図１６】



【図１７】



【図１８】



【配列表】
0005434597000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A01N 59/16 Z

(72)発明者 石崎 貴志
日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内
(72)発明者 戸塚 一彦
日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内

審査官 太田 千香子

(56)参考文献 特開昭５３－０４１４２３（ＪＰ，Ａ）
特開昭５２－０７６４２７（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ０１Ｎ ６３／０２
Ａ０１Ｎ ５９／１６
Ａ０１Ｎ ５９／２０