

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02823250. X

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)
A01P 7/02 (2006.01)
A01P 7/04 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 9 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 100419070C

[22] 申请日 2002.11.26 [21] 申请号 02823250. X
[30] 优先权

[32] 2001.11.26 [33] JP [31] 359222/2001

[32] 2002. 5. 8 [33] JP [31] 133294/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2002/012319 2002.11.26

[87] 国际公布 WO2003/046157 日 2003.6.5

[85] 进入国家阶段日期 2004.5.24

[73] 专利权人 组合化学工业株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 渡边哲 丰岛淳 清水力 山路孝二
永山孝三 矢野祐幸

[56] 参考文献

JP5051305 A 1993.3.2

JP5091869 A 1993.4.16

JP6133763 A 1994.5.17

EP0522836 A2 1993.1.13

审查员 徐益君

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭煜 孟凡宏

权利要求书 1 页 说明书 10 页

[54] 发明名称

芽孢杆菌 D747 菌株、应用该菌株的植物病害
防除剂或害虫防除剂及其应用这些防除剂的
防除方法

[57] 摘要

本发明涉及新菌株即芽孢杆菌 D747 菌株 (FERM BP-8234), 及其涉及含有芽孢杆菌 D747 菌株作为有效菌的植物病害防除剂和/或害虫防除剂, 及其应用上述防除剂的防除方法。对于芽孢杆菌菌株 D747, 使其培养物(包含活菌体)或其培养分离的活菌体存在于根、茎、叶、种子等植物体上, 或存在于栽培土壤中, 可在非常广泛的范围内抑制各种植物病害的发生并进行害虫的防除, 并且, 散布了含有本发明的 D747 菌株的植物病害防除剂和害虫防除剂的植物对各种植物病害和害虫都具有高效防除效果。

1.芽孢杆菌D747菌株，该菌株是根据布达佩斯条约进行保藏的、保藏号为FERM BP-8234的菌株。

2.植物病害防除剂，其特征在于，含有作为有效菌的如权利要求1所述的芽孢杆菌菌株。

3.害虫防除剂，其特征在于，含有作为有效菌的、如权利要求1所述的芽孢杆菌菌株。

4.植物病害和/或害虫防除方法，其特征在于，使用如权利要求2所述的植物病害防除剂和/或如权利要求3所述的害虫防除剂。

芽孢杆菌D747菌株、
应用该菌株的植物病害防除剂或害
虫防除剂及其应用这些防除剂的防除方法

技术领域

本发明涉及芽孢杆菌 (*Bacillus*) D747菌株及其相关应用, 具体地说, 涉及含有将具有抑制植物病害发病的效果和害虫防除效果的芽孢杆菌 (*Bacillus*) D747菌株作为有效菌的植物病害防除剂和/或害虫防除剂, 及其应用上述防除剂的防除方法。

背景技术

作为植物病害和害虫的防除方法有例如, 利用轮作、太阳热进行耕种或进行物理防除、利用化学农药进行化学防除、应用抗病害品种进行防除、利用对弱毒性病毒或病原菌具有拮抗作用的微生物进行生物防除。这当中, 化学农药, 特别是有机合成杀菌剂的开发研究近年来发展异常迅猛, 接二连三地开发出了具有较高效力、不同作用的多种药剂, 同时也进一步开发出了多种施用方法。应用上述药剂的化学防除方法对植物病害防除和防除作业中节省劳动力作出了很大贡献, 已被广泛应用。但是近年来, 由于出现了所谓耐药菌, 出现了用化学防除方法防除效果低下的现象, 一部分作物又出现了受病害困扰的问题。此外, 随着作物的指定产地化而不得已进行连作的结果, 在各地发生的用化学农药难以防除的土壤传染性病害已成为十分严重的问题。此外, 多次反复大量使用化学农药的方法, 将自然界所不存在的化学物质释放到环境中, 不用说对动植物有直接毒性的药剂, 即使是不完全释放的药剂对环境造成的恶劣影响也是令人担忧的。

鉴于上述, 用化学农药进行病害防除, 由于耐药菌的出现使防除效果低下的可能性较高, 这种情况下, 研究开发新的杀菌剂已成为必要。此外, 对用化学农药难以防除的病害的防除必须采取替代方法或与其他方法并用的方法。并且希望建立对环境安全性更高的防除技术。

近年来在上述背景之下, 对偏重使用化学农药的防除方法进行重新研究, 提出了利用预计与化学农药相比对环境的安全性高的微生物的生物防除 (所谓的生

物农药)方法,其中的一部分已产业化。

关于植物病害的生物防除研究已尝试利用弱毒性的病毒、病原菌的弱病原性或非病原性微生物、拮抗微生物等。其中有许多有关利用拮抗微生物的研究实例,此外,在拮抗微生物中,虽然有很多利用芽孢杆菌属进行病害防除的研究,但未见到有广谱病害防除的芽孢杆菌属菌。

发明内容

本发明的课题涉及分离具有抑制多种植物病害的发病和/或害虫防除效果的新菌株。

本发明进一步提供含有上述菌株作为有效菌,可作为生物农药来有效利用的植物病害防除剂和/或害虫防除剂。

本发明进一步提供利用上述植物病害防除剂和/或害虫防除剂的植物病害和/或害虫的防除方法。

本发明人等从自然界分离出一种属于芽孢杆菌属的新菌株,发现该菌株对植物生长无不良影响,具有抑制多种植物病害发病的效果及害虫防除效果,由此完成了本发明。

本发明涉及以下的菌株和植物病害防除剂和/或害虫防除剂,以及植物病害防除和/或害虫防除方法。

- (1) 芽孢杆菌菌株D747。
- (2) 植物病害防除剂,其特征在于含有作为有效菌的芽孢杆菌菌株D747。
- (3) 害虫防除剂,其特征在于含有作为有效菌的芽孢杆菌菌株D747。
- (4) 植物病害和/或害虫防除方法,其特征在于使用上述(2)中记载的植物病害防除剂和/或上述(3)中记载的害虫防除剂。

[芽孢杆菌菌株D747的分离与保藏]

本发明的芽孢杆菌菌株D747是从静岡県小笠郡菊川街的空气中分离得到的菌株。该菌株根据其后的细菌学性质,同时参考伯杰氏细菌分类学手册第一卷(1984)确定为芽孢杆菌属的新菌株,最初认为它是蜡状芽孢杆菌,2000年11月28日作为“蜡状芽孢杆菌(Bacillus cereus D747)”保藏在工业技术院生命工学工业技术研究所(Agency of Industrial Science and Technology, National Institute of Bioscience and Human-Technology)。

但其后对其是否属于蜡状芽孢杆菌产生了疑问,经过详细研究只能将其确定至芽孢杆菌属,因此在2002年4月1日提出将记载变更为“芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) D747”。

因此,本发明芽孢杆菌D747菌株(下文简称为“D747菌株”)在独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary)作为“*Bacillus* sp. D747”(FERM P-18128)提交保藏。2002年11月8日在同一专利生物保藏中心作为“*Bacillus* sp. D747”(FERM BP-8234)提交为国际保藏。

[D747菌株的细菌学性质]

本发明的D747菌株的细菌学性质如下所示。即,根据上述的伯杰氏细菌分类学手册进行细菌学性质实验。

(A) 形态学性质

形态: 杆菌

大小: 宽1.0~1.2 μ m, 长3~5 μ m

运动性: +

鞭毛着生状态: 周鞭毛

内生孢子: +

孢子位置: 中央

孢子膨胀: -

(B) 培养性质

菌落颜色: 白色~淡茶色

肉汁琼脂平板培养: 形成白色~奶油色的菌落, 表面有皱褶

(C) 生理学性质

革兰氏染色: +

硝酸盐还原: +

MR实验: -

VP实验: +

吲哚生成: -

淀粉水解: +

柠檬酸同化: +

无机氮源: +

氧化酶: -

カラタ—ゼ: +

培养pH 6.8、肉汤培养基: +

培养pH 5.7、肉汤培养基: +

培养温度 30°C: +

培养温度 50°C: -

培养NaCl浓度 2%: +

培养NaCl浓度 5%: +

培养NaCl浓度 7%: +

好气培养: +

厌气培养: -

O-F实验: O

卵黄反应: -

由葡萄糖产酸: +

由甘露醇产酸: -

由L-阿拉伯糖产酸: -

由D-木糖产酸: -

由葡萄糖产气: -

β -半乳糖苷酶: -

对NaCl和KCl的需求性: -

[D747菌株的培养]

有关本发明所用的D747菌株的培养方法可以选择任何适宜的培养基和培养条件。除肉汤培养基之类的一般培养基之外,例如还可举出含有葡萄糖、胨、酵母提取物的培养基等等。此外,除液体培养基之外也可以使用加入了琼脂的斜面培养基和平板培养基等固体培养基。通过培养使D747菌株增殖以获得所需的菌体量。

培养基中的碳源可以利用上述菌株可以同化的所有物质。具体地说,除葡萄糖、半乳糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、麦芽提取物、淀粉水解物等糖之外,还有D747

菌株可以利用的各种合成或天然碳源。

培养基中的氮源，同样地，除含有有机氮的胨、肉汤、酵母提取物外，还可以是D747菌株可以利用的各种合成或天然氮源。

根据常规的微生物培养方法，必要时可以相应地添加食盐、磷酸盐等无机盐类、钙、镁、铁等金属盐，维生素、氨基酸等微量营养源。

培养可以在振荡培养、通气培养等好气条件下进行。培养温度20~30℃、优选25~30℃、pH5~8、优选6~7，培养时间1~4天，优选2~3天为宜。

对于本发明的芽孢杆菌菌株D747，使其培养物（含有菌体）或其处理产物（培养物和其他成分的混合物等）、或培养分离的菌体（培养物经离心分离所得的菌体或其洗净的菌体等）及其处理产物（培养分离的菌体和其他成分的混合物等），以及由这些处理产物（这些的经液体或固体稀释的稀释物等）存在于根、茎、叶、种子等植物体上，或存在于栽培土壤中，具有抑制各种植物病害或害虫防除的性质。

本发明的D747菌株根据其使用形态可以对由属于卵菌类（Oomycetes）、子囊菌类（Ascomycetes）、担子菌类（Basidiomycetes）以及半知菌类（Deuteromycetes）的菌类引起的以及由细菌类引起的植物病害进行防除。

作为可以用D747菌株防除病害的原因菌，具体地说例如假霜霉属（*Pseudoperonospora*）菌，如古巴假霜霉菌（*Pseudoperonospora cubensis*）、黑星菌属（*Venturia*）菌，如苹果黑星菌（*Venturia inaequalis*）、白粉菌属（*Erysiphe*）菌，如禾白粉菌（*Erysiphe graminis*）、稻瘟病菌属（*Pyricularia*）菌，如米稻瘟病（*Pyricularia oryzae*）、葡萄孢菌属（*Botrytis*）菌，如灰葡萄孢病菌（*Botrytis cinerea*）、丝核菌属（*Rhizoctonia*）菌，如稻纹枯病菌（*Rhizoctonia solani*）、柄锈菌属（*Puccinia*）菌，如隐匿柄锈菌（*Puccinia recondita*）、壳针孢菌属（*Septoria*）菌，如颖枯壳针孢菌（*Septoria nodorum*）、核盘菌属（*Sclerotinia*）菌，如油菜核盘菌（*Sclerotinia sclerotiorum*）、腐霉菌属（*Pythium*）菌，如德巴利氏腐霉（*Pythium debaryanum* Hesse），此外作为细菌的伯克氏菌属（*Burkholderia*），如植物伯克氏菌（*Burkholderia plantarii*）等，本发明不局限于这些例子。

此外，本发明的D747菌株还可以对半翅目害虫、鳞翅目害虫、鞘翅目害虫、双翅目害虫、直翅目害虫、白蚁目害虫（シロアリ目害虫）、蓟马目害虫（アザミウマ目害虫）、叶螨类害虫（ハダニ害虫）等害虫进行防除。

作为可以用D747菌株防除的害虫,具体地说例如半翅目害虫,如棒蜂缘蝽(*Riptortus clavatus*)等蝽类(异翅类; HETEROPTERA)、黑尾叶蝉(*Nephotettix cincticeps*)等叶蝉类、稻褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)等飞虱类、木虱(*Psylla*)属等木虱类、甘薯粉虱(*Bemisia tabaci*)等粉虱类、桃蚜(*Myzus persicae*)等蚜类、康氏粉蚧(*Pseudococcus comstocki*)等蚧类; 鳞翅目害虫,如茶长卷蛾(*Homona magnanima*)等卷蛾类、环针单纹蛾(*Eupoecillia ambiguella*)等细卷蛾类、*Bambalina.sp*等蓑蛾类、*Nemapogon granelus*等细蛾类、柑桔潜叶蛾(*Phyllocnistis citrella*)等叶潜蛾类、菜蛾(*Plutella xylostella*)等巢蛾类、二化螟(*Chilo suppressalis*)等螟蛾类、美洲蒺夜蛾(*Heliothis virescens*)等夜蛾类; 鞘翅目害虫,例如古铜异丽金龟(*Anomala cuprea*)等金龟子甲虫类、*Epilachna vigintioctopunctata*等瓢虫类、稻水象甲(*Lissorhoptus oryzophilus*)等象虫类,双翅目害虫,例如尖音库蚊(*Culex pipiens*)、中国按蚊(*Anopheles sinensis*)、三带喙库蚊(*Culex tritaeniorhynchus*)、直翅目害虫,例如德国蟑螂(*Blatella germanica*)、白蚁目害虫,例如栖北散白蚁(*Reticulitermes speratus*)、蓟马目害虫,例如茶黄蓟马(*Scirtothrips dorsalis*)、叶螨类例如二点叶螨(*Tetranychus urticae*),此外,其他有害动物和令人不快的动物、卫生害虫、寄生虫、例如福寿螺(*Pomacea canaliculata*)、蛞蝓(*Incilaria*)等腹足纲(*Gastropoda*)、平甲虫(*Armadillidium sp.*)等脚目类等。本发明不局限于这些例子。

(植物病害防除剂和害虫防除剂)

本发明的植物病害防除剂和害虫防除剂是含有以能防除上述植物病害或害虫的D747菌株为有效菌的防除剂。在本发明的植物病害防除剂和害虫防除剂中可以使用D747菌株单体,也可以将D747菌株和D747菌株变异体一起使用。变异体是具有上述D747菌株的细菌学性质、具有植物病害防除作用和害虫防除作用的物质,可以利用自然突变株、用紫外线或化学诱变剂所得的突变株、或者细胞融合株以及基因重组株。本发明中,在植物病害防除剂和害虫防除剂中所含的D747菌株包括D747菌株的变异体。

本说明书中所谓的“防除”不仅指对病、害虫的预防、抵制,也用于表示包含有去除、杀死的意思。因此,对于已感染了病原菌的植物,应用本发明的植物病害防除剂可从植物中去除病原菌,也可以预防由病原菌引起的疾病或疾病的恶化。此外,对于害虫也可通过抵制和杀虫效果进行防除。

根据本发明的植物病害防除剂和害虫防除剂,应用D747活菌体的情况下优选

以 $10^5 \sim 10^{10}$ 个/ml的浓度向植物添加。

而应用D747菌株培养物的情况,使用时间和使用量可根据上述活菌体的情况适当地确定。

另外,本发明的植物病害防除剂和害虫防除剂中的D747菌株除单独以菌体或培养物使用外,还可以作为用非活性的液体或固体载体稀释,必要时添加表面活性剂、其他助剂的药剂使用。具体的制剂例,例如粒剂、粉剂、水和剂、悬浊剂、乳剂等剂型。优选的载体,例如滑石、皂土、粘土、高岭土、硅藻土、白碳、蛭石、消石灰、硅砂、硫酸铵、尿素、多孔固体载体、水、异丙醇、二甲苯、环己酮、甲基萘、烷基二醇等液体载体等。作为表面活性剂和分散剂,例如二萘基甲磺酸盐、乙醇硫酸酯盐、烷基芳基磺酸盐、木质素磺酸盐、聚氧乙烯二醇醚、聚氧乙烯烷基芳基醚、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单烷基化合物等。作为助剂,例如羧甲基纤维素、聚乙二醇、丙二醇、阿拉伯胶、黄原胶等。作为保护剂,例如脱脂牛奶、pH缓冲剂等。此时,D747菌株活菌体的量和/或其培养物的量、以及适用时期和适用量可根据上述应用活菌体的情况适宜地确定。

本发明的植物病害防除剂和害虫防除剂,作为有效成分必要时可以含有杀虫剂、其他杀菌剂、除草剂、植物生长调节剂、肥料等其他成分。此外,作为本发明的植物病害防除剂和害虫防除剂,除D747菌株外还可以含有其他种类的菌株。

本发明的植物病害防除剂和害虫防除剂可以直接施用也可以用水等稀释后施用。植物病害防除剂和害虫防除剂的施用方法没有特别地限定,例如,直接向植物或害虫撒播的方法、向土壤中撒播的方法、添加到向植物或土壤中添加的水或肥料中的方法等。此外,制剂的施用量优选根据对象病害、对象害虫、对象作物、施用方法、发生倾向、受害程度、环境条件、使用剂型等的不同作适当的调整。

如上所述,本发明的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)菌株D747具有广泛的病害及害虫防除谱,能够防除多种植物病害和害虫。

由于含有本发明的D747菌株的本发明的植物病害防除剂和害虫防除剂可以防除植物病害或害虫,所以可以用作生物农药。因此本发明的植物病害防除剂和害虫防除剂对环境的安全性高,由于其对多种植物病害和害虫具有防除效果,即使不与其他手段并用,也可以广泛的防除病害或害虫。

实施本发明的最佳方式

通过以下实施例对本发明进行具体说明，但这些实施例不作为对本发明的限制。

实施例1：D747菌株的培养

D747菌株是从静岡県小笠郡菊川街的空气中分离得到的。具体说来为了分离静岡県小笠郡菊川街加茂的空气中漂浮的微生物，将加入了马铃薯—葡萄糖琼脂培养基的平板培养基，取下盖放置10分钟与空气接触。将其在27℃下培养3天，分离所形成的菌落。将所分离的菌落在马铃薯—葡萄糖液体培养基中振荡培养，发现了有对植物病害菌起作用的菌株，分离得到D747菌株。

将分离的D747菌株在含有葡萄糖1%、可溶性淀粉2%、聚脲0.5%、干酵母1%、脱脂大豆1%、 KH_2PO_4 0.2%、NaCl 0.2%、碳酸钙0.3%、pH6.0的培养基中，27℃下、120rpm振荡培养3天后，离心收集菌体（10,000×g、15分钟），在无菌水中悬浮，洗去培养基成分。上述操作重复2次后以约 $10^9/\text{ml}$ 浓度悬浮在无菌水中。

实施例2：稻瘟病的防除效果试验

在每个直径7.5cm的素烧钵中各撒播10粒稻种（品种：爱知旭），在温室中培养。向第4叶展开的稻中散布10ml/钵由上述实施例1中所得的D747悬浮液，风干后，将稻瘟病菌（*Pyricularia oryzae*）的孢子悬浮液以喷雾方式接种，在湿室内管理。接种5日后，检查第4叶中的病斑数，其发病程度以下表1中的标准进行评价。实验结果如表2所示。

评价

A	未确认发病
B	不到未处理的发病程度的20%
C	在未处理的发病程度的20%或更多但不足50%
D	在未处理的发病程度的50%或以上

实施例3 稻纹枯病的防除效果实验

在每个直径6.0cm的素烧钵中各撒播10粒稻种（品种：金南风），在温室中培养。向第2~3叶期的稻中散布10ml/钵由上述实施例1中所得的D747菌株的悬浮液，风干后，将稻纹枯病菌（*Thanatephor us cucumeris*）接种，在温室内管理。接种5日后，检查病斑数，其发病程度以下表1中的标准进行评价。实验结果如表2所示。

实施例4：颖枯壳针孢病的防除效果实验

在每个直径6.0cm的塑料钵中各撒播10粒小麦种（品种：农林61号）在温室中

培养。向第2叶展开的小麦中散布10ml/钵由上述实施例1中所得的D747菌株的悬浮液，风干后，接种颖枯壳针孢病（*Septoria nodorum*）的柄孢子，在温室内管理。检查接种10日后的钵内第1叶的发病面积，其发病程度以下表1中的标准进行评价。实验结果如表2所示。

实施例5：禾白粉菌防除效果实验

在每个直径6.0cm的塑料钵中各撒播10粒小麦种（品种：农林61号）在温室中培养。向1.5~2叶期的小麦中散布10ml/钵由上述实施例1中所得的D747菌株的悬浮液，风干后，接种禾白粉菌（*Erysiphe graminis*）的分生孢子，在温室内的实验台上放置到进行检查，温室内管理。检查接种10日后的钵内全部的第1叶的发病面积，其发病程度以下表1中的标准进行评价。实验结果如表2所示。

实施例6 灰葡萄孢病防除效果实验

在每个直径6.0cm的塑料钵中各撒播4粒黄瓜种子（品种：相模半白）在温室中培养。向展开子叶的黄瓜幼苗中散布相当于10ml/钵由上述实施例1中所得的D747菌株的悬浮液，风干后，用浸润了灰葡萄孢病菌（*Botrytis cinerea*）的孢子悬浮液的纸碟在黄瓜子叶表面着床接种，20℃下湿室内管理。检查接种3日后的子叶的发病面积，其发病程度以下表1中的标准进行评价。实验结果如表2所示。

实施例7 古巴假霜霉病防除效果实验

在每个直径6.0cm的塑料钵中各撒播4粒黄瓜种子（品种：相模半白）在温室中培养。向展开子叶的黄瓜幼苗中散布10ml/钵由上述实施例1中所得的D747悬浮液，风干后，喷雾接种古巴假霜霉病菌（*Pseudoperonospora cubensis*）的游动孢子囊悬浮液，22℃下湿室内放置24小时后于温室内管理。检查接种8日后的子叶的发病面积，其发病程度以下表1中的标准进行评价。实验结果如表2所示。

表2

实施例号	实验病害	D747菌株的防除效果
2	稻瘟病	A
3	稻纹枯病	A
4	颖枯壳针孢病	A
5	禾白粉菌病	A
6	灰葡萄孢病	A
7	古巴假霜霉病	A

实施例8 稻水象甲杀虫效果实验

将30ml由实施例1所得的D747菌株的悬浊液加入容积为60ml的塑料杯中，其上漂浮3片长3cm的水稻叶片。向其上放置10只稻水象甲（*Lissorhoptus oryzophilus*）成虫，加盖25℃恒温放置。3日后记数存活成虫数。实验进行3次，按照下式（1）求得死虫率，最终的死虫率由3次实验的平均值确定。实验结果如表3所示。

$$\text{死虫率} = \{[10 - (\text{存活成虫数})] / 10\} \times 100$$

表3

	最终的死虫率(%)
用D747菌株处理	100
无处理	0

由上述表2和表3的结果可知，散布了含有本发明的D747菌株的植物病害防除剂和害虫防除剂的植物对各种植物病害或害虫都有高防除效果。

产业上应用的可能性

本发明的新菌株芽孢杆菌D747（FERM BP-8234）具有特色，对于芽孢杆菌D747，使其培养物（含有活菌体）或其培养分离的活菌体存在于根、茎、叶、种子等植物体上，或存在于栽培土壤中，可在非常广泛的范围内抑制各种植物病害的发生并进行害虫的防除，并且，散布了含有本发明的D747菌株的植物病害防除剂和害虫防除剂的植物对各种植物病害和害虫都具有高效防除效果。