

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6371288号
(P6371288)

(45) 発行日 平成30年8月15日(2018.8.15)

(24) 登録日 平成30年7月20日(2018.7.20)

(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	C 1 2 N	1/20	Z N A A
A O 1 P	5/00	(2006.01)	A O 1 P	5/00	
A O 1 P	7/04	(2006.01)	A O 1 P	7/04	
A O 1 N	63/00	(2006.01)	A O 1 N	63/00	F
A O 1 N	25/02	(2006.01)	A O 1 N	25/02	

請求項の数 23 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-532530 (P2015-532530)
 (86) (22) 出願日 平成25年6月24日 (2013.6.24)
 (65) 公表番号 特表2015-535684 (P2015-535684A)
 (43) 公表日 平成27年12月17日 (2015.12.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2013/055157
 (87) 国際公開番号 W02014/045131
 (87) 国際公開日 平成26年3月27日 (2014.3.27)
 審査請求日 平成28年6月2日 (2016.6.2)
 (31) 優先権主張番号 61/704, 801
 (32) 優先日 平成24年9月24日 (2012.9.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 13/837, 735
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013.3.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 NMI V12/001944

(73) 特許権者 515080456
 リンカーン ユニバーシティ
 ニューージーランド国, 7647, リンカーン,
 リンカーン ユニバーシティ, ポスト
 オフィス ボックス 84
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物防除組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

コナガ (*Plutella xylostella*) 及び1つ以上の蚊種に対する殺虫活性を有する、単離されたブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) 株であって、ブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) 株 NMI No. V12/001946、ブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) 株 NMI No. V12/001945、及びブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) 株 NMI No. V12/001944 からなる群から選択される、単離されたブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) 株。

10

【請求項2】

前記蚊種が、クレックス・ブレビギランス (*Culex pervigilans*) 及びオピフェックス・フスクス (*Opifex fuscus*) からなる群から選択される、請求項1に記載の単離されたブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) 株。

【請求項3】

生物学的に純粋な培養物の形態である、請求項1又は2のいずれか1項に記載の単離されたブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) 株。

20

【請求項 4】

ブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) 株 NMI No. V12/001946 の生物学的に純粋な培養物。

【請求項 5】

ブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) 株 NMI No. V12/001945 の生物学的に純粋な培養物。

【請求項 6】

ブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) 株 NMI No. V12/001944 の生物学的に純粋な培養物。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の 1 つ以上の *B. laterosporus* 株、又は請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の 1 つ以上の培養物、及び農業的に許容される担体含有する組成物。

10

【請求項 8】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の 2 つ又は 3 つの *B. laterosporus* 株、又は請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の 2 つ又は 3 つの培養物を含有する、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

殺虫組成物である、請求項 7 又は 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

1 つ以上の害虫を防除する方法であって、請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物、又は請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の 1 つ以上の *B. laterosporus* 株、又は請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の 1 つ以上の培養物を、1 つ以上の害虫に接触させる工程を含む、当該方法。

20

【請求項 11】

前記 1 つ以上の害虫が昆虫である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 1 つ以上の昆虫である害虫が、鱗翅目種及び双翅目種から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 1 つ以上の昆虫が鱗翅目種である、請求項 11 又は 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 14】

前記鱗翅目がトルトリシダエ (*Tortricidae*) 又はプルテリダエ (*Plutellidae*) である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記鱗翅目種がコナガ (*Plutella xylostella*) 及びキャベツルーパーモス (*Trichoplusia ni*) からなる群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記鱗翅目種が、コドリンガ (*Cydia pomonella*)、コモンフォレストルーパーモス (*Pseudocoremia suavis*)、コットンボールワームモス (*Helicoverpa armigera*)、ライトブラウンアップルモス (*Epiphyas postvittana*)、ブラックレグドリーフローラーモス (*Platanotortrix notophaea*)、及びブラックライアリーフローラーモス (*Cnephasia jactatana*) からなる群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

40

【請求項 17】

前記双翅目種が蚊種である請求項 12 に記載の方法。

【請求項 18】

50

前記蚊種が、クレックス・プレビギランス (*Culex pervigilans*) 及びオピフェクス・フスクス (*Opihex fuscus*) からなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記害虫が線形動物である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 20】

前記線形動物がマイクロワームである、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記マイクロワームがパナグレルス・レディビブス (*Panagrellus redivivus*) である、請求項 20 に記載の方法。

10

【請求項 22】

前記害虫がカリバチである、請求項 10 又は 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記カリバチがベスプラ・ブルガリス (*Vesputula vulgaris*) である、請求項 22 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) の新規株及びこれを含む組成物に関する。また、当該株及び組成物を使用したコナガ及び蚊を含む害虫の生物学的防除の方法も提供される。

20

【背景技術】

【0002】

害虫は、現代の農業において、顕著な経済的支出を強いるものである。現行の農業システムは、広大な領域に渡り 1 つの又は幾つかの作物又は植物種を生育することを要する。そのような生態学的にアンバランスな系は、害虫による被害を受けやすい。

【0003】

幾つかの害虫は、ヒトを含む動物の健康に対しても有害である。例えば、蚊は様々な疾病を運搬することが知られている。従って、それらは、疾病の蔓延における運搬体として作用する。

30

【0004】

伝統的に、害虫の防除は、化学的な殺昆虫剤や殺虫剤を使用して行われてきた。しかしながら、消費者は、化学的残留物やそれらの動物及び植物の健康並びに環境に対する影響について注目するようになってきている。更に、多くの害虫が、殺虫剤や殺昆虫剤に対する耐性を獲得しつつある。

【0005】

生物学的防除は、化学物質に対する依存を減少させる、害虫防除の代替的手段を提供する。そのような「天然の」方法は、公衆に受け入れられやすく、化学的防除方法よりも有効で持続する場合がある。

【0006】

細菌、酵母及び真菌を含む幅広い範囲の生物学的防除剤が、害虫防除への使用を検討されている。殺昆虫剤として使用される細菌として広く研究されている種は、バチルス (*Bacillus*) である。

40

【0007】

バチルス属は、動物や植物の健康に対して有害なものや、昆虫の防除に有用なもの等、様々な性質を有する広範な細菌種を含んでいる。

【0008】

特に、バチルス・ツリンギエンシス (*Bacillus thuringiensis*) (Bt) は、Thuricide (登録商標) や Dipel (登録商標) 等の製品として市販されている、周知の生物学的防除剤である。

50

【 0 0 0 9 】

近年、Btに対する耐性を持った害虫が出現している。例えばTabashnik et al (1990); Baxter et al (2011);及びTabashnik et al (1998)を参照されたい。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

従って、昆虫を含む害虫の防除に使用される新規バチルス種の需要は尚も存在する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

出願人は、生物防除剤として有効な多くの新規ブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) を同定した。 10

【 0 0 1 2 】

本発明の一つの目的は、生物防除剤として有用な新規B. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株を提供することである。他の目的は、本発明の新規B. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) の1つ以上を含有する組成物を提供すること；及び/又は少なくとも公衆に対して有用な選択肢を提供することである。

【 0 0 1 3 】

本発明の一つの側面において、1つ以上の鱗翅目種及び1つ以上の双翅目種に対する殺虫活性を有する、単離されたブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) 株が提供される。 20

【 0 0 1 4 】

一つの態様において、前記1つ以上の鱗翅目種が、コナガ (*Plutella xylostella*) である。

【 0 0 1 5 】

一つの態様において、前記1つ以上の鱗翅目種が、キャベツルーパーモス (*Trichoplusia ni*) である。

【 0 0 1 6 】

一つの態様において、前記鱗翅目種が、ハマキガ科 (*Tortricidae*) 及びコナガ科 (*Plutellidae*) からなる群から選択される。

【 0 0 1 7 】

更なる態様において、前記双翅目種が蚊種である。 30

【 0 0 1 8 】

更なる態様において、前記蚊種が、クレックス・プレビギランス (*Culex pervigilans*) 及びオピフェックス・フスクス (*Opifex fuscus*) からなる群から選択される。

【 0 0 1 9 】

更なる態様において、前記B. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株は、1つ以上のコナガ (*Plutella xylostella*) 及びクレックス・プレビギランス (*Culex pervigilans*) 及びオピフェックス・フスクス (*Opifex fuscus*) から選択される1つ以上の蚊種に対する殺虫活性を有する。 40

【 0 0 2 0 】

一つの態様において、前記B. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株は、生物学的に純粋な培養物の形態である。

【 0 0 2 1 】

前記単離されたB. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株又は生物学的に純粋な培養物は、NMI No. V12/001946、NMI No. V12/001945及びNMI No. V12/001944から選択される株であってもよい。

【 0 0 2 2 】

一つの側面において、本発明は、ブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) 株NMI No. V12/001946の生物学的に純粋な培養物を提供する。

【 0 0 2 3 】

更なる側面において、本発明は、ブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) 株NMI No. V12/001945の生物学的に純粋な培養物を提供する。

【0024】

更なる側面において、本発明は、ブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) 株NMI No. V12/001944の生物学的に純粋な培養物を提供する。

【0025】

他の側面において、本発明は、本発明の1つ以上のB. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株及び農業的に許容される担体を含有する組成物を提供する。

【0026】

一つの側面において、本発明は、NMI No. V12/001946, NMI No. V12/001945及びNMI No. V12/001944から選択されるB. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株、並びに農業的に許容される担体を含有する組成物を提供する。

10

【0027】

一つの態様において、前記組成物は、本発明の2つのB. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株を含有してもよい。他の側面において、前記組成物は、本発明の3つのB. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株を含有してもよい。

【0028】

一つの側面において、前記組成物は、NMI No. V12/001946, NMI No. V12/001945及びNMI No. V12/001944から選択される1つ以上のB. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株、並びに農業的に許容される担体から本質的に構成される。

20

【0029】

一つの態様において、前記組成物は、本発明の2つのB. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株、並びに農業的に許容される担体から本質的に構成される。他の態様において、前記組成物は、本発明の2つのB. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株から本質的に構成される。

【0030】

一つの態様における組成物は、殺虫組成物である。

【0031】

他の側面において、本発明は、1つ以上の害虫を防除する方法を提供し、当該方法は、1つ以上の本発明の組成物を、1つ以上の害虫に接触させる工程を含む。

30

【0032】

他の側面において、本発明は、1つ以上の害虫を防除する方法を提供し、当該方法は、1つ以上の本発明のB. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株を、1つ以上の害虫に接触させる工程を含む。

【0033】

好ましくは、前記1つ以上の害虫は、昆虫の害虫であり、より好ましくは、当該1つ以上の害虫は、鱗翅目及び双翅目から選択される。

【0034】

本発明の方法における、本発明の株又は組成物の施用は、2種類以上の害虫を防除する場合もある。

40

【0035】

従って、更なる態様において、前記1つ以上の害虫は、鱗翅目、双翅目又はそれらの両方から選択される、昆虫の害虫である。

【0036】

一つの態様において、前記1つ以上の昆虫の害虫は、コナガ及び蚊から選択される昆虫の害虫である。

【0037】

更なる態様において、前記1つ以上の昆虫の害虫は、コナガ、蚊、又はそれらの両方から選択される昆虫の害虫である。

【0038】

50

一つの態様において、前記鱗翅目は、トルトリシダエ (*Tortricidae*)、プルテリダエ (*Plutellidae*) 及びノクツイダエ (*Noctuidae*) から選択される。特定の態様において、前記鱗翅目は、トルトリシダエ (*Tortricidae*) 及びプルテリダエ (*Plutellidae*) から選択される。

【0039】

他の態様において、前記1つ以上の昆虫の害虫は、蛾である。一つの態様における蛾は、コナガ (*Plutella xylostella*)、キャベツルーパーモス (*Trichoplusia ni*)、コドリング (*Cydia pomonella*)、コモnfオレストルーパーモス (*Pseudocoremia suavis*)、コットンボールワームモス (*Helicoverpa armigera*)、ライトブラウンアップルモス (*Epiphyas postvittana*)、ブラックレグドリーフローラーモス (*Planotortrix notophaea*)、及びブラック

10

【0040】

他の態様において、前記害虫は、線形動物である。特定の態様において、前記線形動物は、マイクロワームである。好ましくは、前記マイクロワームは、パナグレルス・レディビプス (*Panagrellus redivivus*) である。

【0041】

他の態様において、前記昆虫の害虫はカリバチである。特定の態様において、前記カリバチは、ベスプラ・ブルガリス (*Vespula vulgaris*) である。

【0042】

他の態様において、前記昆虫の害虫は、マヌカビートル (ピロンタ sp.) である。

20

【0043】

定義

本明細書中、「殺虫剤」という用語は、虫の死滅又は増殖の抑制に作用する薬剤を指す。

【0044】

本明細書中、「接触」という用語は、害虫の防除に硬化を発揮するように、害虫に対して本発明の組成物又は株を提供することを指す。最も通常の接触は、本発明の組成物又は株を含有する材料を害虫に摂食させることを含み得るが、これに限定されない。従って、「接触」は、摂食を含む。

30

【0045】

本明細書中、「防除」、「防除すること」、「生物防除」又は「生物学的防除」は、害虫、特に昆虫の害虫の数を、本発明の株又は組成物を使用することによって減少させることを指す。一般的に想定されることは、数の減少、又は害虫の根絶、又はそれらの繁殖速度を低下させることである。

【0046】

本明細書中、「含む」とは、「少なくとも一部を構成する」ことを意味する。本明細書中で、用語「含む」を含む各文言を解釈するとき、当該用語に隣接するもの以外の特徴も存在し得る。これに関連する「含有する」、「包含する」等の用語も同様に解釈されるべきである。

40

【0047】

本明細書中、用語「本質的に構成される」とは、言及されるものの他に、当該ものの基本的な特徴を物質的に変化させない他のものの存在を許容することを指す。

【0048】

用語「農業的に許容される担体」は、水及び油、又は助剤、分散剤、接着剤、湿潤剤 (*wettant*)、界面活性剤、保湿剤、粘着付与剤等の、殺虫組成物を含む防除組成物の調製に使用されることが当初から知られている、当該技術分野で公知の全ての液体及び固体の担体を包含する。

【0049】

本明細書中、用語「有効量」は、害虫、特に昆虫の害虫を防除又は根絶するのに有効な

50

量を意味する。

【 0 0 5 0 】

本明細書中、「生物学的に純粋な培養物」又は「生物学的に純粋な単離物」は、90%以上、好ましくは95%以上、好ましくは99%以上、より好ましくは99%以上の*B. ラテロスポルス* (*B. laterosporus*) 株を含有する、本発明の*B. ラテロスポルス* (*B. laterosporus*) 株の培養物を指す。

【 0 0 5 1 】

本明細書中、「害虫」は、ヒトに対して都合の悪い生物を意味する。一つの態様において、当該用語は、ヒトを含む動物、又は植物に対して被害を及ぼす生物を意味する。被害とは、動物又は植物の健康、成長、収量、繁殖又は生存率に関するものであってもよく、外観上の被害であってもよい。好ましくは、被害とは、商業的重要性に関するものである。好ましい態様において、「害虫」とは、植物に対して被害を及ぼす生物を意味する。好ましくは、植物とは、栽培植物である。

10

【 0 0 5 2 】

一つの側面において、本発明は、昆虫、特に鱗翅目及び双翅目を含む害虫を含む害虫に対して活性を有する*ブレビパチルス・ラテロスポルス* (*Brevibacillus laterosporus*) 株に関する。

【 0 0 5 3 】

ブレビパチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) は、幾つかの昆虫種に対して病原性が知られている、嫌気性の孢子を形成する昆虫病原性細菌である。*パチルス・ツリンギエンシス* (*thuringiensis*) と同様に、*B. ラテロスポルス* (*B. laterosporus*) は、孢子嚢が溶解した後に孢子の一端に形成される典型的なカヌー状パラスポラルボディ (CSPB) が形成されることを特徴とする。

20

【 0 0 5 4 】

ブレビパチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) は、寄生性の線形動物 (Bone and Singer, 1991; Huang et al., 2005; Singer, 1996)、軟体動物、鞘翅目 (Boets et al., 2004; Schnepf et al., 2003; Singer, 1996; Singer et al., 1997)、双翅目 (Favret and Yousten, 1985; Rivers et al., 1991)、及び鱗翅目のアンチカルシア・ゲムマタリス (*Anticarsia gemmatalis*) (De Oliveira et al., 2004) の卵や幼虫に対する病原性を有するものとして記録されている。様々な*B. ラテロスポルス* (*B. laterosporus*) 株において、様々な毒性因子が記録されている (Favret and Yousten, 1985; Rivers et al., 1991; Zahner et al., 1999)。

30

【 0 0 5 5 】

B. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) の傷害活性とその孢子及び結晶との協調は、ネッタイシマカのアエデス・アエギプティ (*Aedes aegypti*) を含む双翅目の幼虫に対するバイオアッセイにおいて、Orlova et al. (1998) により最初に実証された。この蚊は、黄熱病や、デング熱及びチクングンヤ熱等の他の疾患の媒体と見なされている。ブヨ (*Simulium vittatum*); 蚊 (*Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*) (Favret and Yousten, 1985; Rivers et al., 1991); 及びウマアブ (*Musca domestica* (Ruiu et al. 2006)) の幼虫に対する活性も報告されている (EP2,079,314)。

40

【 0 0 5 6 】

鞘翅目に対する*B. ラテロスポルス* (*B. laterosporus*) の活性は、最初に、予備的なバイオアッセイにおいて報告された。当該鞘翅目は、タバコシバンムシのラシオデルマ・セリコルネ (*Lasioderma serricorne*) 及びコロラドハムシのレプチノタルサ・デケムリネアタ (*Leptinotarsa decemlineata*) を含む (Rivers et al., 1991)。様々な*B. ラテロスポルス* (*B. laterosporus*) 株の、コーンルートワームのジアブラティカ (*Diabrotica*) 類に対する活性が報告されている (Aronson et al., 1991; Schnepf et al., 2002; Boets et al., 2011)。コーンルートワームは、トウモロコシ作物の主要な農業的害虫である。

【 0 0 5 7 】

De Oliveira et al. (2004) は、穀物の被害に関連する害虫であるメキシカンコットン

50

ボールウィービルのアントノムス・グランディス (*Anthonomus grandis*) に対する高い毒性を報告した。ベルベットピーンキャタピラーのアンチカルシア・ゲムマタリス (*Anticarsia gemmatalis*) に対する鱗翅目活性も、同一の研究において報告された。

【 0 0 5 8 】

しかしながら、現在までに、双翅目及び鱗翅目の両方に対する株の活性を議論する報告は存在しない。Rivers et al. (1991)は、芋虫、蚊及び鞘翅目(コロラドハムシ)に対して28種類の株をスクリーニングしたが、芋虫に対する活性は見られず、他の2つの群に対する活性が見られた。Favret及びYousten (1985)も、蚊に対する活性を確認したが、鱗翅目に対する活性は見出さなかった。

【 0 0 5 9 】

驚くべきことに、出願人は、幾つかの鱗翅目及び双翅目の両方を含む様々な昆虫の害虫に対して活性を有するブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) の株を同定した。特に、ブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) の3つの株が、アブラナの種子及びニュージーランドの土壌から単離された。スクリーニングアッセイは、3つの株のいずれも、コナガの幼虫(*Plutella xylostella*)及び蚊の幼虫(クレックス・ペルビギランス (*Culex pervigilans*) 及びオピフェックス・フスクス (*Opifex fuscus*))の両方に対する活性を有することを示した。

【 0 0 6 0 】

これらの3つの新しいブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) 株は、いずれも、特許手続のためのブダペスト条約に従い、2012年12月に、National Measurement Institute Laboratories (NMI), Suakin Street, Pymble, New South Wales に寄託された。当該単離物は、それぞれ受託番号NMI No. V12/001946、NMI No. V12/001945及びNMI No. V12/001944として記録された。

【 0 0 6 1 】

当該単離物を取得するのに採用された単離及び選択プロセスは、実施例に記載する。本発明のB. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) の形態的及び生理的特徴は、実施例3に示す。

【 0 0 6 2 】

出願人は、B. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株NMI No. V12/001946、NMI No. V12/001945及びNMI No. V12/001944を、単離された形態で初めて提供する者である。

【 0 0 6 3 】

一つの態様において、本発明は、B. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) NMI No. V12/001946を提供する。

【 0 0 6 4 】

他の態様において、本発明は、B. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) NMI No. V12/001945を提供する。

【 0 0 6 5 】

他の態様において、本発明は、B. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) NMI No. V12/001944を提供する。

【 0 0 6 6 】

一つの態様において、本発明のB. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株が単離される。好ましくは、当該株は、生物学的に純粋な培養物の形態で単離される。

【 0 0 6 7 】

本発明の株は、幾つかの鱗翅目及び双翅目の両方を含む広範な昆虫の害虫に対する殺虫剤活性を示した。3つの株のいずれも、殺虫活性が初めて示されたものである。より好ましくは、これらの株のいずれも、コナガ及び蚊の両方に対して活性を有する。

【 0 0 6 8 】

NMI No. V12/001946株の殺虫活性は：コドリガ(*Cydia pomonella*)、コモンフォレストルーパーモス(*Pseudocoremia suavis*)、コットンボールワームモス(*Helicoverpa armigera*)、ブラックライアリーフローラーモス(*Cnephasia jactatana*)、ブラックレグドリー

10

20

30

40

50

フローラーモス(*Planotortrix notophaea*)、ライトブラウンアップルモス(*Epiphyas postvittana*)、マヌカビートル(ピロンタ *sp.* (*Pyronta sp.*))、及びカリバチ(ベスプラ・ブルガリス(*Vespula vulgaris*))を含む、他の広範な昆虫の害虫に対しても示されている。

【0069】

キャベツルーパーモス(*Trichoplusia ni*)に対するNMI No's V12/001944及びV12/001945株の活性も実証された。

【0070】

NMI No. V12/001944株は、コトリンガ(*Cydia pomonella*)に対しても活性を有する。

【0071】

NMI No. V12/001944及びNMI No. V12/001946は、線形動物のマイクロワーム(*Panagrellus redivivus*)に対しても活性が示された。

【0072】

本発明の株は、レピドプテラ・トルトリシダエ(*Lepidoptera Tortricidae*)及びレピドプテラ・プルテリダエ(*Lepidoptera Plutellidae*)の科に対する特定の用途を有し得る。レピドプテラ・ノクツイダエ(*Lepidoptera Noctuidae*)に対しても、一定の活性が示されている。

【0073】

上記昆虫の害虫は、植物及び動物の両方の健康における広範な問題を引き起こす重大な問題となるものである。特に蛾の類は、農業及び園芸作物における顕著な経済的損失の原因となる。例えば、現在、コナガ(DBM)の防除のために世界で10億ドルが消費されている。

【0074】

蚊の防除には、年間4億ドル以上が費やされている。

【0075】

一つの態様において、本発明の単離された株は、1つ以上の鱗翅目の種、及び1つ以上の双翅目の種に対する殺虫剤活性を有する。

【0076】

一つの態様において、前記鱗翅目の種は、トルトリシダエ(*Tortricidae*)、プルテリダエ(*Plutellidae*)、ノクツイダエ(*Noctuidae*)及びゲオメトリダエ(*Geometridae*)から選択される科である。

【0077】

好ましいトルトリシダエ種は、コドリンガ(*Cydia pomonella*)、ライトブラウンアップルモス(*Epiphyas postvittana*)、ブラックレグドリーフローラーモス(*Planotortrix notophaea*)及びブラックライアリーフローラーモス(*Cnephasia jactatana*)を含む。

【0078】

好ましいプルテリダエ種は、コナガ(*Plutella xyostella*)を含む。

【0079】

好ましいノクツイダエ種は、キャベツルーパーモス(*Trichoplusia ni*)及びコットンボールワームモス(*Helicoverpa armigera*)を含む。

【0080】

好ましいゲオメトリダエ種は、コモンフォレストルーパー(*Pseudocoremia suavis*)である。

【0081】

一つの態様において、双翅目の種は、蚊科のものである。

【0082】

好ましい蚊の種は、オピフェックス・フスクス(*Opifex fuscus*)及びクレックス・プレビギランス(*Culex pervigilans*)を含む。

【0083】

また、本発明は、1つ以上の本発明のB. ラテロスポルス(*B. laterosporus*)株及び農

10

20

30

40

50

業的に許容される担体を含有する組成物も提供する。

【0084】

一つの態様において、本発明は、

- (a) B. ラテロスポルス (B. laterosporus) NMI No. V12/001946
- (b) B. ラテロスポルス (B. laterosporus) NMI No. V12/001945
- (c) B. ラテロスポルス (B. laterosporus) NMI No. V12/001944

から選択される1つ以上のB. ラテロスポルス (B. laterosporus) 株、及び農業的に許容される担体又は助剤を含有する組成物を提供する。

【0085】

当該組成物は、2つ以上の本発明のB. ラテロスポルス (B. laterosporus) 株の組み合わせを含有してもよい。当該組み合わせとは、(a) 及び (b)、(a) 及び (c) 又は (b) 及び (c) である。一つの態様において、当該組成物は、本発明の3つの株を全て含有してもよい。

10

【0086】

本発明の株は、目的の害虫を防除するのに有効な量で、前記組成物中に存在する。当該有効濃度は、B. ラテロスポルス (B. laterosporus) が使用される形態、前記組成物が施用される環境、蔓延する害虫の種類、密度及び程度；温度；季節；湿度；植物が生長する季節における段階；植物の生長度；施用の方法、速度及び頻度；施用されている公知の殺真菌剤や殺虫剤の数及び種類、及び植物の処理（例えば剪定、放牧及び灌漑）に依存して変化し得る。全ての要素が、前記組成物の製剤化において考慮され得る。

20

【0087】

本発明の組成物は、1つ以上の本発明の毒素を生産するB. ラテロスポルス (B. laterosporus) 株と所望の農業的担体とを混合することにより生産されてもよい。

【0088】

典型的には、前記生産物は、噴霧用に製剤化された、孢子及び結晶を分離していない、B. ラテロスポルス (B. laterosporus) の発酵材料を含有してもよい。発酵材料は、2日以上、典型的には4日経過したものを使用し得る。前記組成物におけるB. ラテロスポルス (B. laterosporus) は、細胞懸濁物として、所望の農業的担体を用いて製剤化される。当該細胞は、直接、又は孢子若しくは結晶を介して、殺虫性の毒素を生産する。

30

【0089】

B. ラテロスポルス (B. laterosporus) の典型的な濃度範囲は、無傷の細胞の形態で前記組成物中に存在する場合、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{14}$ 、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$ 、より好ましくは $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ cells/mg である。細胞濃度が $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{14}$ のオーダーの組成物が調製され、必要に応じて施用前に希釈されるのが好ましい。

【0090】

B. ラテロスポルス (B. laterosporus) は、当該技術分野で公知の標準的な乾燥及び発酵技術を使用して前記組成物における使用のために調製され得る。増殖は、増殖に適した温度及びpHの培養槽中、好気条件下で実施される。典型的な増殖温度は15～37、通常は27～32 である。

【0091】

増殖培地は、B. ラテロスポルス (B. laterosporus) 培養に適した任意の公知の培地であつてもよい。例えば、Nutrient Yeast Extract Salt Medium (NYSM) (Favret, and Youstein 1985) が用いられる。

40

【0092】

前記株は、公知の洗浄、濾過、又は遠心分離等の沈降技術を使用して回収されてもよく、又はサイクロン系を使用して回収されてもよい。回収された細胞は、直ちに使用されてもよく、又は低音条件下（例えば4℃）で保存されてもよく、又は凍結乾燥されてもよい。好ましくは細胞は回収直後に使用されるべきである。

【0093】

また、前記細胞は、活性細胞抽出物、細胞懸濁物、細胞ホモジネート、細胞溶解物、細

50

胞上澄、細胞濾過物、細胞ペレットを生産するために使用される前に処理されてもよく、又は全形の細胞の調製品として使用されてもよい。

【0094】

本発明の組成物は、保湿剤、拡散剤、粘着付与剤、界面活性剤、安定化剤、浸透剤、乳化剤、分散剤、界面活性剤、緩衝剤、接着剤及び殺虫又は防除組成物の分野で典型的に採用される他の成分を含有してもよい。

【0095】

本発明の組成物は液体であっても固体であってもよく、液体組成物は典型的には水、生理食塩水又は植物油や鉱物油等の油を含有する。本発明で使用出来る植物油の例は、大豆油及びココナッツ油である。

10

【0096】

前記組成物は、噴霧、懸濁、濃縮、泡塊、灌注(drench)、スラリー、注射、ゲル、浸漬、ペースト等の形態であってもよい。液体組成物は、*B. ラテロスポルス* (*B. laterosporus*) 細胞と液体の農業的に許容される担体とを混合することにより調製されてもよい。液体組成物を生産するために、公知の製剤技術が使用され得る。

【0097】

一つの態様において、前記組成物は固体の形態である。当該組成物は、本発明の液体組成物を乾燥させることにより生産されてもよい。あるいは、本発明で使用される固体組成物は、本発明の*B. ラテロスポルス* (*B. laterosporus*) 細胞と、様々な無機又は生物材料とを混合することにより調製されてもよい。例えば、固体の無機的な農業的担体は、炭酸塩、硫酸塩、リン酸塩、ケイ酸塩、軽石、石灰、ベントナイト、又はそれらの組み合わせを含んでもよい。固体の生物材料は、粉末化したパーム外皮、トウモロコシの軸や鞘、及びナッツの殻を含んでもよい。

20

【0098】

前記組成物は、粉塵、顆粒、種子コーティング、水和粉末等として製剤化されてもよい。当該組成物は、施用の際液体組成物を提供するように製剤化されてもよい。

【0099】

本発明の組成物は、調整放出、又は持続放出製剤の形態であってもよい。

【0100】

本発明の組成物は、殺虫剤、殺昆虫剤、殺真菌剤、殺線虫剤、殺ウイルス剤、増殖促進剤、栄養剤、発芽促進剤等の他の制御剤を、本発明の*B. ラテロスポルス* (*B. laterosporus*) 株の機能に適合するものである限り、含有してもよい。

30

【0101】

本発明の株が直接使用される場合、上記で議論した株、調製及び適用の組み合わせと同様のものが適用される。

【0102】

他の側面において、本発明は、害虫を防除する方法を提供し、当該方法は、本発明の組成物を害虫に接触させることを含む。

【0103】

他の態様において、本発明は、害虫を防除する方法を提供し、当該方法は、本発明の1つ以上の*B. ラテロスポルス* (*B. laterosporus*) 株を害虫に接触させることを含む。

40

【0104】

一つの態様において、本発明の方法により防除される害虫は、昆虫及び線形動物から選択される。

【0105】

線形動物として好ましくはマイクロワームを含む。好ましいマイクロワームは、パナグレルス・レジピブス (*Panagrellus redivivus*) である。

【0106】

一つの態様において、前記害虫は昆虫である。

【0107】

50

一つの態様において、前記昆虫は、鱗翅目、双翅目、膜翅目及び鞘翅目からなる群から選択される。

【0108】

一つの態様において、前記鱗翅目は、トルトリシダエ (*Tortricidae*)、プルテリダエ (*Plutellidae*)、ノクツイダエ (*Noctuidae*) 及びゲオメトリダエ (*Geometridae*) から選択される科である。

【0109】

好ましいトルトリシダエ種は、コドリンガ (*Cydia pomonella*)、ライトブラウンアップルモス (*Epiphyas postvittana*)、ブラックレグドリーフローラーモス (*Planotortrix notophaea*) 及びブラックライアリーフローラーモス (*Cnephasia jactatana*) を含む。

10

【0110】

好ましいプルテリダエ種は、コナガ (*Plutella xyostella*) である。

【0111】

好ましいノクツイダエ種は、キャベツルーパーモス (*Trichoplusia ni*) 及びコットンボールワームモス (*Helicoverpa armigera*) を含む。

【0112】

好ましいゲオメトリダエ種は、コモンフォレストルーパー (*Pseudocoremia suavis*) である。

【0113】

一つの態様において、双翅目の種は、蚊科のものである。

20

【0114】

好ましい蚊の種は、オピフェックス・フスクス (*Opifex fuscus*) 及びクレックス・プレビギランス (*Culex pervigilans*) を含む。

【0115】

一つの態様において、膜翅目の種は、スズメバチ科のものである。

【0116】

好ましいスズメバチ科の種は、カリバチ (*Vespula vulgaris*) である。

【0117】

一つの態様において、鞘翅目の種は、コガネムシ科から選択される。

【0118】

好ましいコガネムシ科の種は、マヌカビートル (*Pyrronta* sp) である。好ましいピロンタ種は、ピロンタ・フェスティバ (*Pyrronta festiva*) である。

30

【0119】

一つの態様において、本発明の組成物又は株は、害虫に直接施用される。例えば、噴霧、浸漬、散布等により施用される。

【0120】

他の態様において、本発明の組成物又は株は、害虫の存在する環境、典型的には保護される植物又は動物、設備、土壌又は大気に施用される。利用可能な施用技術として、噴霧、粉塵、浸漬、種子コーティング、葉上噴霧、ミスト、エアロゾル、及び燻蒸が挙げられる。

40

【0121】

一つの態様において、本発明の組成物又は株は、植物又は動物の典型的には表面に、又は害虫が摂食する部分に施用される。

【0122】

施用は、1回だけ、又は必要に応じて反復して実施され得る。植物の生活環における複数の異なる時点での施用も想定される。例えば、害虫による収穫後の被害を予防し、又は最小にするため、収穫時に施用される。

【0123】

より一般的には、本発明の組成物又は株は、苗の時に、及び周期的に植物に施用され、施用率は、 $10^{10} \sim 10^{14}$ 孢子/ヘクタール、好ましくは $10^{12} \sim 10^{13}$ 孢子/ヘクタールであ

50

る。

【0124】

典型的な施用率は、50g/ヘクタール～10,000g/ヘクタールであってもよい。通常は100g/ヘクタール～5,000g/ヘクタール、又は500～1500g/ヘクタールである。

【0125】

本発明の組成物を使用して、様々な植物が処理されてもよい。そのような植物として、穀物、野菜及び耕地作物、芝生 (grasses、lawns)、牧草、果樹並びに観葉樹及び植物が挙げられる。

【0126】

本発明の組成物及び株の使用によって特に利益を受ける耕地植物として、アブラナ科の植物 (crucifers及びbrassicas) が挙げられる。例えば、キャベツ、ブロッコリー、カリフラワー、芽キャベツ及びチンゲン菜である。

【0127】

施用のために製剤化されるとき、本発明の組成物は、典型的には、製剤中に、1～99重量%、5～95重量%、10～90重量%、15～85重量%、20～80重量%、30～70重量%、又は40～60重量%の濃度で存在してもよい。

【0128】

添付した図面を参照して、本発明が記述される。

【図面の簡単な説明】

【0129】

【図1】図1は、宿主域の研究において使用されたバイオアッセイの図表示を示す。

【図2】図2は、ライトブラウンアップルモスのアッセイの図表示を示す。

【図3】図3は、*B. ラテロスポルス* (*B. laterosporus*) 株NMI No. V12/0001946、NMI No. V12/0001945及びNMI No. V12/0001944；並びにイタリアの*B. ラテロスポルス* (*B. laterosporus*) NCIMB41419、並びにエルウィニア *sp.* (*Erwinia sp.*) (ICMP)株の、コナガ幼虫に対する活性の比較を示す一連のグラフを示す (n=10, 22)。

【図4】図4は、蚊のクレックス・ペルビギランス (*Culex pervigilans*) 及びオピフェックス・フスクス (*Opifex fuscus*) に対する*B. ラテロスポルス* (*B. laterosporus*) 株NMI No. V12/001946の活性を示す棒グラフを示す。処理は、単離NMI No. V12/001946 = 10 ml 中500 µl、NMI No. V12/001946 = 10 ml 中50 µl 及びNMI No. V12/001946 (1821-2) = 10 ml 中5 µl (500 ppm) である。

【図5】図5は、各蚊の幼虫に対して1 mlの水当たり、NMI No. V12/001946、NMI No. V12/001945及びNMI No. V12/001944、ICMP又はNCIMB41419の細菌懸濁物20 µlを施用した、クレックス・ペルビギランス蚊の死亡率を示す棒グラフを示す。各希釈において12匹の幼虫が独立して処理された。

【図6】図6は、*Bt Cry 1A*耐性 (図8A) 及び感受性 (図8B) キャベツルーパートリコプルシア・ニ (*Trichoplusia ni*) に対するNMI No. V12/001944及びV12/001945の効果を示す棒グラフを示す。

【図7】図7は、*Cry 1A*耐性プルテラ・キシロステラ (*Plutella xylostella*) (DBM) と、*Cry 1A*感受性DBMの第二齢幼虫との間のV12/001944希釈溶液に対する応答の比較を示すグラフを示す。

【図8】図8は、コドリガの幼虫に対するNMI No. V12/001944の効果を示すグラフを示す。

【図9】図9は、V12/001946及びV12/001944で処理したマイクロワームの生存率を示す棒グラフを示す。評価は、生存数において5段階の尺度である。

【図10】図10は、NMI Nos V12/001944、V12/001945及びV12/001946、並びにイタリア株NCIMB41419の各株を同定するのに使用された16S rDNA配列の多重配列アラインメントを示す。ダッシュ () は、直上の配列と同一のヌクレオチドを意味する。

【実施例】

【0130】

10

20

30

40

50

下記非限定的な実施例は、本発明を例示するために提供され、その範囲を何ら限定しない。

【0131】

実施例1 - ブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) の選択のプロセス

害虫及びアブラナ科植物の病害に対する新規生物防除剤の探索の一部として、ブロッコリー、キャベツ、コールラビ及びチンゲン菜の野菜、並びにケール、葉株 (*Leaf turnip*)、セイヨウアブラナ及びスウェードの試料植物の8種類のアブラナ科植物の36個の種ロットから、微生物が単離された。

【0132】

全部で811個の微生物が単離され、標準的な微生物培地で純粋培養された。微生物の構成は、細菌の単離物584個、真菌の単離物227個であった。

【0133】

殆どの微生物は、不滅菌の種子から生じた(84%)。バチリ (*Bacilli*) を形成する種は回収された細菌単離物の74%を占めるが、ブレビバチルス (*Brevibacillus*) 属に属する単離物は2つだけであった。

【0134】

21種類の微生物(細菌単離物が17種類、真菌が4種類)の生物活性を、切断葉アッセイを使用して、コナガ幼虫、プルテラ・キシロステラ (*Plutella xylostella*) に対して評価した。Lincoln Universityのカルチャーコレクションから細菌種2種類及び真菌6種類も、P. キシロステラに対する活性が追加でスクリーニングされた。葉の表面を細菌及び真菌の溶液で汚染し、これを幼虫に摂食させ、死亡率をモニタリングした。このスクリーニングで、1つのB. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 単離物が同定された。同一の種類の変更する単離物が、残りの単離物の中から見いだされ、同様にP. キシロステラに対してスクリーニングされ、活性が示された。

【0135】

無関係のプログラムにおいて、滅菌されたジャガイモの匍匐枝表面から、変更するB. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) の単離物が取得された。これも、葉アッセイにおいて、DBMの幼虫に対して活性を示した。これらの株は、変更する生物アッセイに供され、識別が確認された。

【0136】

実施例2 - ブレビバチルス・ラテロスポルス (*Brevibacillus laterosporus*) の単離

ニュージーランドの植物又は種子から、3種類のB. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株が単離された。Nutrient Agarの単離プレート上に形成されたコロニーを滅菌ループを使用して選択し、新しいプレートに展開して、純粋な培養物を取得した。

【0137】

NMI No. V12/001946は、South Pacific Seeds (NZ) Ltdから取得されたハイブリッドキャベツ種子から単離された。

【0138】

NMI No. V12/001945は、PGG Wrightson Seeds Ltd, New Zealandから取得されたフォレージレイプ種子から単離された。

【0139】

NMI No. V12/001944は、Southbridge, New Zealand付近の商業的農場からのジャガイモ植物 (*c v イラムハーディ (Ilam hardy)*) から単離された。

【0140】

単離手順

アブラナの種子において、種子の実滅菌の表面から細菌がNutrient Agarの表面に単離された。各コロニーを純粋培養した。

【0141】

ジャガイモ植物において、匍匐枝を熱処理(80 20分)し、表面を滅菌し(2%次亜塩

10

20

30

40

50

素酸ナトリウム中5分間)、そして組織を浸漬し、Nutrient Agar上に展開した。

【0142】

実施例3 - 形態的及び生理的同定

全ての単離物を、ブレビバチルスの特徴を検査するために、光学顕微鏡を使用して同定した。

【0143】

API 50CH (bioMerieux)を用いた生化学的特定

市販の基質利用キットAPI 50CH (bioMerieux)を説明書に従って使用して、NMI No V12/001946及びNMI No. V12/001945を更に同定した。説明書の勧めに従い、それぞれAPI 50 C 10
HB/E培地中の細菌を播種した。bioMerieuxによる同一性のチェックから、それらのデータベース上でB. ラテロスポルス (B. laterosporus) と99.9%の同一性を示した。

【0144】

形態学的特性

ブレビバチルス・ラテロスポルス (Brevibacillus laterosporus) は、好気性、グラム陽性、芽胞形成細菌であり、通性嫌気性菌でもある(Shida et al., 1996)。

【0145】

3種類のブレビバチルス・ラテロスポルス (Brevibacillus laterosporus) NMI No. V12/001946、NMI No. V12/001945及びNMI No. V12/001944は、当該種の典型である、以下の形態学的特徴を有する：3株全て最初は栄養細胞として増殖し、パラスポラルボディ (CSP 20
B)及び隣接孢子 (adjacent spore) を含有する孢子嚢を形成する。

【0146】

増殖の特性

好気性で、通性嫌気性であり；寒天上のコロニーは白黄色で、縁が不規則である。

【0147】

16s rDNA同定

16s rDNAの領域を、B. ラテロスポルス (B. laterosporus) の4つの各株のゲノム配列から取得した。ゲノムDNAを、New Zealand Genomics Ltd, Dunedin, New Zealandによりシークエンシングした。B. ラテロスポルス (B. laterosporus) からの他の16s
rDNA配列、及び抽出された全長16s rDNA遺伝子を使用してコンティグが探索され 30
、Geneious (<http://www.geneious.com/>)及びDNAMAN (Lynnon Biosoft, Canada)プログラムを使用して重ね合された。

【0148】

NMI V12/001946を特徴付けるために配列番号1を使用し；NMI V12/001945を特徴付けるために配列番号2を使用し；NMI V12/001944を特徴付けるために配列番号3を使用し；NCIMB41419を特徴付けるために配列番号4を使用した。EP 2,079,314で同定されたNCIMB41419は、NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21
9YA, Scotlandから取得されたB. ラテロスポルス (B. laterosporus) の株である。

【0149】

配列番号1～4の重ね合わせを図10に示す。この図は、各株間の配列及び特徴の違いを示す。 40

【0150】

実施例4 - バイオアッセイ手順

コナガ(Plutella xylostella) (鱗翅目：コナガ科)、モンシロチョウ (Pieris rapae) (鱗翅目：シロチョウ科)及びキャベツルーパーモス(Trichoplusia ni)(鱗翅目：ヤガ科)

コナガの幼虫を、Lincolnのアブラナ科植物(キャベツ植物)上で飼育し、又はCry1A及びCry1Cに耐性の株、並びに感受性の株(G88)を取得し、Geneva, NY, USAのCornell University, New York State Agricultural Experiment Station, College of Agriculture and Life Sciencesで試験を行った。モンシロチョウの幼虫は、Lincoln University, New Zealandの農場から野外採集した。 50

【 0 1 5 1 】

10匹の2～3齢幼虫を使用し、細菌を含有する株(NMI No's: V12/00944, V12/001945 or V12/001946)のいずれかの溶液で処理したキャベツの葉の3cm円盤上に置き、又はそれらの溶液に浸漬した。イタリアのB. ラテロスポルス(B. laterosporus)株NCIMB41419、及び他の細菌属エルウィナ(Erwinia)(ICMP)の培養物も、DBMの幼虫に対する活性の比較対象として使用された。水和剤のSilwet L-77(Momentive Performance Materials, New York, USA)又はTriton X-100(Rohm and Hass Co, Philadelphia, USA)は、< 0.05%で使用された。各処理は、3～5回反復された(処理当たり幼虫3～50匹)。処理された幼虫を、23 16L:8HD(Lincoln)、又は27 16hL:8hD(USA)でキャベツの葉の上に置き、生死を毎日チェックした。

10

【 0 1 5 2 】

感受性及びCry1A耐性トリコプルシア・ニ(Trichoplusia ni)も取得され、Geneva, NY, USAのCornell University New York State Agricultural Experiment Station, College of Agriculture and Life Sciencesで試験された。第二の3齢幼虫もDBMと同様に接種及び維持したが、反復実験あたり5匹の幼虫しか使用しなかった(実験あたり合計で幼虫25匹)。幼虫は処理後27 16hL:8hDで維持された。

【 0 1 5 3 】

コドリング(Cydia pomonella)バイオアッセイ(鱗翅目:ハマキガ科)

バイオアッセイは、Plant and Food Research Center, (PFR), Auckland, New Zealandにより提供された卵に由来するコドリングの幼虫を使用して準備された。PFRも、昆虫の飼育に使用される人工飼料を供給した。

20

【 0 1 5 4 】

予備的及び確認的試験を行い、NMI NO. V12/001946に対する昆虫の反応を評価した。各バイオアッセイは、a)無希釈(30のNYSM中で4日間シェーカーフラスコ中で増殖させた材料を希釈せずに使用し、水和剤として0.025%のコンタクトを含有する)のNMI No. V12/001946又はV12/001944で処理した飼料、及びb)対照としての未処理の飼料からなる2つの処理を有する。予備的なセットアップにおいて、各処理は、10回反復され、1つのチューブは1つの複製物を表す。確認的試験において、各処理は30個の複製物を有し、又は複製物として1つのチューブを有する。処理した飼料において、その表面に10µlのNMI No. V12/001946を散布し、10分間送風により乾燥させた。2匹の2齢幼虫を各チューブに入れ、チューブをパラフィルムで封じた。

30

【 0 1 5 5 】

全てのチューブをラックに置き、25のインキュベーターに入れ、照明時間を16:8(L:D)とした。幼虫の死亡率を毎日観察し、接種の1日後からデータを収集した。

【 0 1 5 6 】

イエバエ(Musca domestica)バイオアッセイ(双翅目:イエバエ科)

バイオアッセイの試行は、Auckland, New Zealandに本拠地を置く生きた昆虫を供給する会社であるBiosuppliers Insects(www.biosuppliers.com)から購入した幼虫(蛆虫)及び蛹を使用して実行された。セットアップにおいて、Ruiu et al. 2006による人工飼料が使用された。

40

【 0 1 5 7 】

蛆虫及び蛹のNMI No. V12/001946に対する反応は、a)無希釈のNMI No. V12/001946で処理した飼料、及びb)対照としての未処理の飼料の、2つの処理において観察された。蛆虫を使用した予備的なセットアップにおいて、各処理は、10mlの飼料を有する3つのポッテルカップ(pottel cups)(Huhtamaki Co., Henderson, Auckland, New Zealand)を有する。処理した飼料において、200µlの無希釈のNMI No. V12/001946を飼料と粗く混合した後、6匹の蛆虫に与えた。蛹を使用するセットアップにおいて、各処理は、各カップに5匹の蛹を入れたポッテルを有する。

【 0 1 5 8 】

前記セットアップは21度のインキュベーター中に置かれ、照明時間を16:8(L:D)

50

とした。当該セットアップを毎日観察した。

【0159】

コモンフォレストルーパーモス(*Pseudocoremia suavis*)バイオアッセイ(鱗翅目:シャクガ科)

コモンフォレストルーパーの卵は、PFRから供給された。卵を、Bioprotection Center, Lincoln, New Zealandの20及び照明時間16:8(L:D)のControlled Temperature (CT)室の一つの中で孵化させた。新生の幼虫をLincoln University Nursery, Lincoln, New Zealandにおいて、切り離れたラジアータパインの芽の中で生育させた。当該芽は、軽く洗浄し、水気を切り、湿ったペーパータオルを敷いたプラスチック容器に入れられた。当該容器は空気が通るように網蓋で覆われた。新鮮な松の葉は、バイオアッセイに用いる3齢幼虫になるまで毎日供給された。

10

【0160】

葉を浸漬する方法を使用して行われたバイオアッセイは2つ存在する。各バイオアッセイは、a) 0.01% TritonX100(水和剤、Rohm and Haas Co. Philadelphia, USA)を有する細菌中に浸漬したラジアータパインの葉、及びb) 対照の、0.01% TritonX100を有する滅菌蒸留水中に浸漬した葉の、2つの処理を有する。各処理は2つの複製を表す2つの葉の試料を有する。第一のバイオアッセイにおいて、 10^{-1} の細菌希釈が使用され、第二の試行において、無希釈が利用された。葉は送風により乾燥され、その葉に5匹の幼虫が導入された。当該セットアップは、CT室で、20、16:8(L:D)照明時間に置かれた。

20

【0161】

グラスグラブ(*Costelytra zealandica*)バイオアッセイ(鞘翅目:コガネムシ科)

グラスグラブの幼虫を近所の野原から採集した。バイオアッセイの前に、当該幼虫に、12ウェルの組織培養プレート中の人参キューブを与えた。必要に応じて新鮮な人参キューブを再び与えた。2日後、活発に餌を食べる全ての幼虫をバイオアッセイ用に選択した。

【0162】

バイオアッセイは、NMI No. V12/001946で処理した人参キューブ、及び対照である未処理の人参キューブの、2種類の処理を有する。NMI No. V12/001946で処理した人参キューブにおいて、各キューブは、2日間栄養寒天中で増殖させたNMI No. V12/001946上で転がされた。処理あたり12個のウェルが割り当てられ、ウェル当たり1匹の幼虫が割り当てられた。プレートは湿ったペーパータオルを敷いたトレイ中に置かれ、透明なプラスチックバッグに入れられ、湿度を増大させて人参キューブの乾燥を防いだ。トレイは、21、16:8(L:D)照明時間のインキュベーター中に置かれた。観察は毎日行われた。

30

【0163】

マヌカビートル(*Pyronota* spp.)バイオアッセイ(鞘翅目:コガネムシ科)

マヌカビートルの幼虫に関して、人参キューブバイオアッセイ及び土壌バイオアッセイの2つのバイオアッセイが行われた。マヌカビートルの幼虫は、Landcare Farming Ltd, Westport, New Zealandから提供された。

【0164】

人参キューブバイオアッセイにおいて、グラスグラブと同一の工程がなぞられた。土壌バイオアッセイにおいて、幼虫は、12ウェル組織培養プレート中で2日間人参キューブを与えられた。バイオアッセイには良く食べる幼虫が選択した。滅菌した土壌10gをユニバーサルボトル中に入れた。当該土壌中に2mlの滅菌蒸留水を添加し、よく混合した。処理した土壌には500mlの無希釈NMI No. V12/001946が加えられ、土壌とよく混合された。対照には、2mlの滅菌蒸留水のみ土壌と混合された。各ボトルに1匹の幼虫が導入され、1つの人参キューブが与えられた。ボトルの蓋は軽く締められ、21で16:8(L:D)照明時間のインキュベーター中に置かれた。幼虫の死亡率が毎日観察された。

40

【0165】

50

ライトブラウンアップルモス (LBAM) (*Epiphyas postvittana*) バイオアッセイ (鱗翅目: ハマキガ科)

このバイオアッセイは、Wearing et al. (2003)の方法を改変したものである。彼らの方法は、完全に展開したリンゴの葉を使用し、幼虫は、4 齢になるまで毎週新しい葉に移された。当該葉は、背軸面を下にして平らな所に置かれた。BHU, Lincoln Universityからの若いリンゴの葉、及びPlant & Food Researchから提供された卵から育てたLBAMの幼虫を、セットアップに使用した。

【0166】

予備的なバイオアッセイにおいて、Wearing et al. (2003)のプロトコルからの改変は、1) 全形の葉の代わりに、葉は1インチ四方にカットされた点、2) 2つの葉の方向が使用された点、及び3) 幼虫が新しい葉に移されなかった点である。

10

【0167】

予備的バイオアッセイは：対照としての無処理の葉及び無希釈1821で処理した葉の2つの処理を有する。若い完全に展開した葉から1平方インチの葉を切り出した。処理された葉の試料において、無希釈の40 µl V12/001946が表面に散布され、送風で乾燥された。対照及び処理された葉の試料は、水寒天の表面に、1) 葉の葉軸面側(下側)を寒天とさせる、及び2) 葉の向軸面(上側)を寒天と接触させる、2つの方法で置かれた。処理あたり、及び葉の方向あたり、2つの葉の試料が用意された。各葉の試料に、5枚の葉が置かれた。

【0168】

20

第二のバイオアッセイは、全形の葉を使用して行われた。処理及び手順は、第一のバイオアッセイと同一であった。

【0169】

トマトフルーツワームモス (アカコーンイヤーワーム及びコモンボールワームモス) (*Helicoverpa armigera*) バイオアッセイ (鱗翅目: ヤガ科)

トマトフルーツワームに対するV12/001946の反応は、PFRから提供された卵から育てた幼虫及び人工飼料を使用して、Singh (1983)の方法の改変に基づいて評価された。改変は、保存料、抗生物剤、及び抗真菌剤の化合物を試料に入れない点である。

【0170】

このバイオアッセイは：無希釈V12/001946で処理した飼料、及び対照としての無処理試料の、2つの処理を有する。処理あたり5 mlの試料と6個のポーションカップ(Huhtamaki Co., Henderson, Auckland)が使用された。処理した飼料において、無希釈V12/001946 20 µlが試料の表面に散布され、通気乾燥された。処理された及び無処理の飼料において、カップあたり5匹の幼虫が導入された。このカップは、試料の乾燥を防ぐためにパラフィルムで覆われた。処理された及び無処理のカップは、25 °Cの16:8 (L:D) 照明時間のインキュベーター中に置かれた。

30

【0171】

蚊バイオアッセイ (*Culex pervigilans*及び*Opifex fuscus*) (双翅目: カ科)

このバイオアッセイは、Oxford, Canterbury, New Zealandの閉鎖されたプールからLincoln Universityが採集した(*Culex pervigilans*)、又はNew Zealand BioSecure Entomology Laboratory Research, Lincoln, Christchurchにより供給された(*Culex pervigilans* and *opifex fuscus*)蚊の幼虫を使用して実施された。当該アッセイは、7つの処理、即ち無希釈NMI No. V12/001946 (シェーカープラスチックから)、 10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} の5つの細菌希釈物、及び対照としての無処理の幼虫を有する。各処理は、12個の複製物を示す12ウェルを有し、完全にランダム化されるように設計された。

40

【0172】

水1 ml及び1匹の幼虫を12ウェル組織培養プレートの各ウェルに注入した。処理された幼虫において、20 µlのNMI No. V12/001946が各ウェルに導入された。プレートを蓋で覆い、25 °Cの16:8 (L:D) 照明時間のインキュベーター中に置かれた。幼虫の死亡は、ゆっくり混ぜたときに幼虫が動かなくなったことにより示され、死亡率は毎日評

50

価された。

【0173】

当該アッセイは、NMI V12/001944、V12/001945及びV12/001946の3つの株、イタリアのB. ラテロスポルス (B. laterosporus) 株NCIMB41419を使用して繰り返され、他の細菌種Erwina (ICMP)の培養物も、比較として使用された。

【0174】

ハスモンヨトウ (Spodoptera litura) バイオアッセイ (鱗翅目: ヤガ科)

このバイオアッセイで使用される幼虫は、PFRにより供給された卵から育てたものである。新生の翌日、トマトフルーツワーム用に開発された人工飼料中で幼虫を一昼夜育成した。飼料の表面の排泄物の存在により示されるように、この飼料がハスモンヨトウにも好適であることが証明された。

10

【0175】

このバイオアッセイには、無希釈NMI No. V12/001946で処理した飼料と、対照としての無処理飼料の、2種類の処理がある。各処理は、6個の複製物を表す6個のポッテルカップを有する。飼料の表面に20 µlの細菌を散布し、通気乾燥させる。各ポッテルカップに、5匹の幼虫を導入した。このカップを、幼虫の導入後に、パラフィルムで封じた。

【0176】

このセットアップを25 及び16 : 8 (L:D) 照明時間のインキュベーター内に置いた。

【0177】

ブラックレグドリーフローラーモス (Planotortrix notophaea) 及びブラックライアリーフローラーモス (Cnephasia jactatana) バイオアッセイ (鱗翅目: ハマキガ科)

2つのバイオアッセイの為の試験用の昆虫及び人工飼料は、PFRにより提供された。卵から孵化した翌日、幼虫を人工飼料中で一昼夜飼育し、21 及び16 : 8 (L:D) 照明時間のインキュベーター中に置いた。

20

【0178】

両バイオアッセイは、無希釈NMI No. V12/001946で処理した飼料と、対照としての無処理飼料の、2つの処理を有する。ブラックレグドリーフローラーを含むバイオアッセイにおいて、対照のチューブは15本あり、各チューブは1つの複製物を表す。処理された試料は、14個の複製物を有する。ブラックライアのバイオアッセイにおいて、処理された飼料及び無処理の飼料はそれぞれ15個の複製物を有する。各チューブに2匹の2齢幼虫が導入され、パラフィルムで封じられた。

30

【0179】

両バイオアッセイにおいて、処理された及び無処理のチューブは、21 及び16 : 8 (L:D) 照明時間のインキュベーター中に置かれた。幼虫の死亡率は、双眼顕微鏡下で毎日観察された。ラクダのブラシで軽くこすったときに動かない幼虫は、死んでいると評価された。

【0180】

ミールワーム (Tenebrio molitor) バイオアッセイ (鞘翅目: ゴミムシダマシ科)

このバイオアッセイの為の幼虫及び飼料は、Biosuppliers Live Insects, Auckland, New Zealandから購入した。無希釈で処理した飼料と、対照としての無処理飼料の、2つの処理が存在する。各処理は2つの複製物を有し、1つの複製物は1つの容器を有する。

40

【0181】

各容器中に250 mgの飼料が置かれた。処理された飼料において、200 µlの細菌溶液が飼料と粗く混合され、通気乾燥された。対照の飼料には、同量の滅菌蒸留水が混合された。各容器に5匹の幼虫が入れられ、中央に穴が空けられた蓋で封じられた。これらの容器を、25 及び16 : 8 (L:D) 照明時間のインキュベーター中に置いた。

【0182】

サワーペーストネマトード / マイクロワーム (Panagrellus redivivus) バイオアッセイ (線形動物: 桿線虫類)

50

自由な生きた線形動物を、Biosuppliersから購入した。B. ラテロスポルス (B. laterosporus) 細菌のマイクロワームに対する反応を試験するために、2つのバイオアッセイが実施された。2つのバイオアッセイにおいて、マイクロワームはペーストの状態を提供され、当該ペーストから掬い取り、滅菌蒸留水の入った深いペトリ皿中に置かれて、個々の線形動物に分離させた。チップカットを有する1mlピペットチップを使用して、個別のマイクロワームを滅菌蒸留水中に取った。

【0183】

第一のバイオアッセイにおいて：1) 無希釈V12/001946で処理したマイクロワーム、2) 無希釈V12/001944で処理したマイクロワーム、及び3) 対照としての無処理マイクロワームの、3つの処理がある。12ウェル組織培養プレートの各ウェル中に10匹のマイクロワームが置かれた。各ウェル中に、1mlの滅菌蒸留水が入れられた。各処理は、完全に無作為化される設計で6個の複製ウェルを有する。処理されたマイクロワームにおいて、ウェルあたり10µlの細菌が入れられた。このバイオアッセイは、室温で行われた。

10

【0184】

マイクロワームの死亡率は、播種後3日まで毎日評価された。幼虫の死亡率は、双眼顕微鏡下で観察された。

【0185】

第二のバイオアッセイにおいて、遠心分離された材料の代わりに細菌ブロスが使用された。1) 無希釈V12/001944ブロス、2) 10^{-2} 希釈物、3) 10^{-3} 希釈物、4) 10^{-4} 希釈物及び5) 対照としての無処理物の、5つの処理が評価された。処理あたり6ウェルを用い、各ウェルには10匹のマイクロワームが入れられ、完全に無作為化するように設計された。処理されたマイクロワームにおいて、ウェルあたり20µlの細菌ブロスが添加された。当該バイオアッセイも、室温で実施された。

20

【0186】

死亡率は、播種後3日間毎日評価された。幼虫の死亡率は双眼顕微鏡下で観察された。

【0187】

アルゼンチンステムウィービル (*Listronotus bonariensis*) (鞘翅目：ゾウムシ科)

アルゼンチンステムウィービルに対するV12/001946の反応を評価するために、2つのバイオアッセイが実施された。両バイオアッセイのための試験材料として、ホソムギとゾウムシは、Canterbury, New Zealandの野外採集された材料である。

30

【0188】

最初のバイオアッセイは：無希釈V12/001946ブロスで処理されたホソムギ及び対照としての無処理の葉の、2つの処理を有する。ホソムギは2インチの長さに切られた。V12/001946処理草において、草試料は無希釈V12/001946ブロスに浸漬され、10～15分間通気乾燥された。対照及び処理草試料は、ペトリ皿中に置かれた。処理草は5枚のペトリ皿を有し、対照は4枚有する。各草試料に10匹のゾウムシが導入された。ペトリ皿はラッピングフィルムでシールされた。全てのペトリ皿は、22及び12:12(L:D)照明時間のインキュベーター内に置かれた。幼虫の死亡率は、毎日観察された。

【0189】

第二のバイオアッセイは、全形のホソムギ苗が使用された。三週齢のホソムギ苗が使用された。ホソムギ苗の根は小さいプラスチックバッグに入れられ、十分な水を入れて苗の乾燥を防いだ。プラスチックバッグは根の少し上で縛られプラスチックジッパーが閉じられて、バッグから水が出ることを防いだ。

40

【0190】

このバイオアッセイは：V12/001946処理ホソムギと、対照としての無処理ホソムギの、2つの処理を有する。処理あたり3本のホソムギ苗を使用する。無処理ホソムギにおいて、エアブラシを用いて各苗に500µlの滅菌蒸留水がスプレーされた。処理ホソムギにおいて、500µlのV12/001946ブロスがスプレーされた。苗はスプレー後通気乾燥され、メッシュ蓋付きの長方形のプラスチック容器内に置かれた。各苗に10匹のゾウムシが導入された。全ての容器は、22及び12:12(L:D)照明期間のインキュベーター

50

一中に置かれた。幼虫の死亡率の評価は毎日実施された。

【0191】

ウォーターボートメン（半翅目：ミズムシ科）

このバイオアッセイは、Oxford, New Zealandで野外採集したウォーターボートメンを使用して行われた。V12/001946で処理されたウォーターボートメンと、対照としての無処理のものの、2つの処理がある。1つのウォーターボートメンが、5 mlの滅菌蒸留水が入ったユニバーサルボトル中に入れられた。処理あたり5本のボトルがある。処理されたウォーターボートメンにおいて、滅菌蒸留水に40 µlの無希釈V12/001946が添加された。この実験は室温（20～24）で行われた。死亡率は毎日評価された。

【0192】

ゲンゴロウ(*Antiporus duplex*)（鞘翅目：ゲンゴロウ科）

このバイオアッセイにおいて、Oxford, New Zealandで野外採集されたゲンゴロウが使用された。このバイオアッセイは、V12/001946処理ゲンゴロウ及び対照としての無処理ゲンゴロウの、2つの処理を有する。

【0193】

12ウェル組織培養プレートをバイオアッセイで利用した。処理あたり6ウェルが用いられ、ウェルあたり1匹のゲンゴロウを入れた。2 mlの蒸留水を各ウェルに入れた。V12/001946処理ゲンゴロウにおいて、10 µlの無希釈V12/001946を添加した。このバイオアッセイは室温（20～24）で行われ、死亡率は毎日記録された。

【0194】

コモンワスプ (*Vespula vulgaris*) 成虫（膜翅目：スズメバチ科）

このバイオアッセイは、Lincoln University周辺の顕花植物から回収したカリバチの成虫を使用して行われた。V12/001946で処理したカリバチと、対照としての無処理のもの、2つの処理が評価された。小さい穴が空けられた蓋付きのプラスチック容器中に5匹のカリバチが入れられた。

【0195】

対照のカリバチは、小さいプラスチックの蓋の中に置かれた2 mlの10%スクロース溶液を与えた。V12/001946処理カリバチにおいて、2 mlの10%スクロースは1 mlのV12/001946無希釈（濃縮）物と混合された。スクロース溶液（V12/001946を含む又は含まない）は、各容器にカリバチを入れる前に置かれた。

【0196】

このバイオアッセイは、室温（20～24）で行われた。死亡率は毎日記録された。

【0197】

New Zealandで単離された3つのB. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) (NMI No's V12/001944, V12/001945及びV12/001946)は、DBMの幼虫に対する活性を示した（図3）。これらの細菌は、他の鱗翅目の幾つかの種に対しても毒性であった（表1）。リーフローラー（ブラックレグドリーフローラー、ブラックライアリーフローラー、ライトブラウンアップルモス、全てハマキガ科）、コドリング（ハマキガ科）及びDBM(コナガ科)及びヤガ科が感受性であった。

【0198】

蚊（双翅目：カ科）も、前記細菌に対して大いに感受性であった（図4及び5）。マヌカビートル（コガネムシ）もある程度感受性であるが、幼虫が土壌中にある場合には感受性が見られなかった。他のコガネムシのグラスグラブは、感受性は見られなかった（表2）。膜翅目のカリバチ、ヴェスプラ・ブルガリス (*Vespula vulgaris*) の成虫は、感受性が認められた。

【0199】

線形動物に対する活性は、線形動物の一種のマイクロワーム (*Panagrellus redivivus*) により実証された（図9）。

【0200】

B. ラテロスポルス (*B. laterosporus*) 株NCIMB 41419は、ダイヤモンドバックモス（

10

20

30

40

50

図3)又は蚊(図5)に対して有効ではなかった。

【0201】

表1: V12/001946株を用いた鱗翅目の昆虫に対するバイオアッセイの結果をまとめる。(無希釈は、3~4日培養した約 10^{10} cells/mlの培養物を示す。)

【表1】

処理及び種	希釈	死亡率 %	N	
Cydia pomonella (コドリンガ) (ハマキガ科)				
対照	-	16.7	n=30	10
V12/001946	10^{-4}	66.7		
V12/001946	10^{-2}	83.3		
V12/001946	0	73.3		
Helicoverpa armigera (コットンボールワーム/コーンイヤワーム/トマトフルーツワーム) (ヤガ科)				
対照	-	3.3	n=30	
V12/001946	0	0.0		
Pseudocoremia suavis (パインルーパー/コモンフォレストルーパー) (シャクガ科)				
対照	-	0.0	n=20	20
V12/001946 (25日齢)	0	5.0		
V12/001946 (4日齢)	0	10.0		
Cnephasia jactatana (ブラックライアリーフルーパーモス) (ハマキガ科)				
対照	-	36.7	n=30	30
V12/001946	0	83.3		
対照		23.3		
V12/001946	10^{-4}	50.0	n=30	
V12/001946	10^{-2}	50.0		
V12/001946	0	76.7		
V12/001946	0	76.7		
Planotortrix notophaea (ブラックレグドリーフローラー) (ハマキガ科)				
対照		30.0	n=10	
V12/001946	0	40.0		
対照		36.7	n=30	
V12/001946	0	50.0		
対照		21.4	n=28	
V12/001946	0	39.3		
Epiphyas postvittana (ライトブラウンアップルモス) (ハマキガ科)				
対照		30	n=10	40
V12/001946	0	60		
Spodoptera litura (タバコカットワーム/アーミーワーム) (ヤガ科)				
対照		10.0	n=30	
V12/001946	0	0.0		
Pieris rapae (紋白蝶) (シロチョウ科)				
対照		0	n=10	
V12/001946	0	0		
Dipel (陽性対照)	0	100		

【0202】

表2: 他の種

50

【表 2】

処理及び種	希釈	死亡率 %	コメント
ウォーターボートメン (ミズムシ科)	0	感受性なし	
ゲンゴロウ (<i>Antiporus duplex</i>)		感受性なし	
グラスグラブ <i>Costelytra zealandica</i>		感受性なし	10
マヌカビートル <i>Pyronota</i> sp. -		人参接種の場合 24日後に7/20 が死亡	土壌処理の場合 死亡なし
<i>Vespula vulgaris</i> 成虫 (コモンワスプ)	対照 - 2ml 10% スクロース	3/5	
	1ml無希釈 (FS) (遠心分離) + 1ml 10% スクロース	5/5	1日後5/5が死亡 (対照は1/5)
アルゼンチンステム ウィービル (<i>Listronotus bonariensis</i>) (鞘翅目: ゾウムシ科)	対照	0/60	感受性なし
	V12/001946	1/60	
<i>Musca domestica</i> (イエバエ)	対照	1/16	
	V12/001946	3/16	

【0203】

ニュージーランドの植物から単離された*B. ラテロスポルス* (*B. laterosporus*) の3つの株は、いずれも、幾つかの鱗翅目及び双翅目に対して活性を有する。鱗翅目の中で、試験された全てのハマキガ科及びコナガ科の種は感受性であった。双翅目の中で、カ科が感受性であった。

【0204】

本明細書において、特許明細書、他の外的文献、又は他の情報源が引用されている場合、これは、一般に、本発明の特徴を議論するためのコンテキストを提供するためのものである。別に言及が無い限り、そのような外的文献の参照は、そのような文献又は情報源が、いずれかの管轄において、先行技術であること、又は当該技術分野の技術常識の部分を形成することと見做されるべきではない。

【0205】

参考文献の一覧

- Aronson, A. I., & Dunn, P. E. (1991). United States Patent No. US5055293.
- Baxter, S.W., Badenes-Perez, F.R., Morrison, A., Vogel, H., Crickmore, N., Kain, W., Wang, P., Heckel, D.G. and Jiggins, C.D. (2011) Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. *Genetics* October, 189, 675-679.
- Boets, A., Arnaut, G., van Rie, J., & Damme, N. (2011). Belgium Patent No. US 79 19609B2.
- Bone, L. W., & Singer, S. (1991). United States Patent No. 5045314
- de Oliveira, E. J., Rabinovitch, L., Monnerat, R. G., Passos, L. K., & Zahner, V

10

20

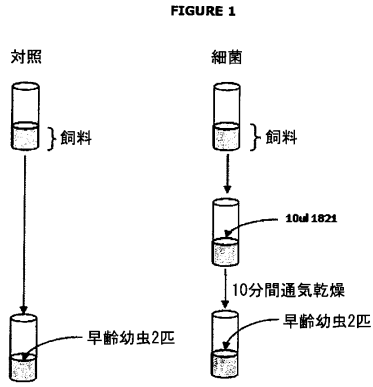
30

40

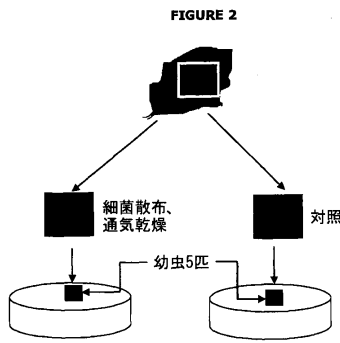
50

- . (2004). Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control. *Appl Environ Microbiol*, 70(11), 6657-6664.
- Favret, M.E. and Yousten, A.A. (1985) Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. *J. Invertebrate Pathology* 48,195-203.
- Huang, X., Tian, B., Niu, Q., Yang, J., Zhang, L., & Zhang, K. (2005). An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Res Microbiol*, 156(5-6), 719-727.
- Orlova, M. V., Smirnova, T. A., Ganushkina, L. A., Yacubovich, V. Y., & Azizbekyan, R. R. (1998). Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. *Appl Environ Microbiol*, 64(7), 2723-2725. 10
- Rivers, D. B., Vann, C. N., Zimmack, H. L., & Dean, D. H. (1991). Mosquitocidal activity of *Bacillus laterosporus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58, 444-447.
- Ruiu, L., Delrio, G., Ellar, D. J., Floris, I., Paglietti, B., Rubino, S., et al. (2006). Lethal and sublethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the housefly (*Musca domestica*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 118(2), 137-144.
- Schnepf, H. E., Narva, K. E., Stockhoff, B. A., Finstad Lee, S., Walz, M., & Sturgis, B. (2002). United States Patent No. US 2002/0120114A1. 20
- Singer, S. (1996). The utility of strains of morphological group II *Bacillus*. *Advances in applied microbiology*, 42, 219-261.
- Singer, S., Van Fleet, A. L., Viel, J. J., & Genevese, E. E. (1997). Biological control of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* and the snail *Biomphalaria glabrata*, using Gramicidin S and D and molluscicidal strains of *Bacillus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18(4), 226-231.
- Singh, P. (1983) A general purpose laboratory diet mixture for rearing insects. *Insect Sci. Application* 4, 357-362.
- Tabashnik, B.E., Cushing, N.L., Finson, N., Johnson, M.W. (1990) Field Development of Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, 83, 1671-1676. 30
- Tabashnik, B.E., Liu, Y., Malvar, T., Heckel, D.G., Masson, L. and Ferre, J. (1998) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 29 October 353, 1751-1756.
- Wearing, C.H. et al., (2003) Screening for resistance in apple cultivars to light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* and green headed leaf roller *Planotortrix octo* and its relationship to field damage. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 109, 39-53.
- Zahner, V., Rabinovitch, L., Suffys, P., & Momen, H. (1999). Genotypic diversity among *Brevibacillus laterosporus* strains. *Applied and environmental microbiology*, 65(11), 5182. 40

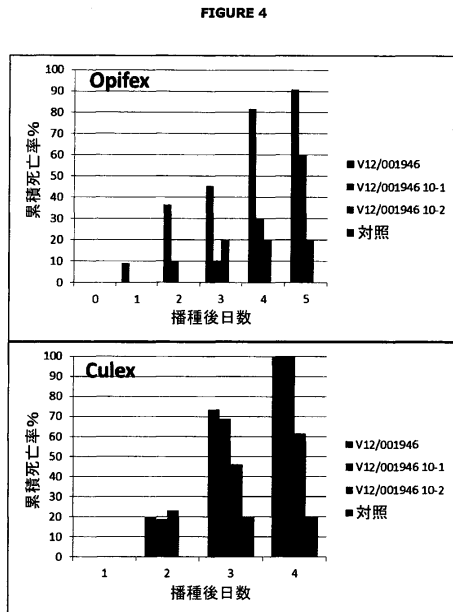
【 図 1 】



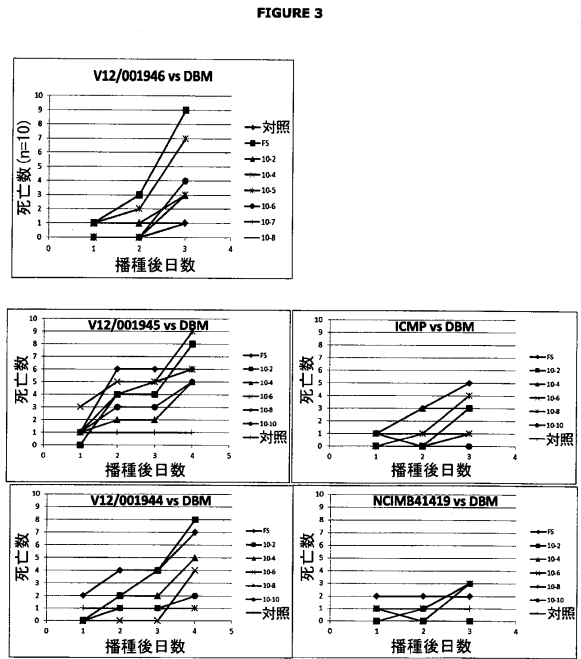
【 図 2 】



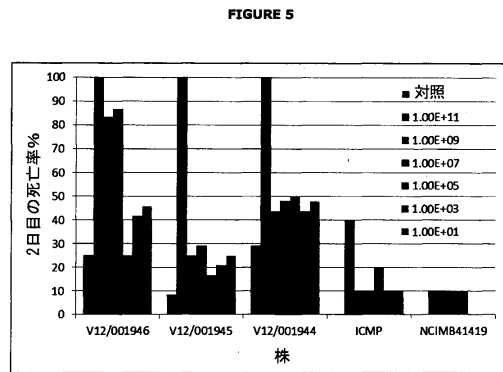
【 図 4 】



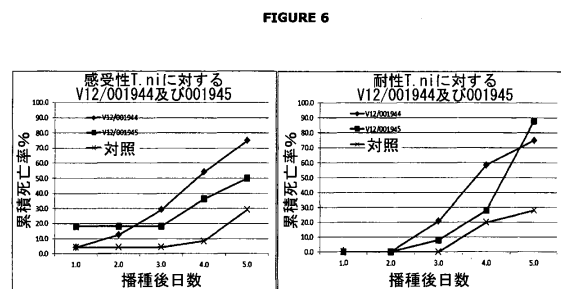
【 図 3 】



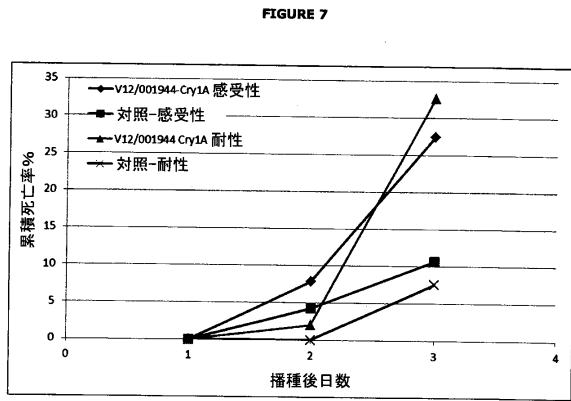
【 図 5 】



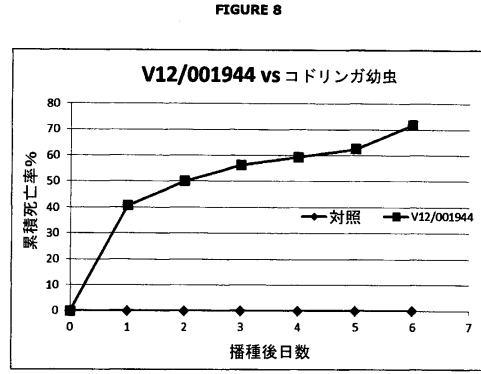
【 図 6 】



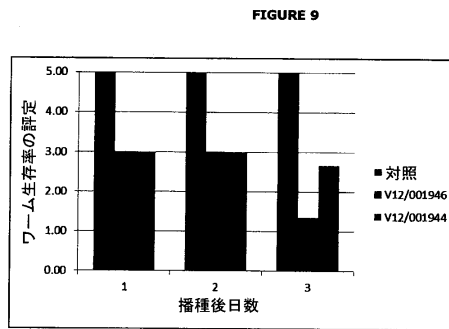
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】

FIGURE 10

V12/001946	ACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGACCGAGGG	40
V12/001944	-----	40
V12/001945	-----	40
NCIMB41419	-----	40
V12/001946	TCCTCGGACCCCTAGCGCGGACGGGTGAGTAACAGCTAGG	80
V12/001944	-----	80
V12/001945	-----	80
NCIMB41419	-----	80
V12/001946	CAACCTGCCCTGTAAAGACTGGGTAACAATAGGGAACCTTAT	120
V12/001944	-----	120
V12/001945	-----	120
NCIMB41419	-----	120
V12/001946	GCTAATACCGGAGGCGTTTTCCTTCTCCGAAAGCGAAC	160
V12/001944	-----	160
V12/001945	-----	160
NCIMB41419	-----	160
V12/001946	GGAAAGATGGCCAGCTATCACTTACAGATGGGCGCTGGC	200
V12/001944	-----	200
V12/001945	-----	200
NCIMB41419	-----	200
V12/001946	CGGCAATAGCTAGCTTGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCG	240
V12/001944	-----	240
V12/001945	-----	240
NCIMB41419	-----	240
V12/001946	ACGATCGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGCCACACTG	280
V12/001944	-----	280
V12/001945	-----	280
NCIMB41419	-----	280
V12/001946	GGACTGAGACAGGCCCAAGCTCTCAAGGGAGGAGCAGT	320
V12/001944	-----	320
V12/001945	-----	320
NCIMB41419	-----	320
V12/001946	AGGSAATTTCCACAAATGGACGAAAGTCTGATGAGACAC	360
V12/001944	-----	360
V12/001945	-----	360
NCIMB41419	-----	360
V12/001946	GCCGGGTGACAGATGAGGCTTTCGGGTCTTAAGTTCTGT	400
V12/001944	-----	400
V12/001945	-----	400
NCIMB41419	-----	400
V12/001946	TTGTAGGGAGAAACAGTGCCTTTAAATAGGTGGCAC	440
V12/001944	-----	440
V12/001945	-----	440
NCIMB41419	-----	440
V12/001946	CTTGCGGTACCTTACGAGAAAGCCACGGCTTACTACTGT	480
V12/001944	-----	480
V12/001945	-----	480
NCIMB41419	-----	480

V12/001946	CCAGCAGCCGCGGTAAATACGTAGGTGCAAGCGTTGTCGG	520
V12/001944	-----	520
V12/001945	-----	520
NCIMB41419	-----	520
V12/001946	GAAATATTTGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGCTATGTAAG	560
V12/001944	-----	560
V12/001945	-----	560
NCIMB41419	-----	560
V12/001946	TCTGATGTTAAAGCCGAGGCTCACTCGGTTGCGCATG	600
V12/001944	-----	600
V12/001945	-----	600
NCIMB41419	-----	600
V12/001946	GAAACTGTGTAGCTTGAAGTGCAGGAGAAAGTGGTATT	640
V12/001944	-----	640
V12/001945	-----	640
NCIMB41419	-----	640
V12/001946	CCAGTGTAGCGGTGAATGCGTAAAGTGTGAGGAAACA	680
V12/001944	-----	680
V12/001945	-----	680
NCIMB41419	-----	680
V12/001946	CCAGTGGCGAAGCGGCTTCTGGCCTTAACTGACACTG	720
V12/001944	-----	720
V12/001945	-----	720
NCIMB41419	-----	720
V12/001946	AGGCCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCT	760
V12/001944	-----	760
V12/001945	-----	760
NCIMB41419	-----	760
V12/001946	GGTAGTCCACCGGTAAACGATAGTCTAGTGTTAGGG	800
V12/001944	-----	800
V12/001945	-----	800
NCIMB41419	-----	800
V12/001946	GTTCATATACCTTAGTGCAGGCTAAGCAATAGCAC	840
V12/001944	-----	840
V12/001945	-----	840
NCIMB41419	-----	840
V12/001946	TCCGCTGGGAGTACGCTGCGAAGTGAAGCTCAAGG	880
V12/001944	-----	880
V12/001945	-----	880
NCIMB41419	-----	880
V12/001946	AATGACGGGGCCCGACAGCGGTGAGCATGTGGTT	920
V12/001944	-----	920
V12/001945	-----	920
NCIMB41419	-----	920
V12/001946	AATTCGAGAACCCGAAAGACTTACCGAGTCTTGACAT	960
V12/001944	-----	960
V12/001945	-----	960
NCIMB41419	-----	960

```

V12/001946 CCCACTGACCCCTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGCA 1000
V12/001944 ----- 1000
V12/001945 ----- 1000
NCIMB41419 ----- 1000

V12/001946 GTGGTACAGGTTGGTATGGTTGTCGTCAGCTCTGTCTCG 1040
V12/001944 ----- 1040
V12/001945 ----- 1040
NCIMB41419 ----- 1040

V12/001946 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCACAGGCGCAACCCTTA 1080
V12/001944 ----- 1080
V12/001945 ----- 1080
NCIMB41419 ----- 1080

V12/001946 TCTTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACCTAGAGAGAC 1120
V12/001944 ----- 1120
V12/001945 ----- 1120
NCIMB41419 ----- 1120

V12/001946 TGCCCTCGACAAGACGAGGAGGGGGGATGACGTCAAA 1160
V12/001944 ----- 1160
V12/001945 ----- 1160
NCIMB41419 ----- 1160

V12/001946 TCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACA 1200
V12/001944 ----- 1200
V12/001945 ----- 1200
NCIMB41419 ----- 1200

V12/001946 ATGGTTGTACACGGGATCTACTTCGCGAGAGATGCT 1240
V12/001944 ----- 1240
V12/001945 ----- 1240
NCIMB41419 ----- 1240

V12/001946 AATCTCTTAAAACCAATCTCAGTTCGATTTAGGCTGCA 1280
V12/001944 ----- 1280
V12/001945 ----- 1280
NCIMB41419 ----- 1280

V12/001946 ACTCGCCTACATGAGTCGGAAATCGGTAGTAATCGGGAT 1320
V12/001944 ----- 1320
V12/001945 ----- 1320
NCIMB41419 ----- 1320

V12/001946 CAGCATGCCCGGTGATACGTTCCGGGGCTGTACACA 1360
V12/001944 ----- 1360
V12/001945 ----- 1360
NCIMB41419 ----- 1360

V12/001946 CCGCCGTCACACCAGGGAGTTTCACACCCGAACTCG 1400
V12/001944 ----- 1400
V12/001945 ----- 1400
NCIMB41419 ----- 1400

V12/001946 GTGAGGTACCCGCAAGGAGCCACCGCGAAGTGGGTA 1440
V12/001944 ----- 1440
V12/001945 ----- 1440
NCIMB41419 ----- 1440

V12/001946 GATAACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTATCCGTACCGGA 1480
V12/001944 ----- 1480
V12/001945 ----- 1480
NCIMB41419 ----- 1480

V12/001946 AGG (SEQ ID NO: 1) 1483
V12/001944 --- (SEQ ID NO: 2) 1483
V12/001945 --- (SEQ ID NO: 3) 1483
NCIMB41419 --- (SEQ ID NO: 4) 1483

```

【配列表】

000637128800001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 0 1 M 1/00 (2006.01) A 0 1 M 1/00 Z

微生物の受託番号 NMI V12/001945

微生物の受託番号 NMI V12/001946

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100182730

弁理士 大島 浩明

(72)発明者 トラビス ロバート グレア

ニュージーランド国, 7 6 0 8 リンカーン, ミルストリーム ドライブ 3 0

(72)発明者 ジョン グラハム ハンプトン

ニュージーランド国, 8 0 5 2 クライストチャーチ, ノウルズ ストリート セント アルバンズ 2 7 5

(72)発明者 マレー ポール コックス

ニュージーランド国, 4 4 1 2 パーマストン ノース, ボタニカル ロード ウェスト エンド 3 6 5

(72)発明者 ダミアン アレクサンダー ビェンコウスキー

ニュージーランド国, 8 0 4 2 クライストチャーチ, バックネル ストリート 2 7 エー

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 0 5 0 8 6 7 (W O , A 1)

特表 2 0 0 3 - 5 3 3 2 1 4 (J P , A)

国際公開第 2 0 0 8 / 0 3 1 8 8 7 (W O , A 1)

Research in Microbiology, 2 0 0 5 年, Vol.156, No.5-6, pp.719-727

African Journal of Biotechnology, 2 0 0 6 年, Vol. 5, No.22, pp. 2081-2085

Entomologia Experimentalis et Applicata, 2 0 0 6 年, Vol.118, No.2, pp.137-144

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2 0 0 4 年, Vol. 70, No. 11, p. 6657-6664

Applied Microbiology and Biotechnology, 2 0 1 2 年 4 月, Vol.97, No.4, pp.1601-1611

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

P u b M e d

C A p l u s / W P I D S / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)