

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4936444号  
(P4936444)

(45) 発行日 平成24年5月23日(2012.5.23)

(24) 登録日 平成24年3月2日(2012.3.2)

(51) Int. Cl.		F I		
AO1N 63/00	(2006.01)	AO1N 63/00		F
AO1P 3/00	(2006.01)	AO1P 3/00		
AO1G 7/00	(2006.01)	AO1G 7/00	605Z	
C12N 1/14	(2006.01)	C12N 1/14		A

請求項の数 3 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2006-316027 (P2006-316027)	(73) 特許権者	501203344
(22) 出願日	平成18年11月22日(2006.11.22)		独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
(65) 公開番号	特開2008-127353 (P2008-127353A)		茨城県つくば市観音台3-1-1
(43) 公開日	平成20年6月5日(2008.6.5)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成21年1月19日(2009.1.19)		弁理士 平木 祐輔
微生物の受託番号	NPMD NITE P-269	(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(72) 発明者	中村 仁
			茨城県つくば市藤本2-1 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 白紋羽病の生物防除剤及び防除方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

木材チップ上に生育した、受託番号NITE P-269で特定される白紋羽病菌の非病原性菌株を含有することを特徴とする白紋羽病防除剤。

【請求項2】

請求項1記載の白紋羽病防除剤を土壌に施用する工程と、前記土壌において植物を生育する工程と、を含むことを特徴とする、植物の白紋羽病防除方法。

【請求項3】

受託番号NITE P-269で特定される白紋羽病菌の非病原性菌株を木材チップ上で培養する工程を含むことを特徴とする、白紋羽病防除剤の製造方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば白紋羽病に対する生物防除剤及びそれを用いた防除方法に関する。

【背景技術】

【0002】

白紋羽病とは、白紋羽病菌が作物の根に寄生する病気で、根の内部に侵入し根を腐敗させて、枯死させる病気をいう。また、白紋羽病菌は、子のう菌類に属するロセリニア・ネカトリクス(Rosellinia necatrix)である。

20

## 【 0 0 0 3 】

これまで、国内外において白紋羽病菌に対する拮抗微生物を用いた生物防除の試みがなされている（例えば、非特許文献1参照）。日本では、白紋羽病菌に対する拮抗微生物として、例えば、バチルス(Bacillus)属や他属の細菌類（特許文献1～3）、トリコデルマ(Trichoderma)属やグリオクラディウム(Gliocladium)属菌等の糸状菌類（特許文献4及び5）が利用されている。しかしながら、国内外を問わず、現在のところ、拮抗微生物を用いた白紋羽病菌に対する生物防除は実用化に至っていない。

## 【 0 0 0 4 】

一方、他の植物病害においては、病原菌と同一種の非病原性菌株を用いた生物防除法の開発が試みられている（例えば、「拮抗微生物による作物病害の生物防除」、クミアイ化学工業(2003)参照）。また、サツマイモつる割病に対して防除効果を有する非病原性フザリウム(Fusarium)属菌については、農薬登録（登録番号20848）されるなど実用化されている。このような非病原性菌株による防除機構としては、病原菌との空間的/栄養的競合等と関連すると考えられるが、主には植物体への誘導抵抗性の付与である（植物防疫, 51, 116-121, 1997）。しかしながら、これまでに白紋羽病菌の非病原性菌株を用いた、白紋羽病菌に対する生物防除に関する報告はなされていない。

10

## 【 0 0 0 5 】

【特許文献1】特開2003-289854号公報

【特許文献2】特開2005-206496号公報

【特許文献3】特開2002-284615号公報

【特許文献4】特許第3213112号明細書

【特許文献5】特開平10-036211号公報

【非特許文献1】G. M. ten Hoopenら, 「Crop Protection」, 2006年, 第25巻, p.89-107

20

## 【 発明の開示 】

【発明が解決しようとする課題】

## 【 0 0 0 6 】

上述したように、白紋羽病に対する拮抗微生物を用いた生物防除は実用化されていない。この大きな理由としては、用いた拮抗微生物が実際の土壌中において、期待したような性質又は挙動を示さないことにあると考えられる。このような期待した性質又は挙動を示さない本質的な原因としては、これらの拮抗微生物が、自然界では白紋羽病菌に対してのみ影響を及ぼすわけではなく、また逆に自らが他の土壌微生物によって影響を受けてしまうことにある。

30

## 【 0 0 0 7 】

一方、非病原性菌株を用いた他の植物病害に対する生物防除法において、その主な防除機構は、上記のように植物体への誘導抵抗性付与である。しかしながら、このような抵抗性は短期間しか持続しない。従って、果樹類等の永年性植物に対して慢性的に被害を与える白紋羽病に対しては、誘導抵抗性による防除効果を期待できない。

## 【 0 0 0 8 】

そこで、本発明は、白紋羽病菌の非病原性菌株を利用した白紋羽病の生物防除剤及びそれを用いた防除方法を提供することを目的とする。

40

【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 0 9 】

病原菌と同一種の非病原性菌株は、病原性以外では病原菌と同様の性質を有することから、病原菌に代わって土壌中における同様の生態的地位を獲得すると考えられる。

## 【 0 0 1 0 】

そこで、上記の課題を解決するため鋭意研究を行った結果、先住効果を利用し、予め白紋羽病菌の非病原性菌株が果樹の根表面や根圏に生息していると生態的な競合作用によって病原性の白紋羽病菌は侵入できないと考え、白紋羽病菌に対する非病原性菌株を用いた白紋羽病防除剤及びそれを使用した白紋羽病防除方法を見出し、本発明を完成するに至っ

50

た。

【0011】

本発明は、以下を包含する。

(1) 木材チップ上に生育した白紋羽病菌の非病原性菌株を含有することを特徴とする白紋羽病防除剤。

【0012】

(2) 上記非病原性菌株が受託番号NITE P-269で特定される微生物であることを特徴とする、(1)記載の白紋羽病防除剤。

【0013】

(3) (1)又は(2)記載の白紋羽病防除剤を土壤に施用する工程と、前記土壤において植物を生育する工程とを含むことを特徴とする、植物の白紋羽病防除方法。

【0014】

(4) 白紋羽病菌の非病原性菌株を木材チップ上で培養する工程を含むことを特徴とする、白紋羽病防除剤の製造方法。

【0015】

(5) 上記非病原性菌株が受託番号NITE P-269で特定される微生物であることを特徴とする、(4)記載の白紋羽病防除剤の製造方法。

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、果樹類等に大きな被害を与える白紋羽病に対して優れた防除効果を有する白紋羽病防除剤が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係る白紋羽病防除剤は、木材チップ上に生育した白紋羽病菌の非病原性菌株を含有するものである。本発明に係る白紋羽病防除剤を植物を生育させる土壤に施用し、植物を生育させることで、白紋羽病菌の非病原性菌株が植物の根表面や根圏に生息し、生態的な競合作用により病原性の白紋羽病菌が侵入できないこととなる(先住効果)。この効果により、植物を病原性の白紋羽病菌の着生及び白紋羽病の発病から防御することができる。

【0018】

ここで、白紋羽病菌の非病原性菌株(以下、「非病原性菌株」という)とは、白紋羽病菌であるロセリニア・ネカトリクスのうち、植物に対して白紋羽病を引き起こさない菌株をいう。このような非病原性菌株は、例えば、遺伝的な組み換えが起こっている子のう胞子のような有性胞子からの分離、又は培地上での長期にわたる継代に伴う自然的な変異を生じさせることによって得ることができる。このような非病原性菌株としては、ロセリニア・ネカトリクスW450株(以下、「W450株」という)、ロセリニア・ネカトリクスW287株が挙げられるが、特にW450株が好ましい。

【0019】

W450株は、兵庫県城崎町の自然林内の林木(植物種は不明)上で形成されていた子座(胞子を形成するための構造物)に由来する単一の子のう胞子から単離された。単離方法は以下のとおりである。子座を着生していた木片ごと切り出し、軽く水道水で洗浄した後、滅菌した蒸留水で湿らせた濾紙を敷いたペトリ皿に入れた。一晚静置した後、子座の先端部分から溢れ出てきた子のう胞子を滅菌した白金針で掻きとり、200~500 ppmのストレプトマイシン硫酸塩を添加した1.5%素寒天培地に置いた。その2日後に実体顕微鏡下で発芽が確認できた単一の発芽子のう胞子を新たな培地に置床し、菌株とした。

【0020】

一方、W450株の菌学的性質は以下の通りである。W450株は、菌糸の隔壁近傍に洋ナシ状の膨張部を有する。寒天培地(ポテトデキストロース寒天培地、麦芽寒天培地、オートミール寒天培地など)上において、生育初期には菌糸は白色を呈するが、後に疑似菌核と称

10

20

30

40

50

される黒色の構造体を形成し、菌叢表面の全体又は一部が黒変する。また、上記寒天培地上における分生子及び子のう胞子の形成は認められない。

【0021】

W450株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(NPMD)(千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 NITEバイオテクノロジー本部 特許微生物寄託センター)に平成18年10月13日付で寄託されており、その受託番号はNITE P-269である。

【0022】

ロセリニア・ネカトリクスは、子のう菌類に属し、多くの植物に白紋羽病を引き起こすことが知られている(渡辺, 農林省指定試験(病虫害), 3, 1~110, 1963)。一方、W450株は、草本植物のキバナルピナス(Lupinus luteus)や木本植物のマルバカイドウ(リンゴ台木)(Malus prunifolia)等の植物に対して病原性を有さない。

10

【0023】

また、W450株は、ロセリニア・ネカトリクスの単一の子のう胞子に由来する菌株である。子のう胞子では、遺伝的な組換えが起こっているとみなされることから、W450株は遺伝的に病原性を失っていると考えられる。さらに、W450株の培地上及び土壤中での生長速度は、他の白紋羽病菌と変わらない。

【0024】

一方、木材チップとしては、その上で及び/又はその中で非病原性菌株が生育できるものであればいずれのものであってよく、例えば、剪定枝、伐採枝及び樹皮から作製したチップが挙げられる。木材チップ作製に使用する樹種は、果樹類であればいずれの種であってもよい。また、その他の木本植物についても広葉樹であれば、街路樹や緑化樹等の種から木材チップを作製することができる。さらに、針葉樹の樹皮から作製した木材チップも使用可能である。

20

【0025】

本発明で使用する木材チップは、市販のチップパー(木材破砕機)等を用いて破砕することにより作製できる。木材チップの大きさは、最大で2cm×5cm程度のものであるが、この場合、この大きさのものだけではなく、より小さな木材チップが同時に存在することが必要となる。例えば、1~1.5cm×1~1.5cm程度の大きさの木材チップが揃っていると、高い防除効果が得られると同時に、効果の持続期間も比較的長くなる。小さい大きさの木材チップに関して限度はないが、紛状に近くなればなるほど、効果の持続期間は短くなると考えられる。なお、チップパー等を用いて作製した木材チップは、作製直後から、作製後野積み

30

【0026】

以上に説明した非病原性菌株と木材チップとを用いて、本発明に係る白紋羽病防除剤を製造することができる。

【0027】

先ず、木材チップの準備では、木材チップを天日乾燥又は風乾により自然乾燥させ、小動物の除去を行い、また微生物の一部を死滅させる。次いで、乾燥させた木材チップを、市販の高圧蒸気滅菌器等を用いて滅菌処理する。木材チップの大きさや容量にも左右されるが、大きめの木材チップで例えば10~20L分を処理する場合等では、121℃で2時間処理する。あるいは、100℃以下の熱処理でも可能であり、例えば、約60℃の恒温器に入れて数日間処理するか、又は熱い湯に数時間~1日間浸漬するといった処理を行う。

40

【0028】

また、木材チップの含水率は、例えば10~35%(v/v)になるように蒸留水で調整する。例えば、木材チップの含水率は、肉眼又は触感で十分に湿っていると判断できる範囲であればよい。ただし、内部にまで十分に水分が浸透するように留意する。上述の滅菌処理において、高圧滅菌を使用する場合は、滅菌処理の際に蒸留水を加えておく。

【0029】

非病原性菌株の接種源の作製では、基質として、小さめの木材チップ(大きさ5mm×5mm以下)又は広葉樹材のおが屑等を蒸留水で含水率20~25%に調整した後に高圧滅菌処理し

50

たものを用いる。一方、非病原性菌株としては、例えば、非病原性菌株を培養した寒天培地片(大きさ約5mm×5mm、使用する寒天培地は一般的なものであれば特に限定されない)をオートミール寒天培地上で1週間培養し、2cm×2cmに切り取った寒天片を使用する。あるいは、非病原性菌株を培養した上記と同様の寒天培地片を滅菌処理した果樹類等の広葉樹の枝片(径0.7~1cm、長さ約2cm)上で2週間培養したものを非病原性菌株として使用する。次いで、得られた非病原性菌株(非病原性菌株が培養された寒天片や枝片)を上記した基質(滅菌木材チップ又は滅菌おが屑)の中心部に置く。接種後1ヶ月間、20~25℃で、暗黒条件下で培養し、得られた培養物を接種源とする。この接種源は、乾燥を避けながら冷暗所で保存すると1年間は使用できる。また、冷蔵庫保存では2年間程度は使用可能である。

#### 【0030】

次いで、木材チップに非病原性菌株の接種源を接種し、培養する。非病原性菌株の接種源は、木材チップ量当たり2容量%~4容量%に相当する量とする。培養は、接種源の作製の際の滅菌処理に用いたものと同様の耐熱容器又は耐熱袋において行う。先ず、滅菌したピンセット等で細かくほぐした非病原性菌株の接種源を、滅菌処理した木材チップ上に散りばめるように加える。その後、軽く容器又は袋全体を揺すって接種源が木材チップ全体に行き渡るようにする。なお、乾燥を防ぐためにフタ又は袋口をシールする。この際、なるべく空気が入るようにし、また培養途中で空気の入れ換えをすることが好ましい。その後、2~3ヶ月間、20~25℃の暗黒条件下で培養し、得られた培養物を本発明に係る白紋羽病防除剤とすることができる。このように得られた本発明に係る白紋羽病防除剤は、乾燥を避けながら冷暗所で保存すると1年間は使用できる。また、冷蔵庫保存では2年間程度は使用可能である。

#### 【0031】

なお、本発明に係る白紋羽病防除剤には、木材チップ上に生育した非病原性菌株以外に、例えば、白紋羽病菌に対して拮抗性を示す糸状菌類(例えばトリコデルマ(*Trichoderma*)属やグリオクラディウム(*GlIOClaDIum*)属菌)、白紋羽病菌に対して競合性を示す糸状菌類(例えば、材質腐朽菌類)を用いた資材を含有することができる。

#### 【0032】

一方、本発明に係る白紋羽病防除剤を植物が生育する土壤に施用することで、植物を、白紋羽病菌の着生及び白紋羽病の発病から防御することができる。従って、本発明に係る白紋羽病防除剤は、開墾後新たに植栽する新植樹、あるいは白紋羽病による罹病樹の伐根後に別の樹に植え替える改植樹に有効である。また、既に植栽されている樹に対しても白紋羽病に罹病する可能性が高い樹(例えば、白紋羽病に罹病している樹が隣接している樹)に対しても有効である。さらに、既に植栽され、且つ白紋羽病に罹病している樹に対しても、罹病部の切除後であれば利用可能である。なお、対象となる植物としては、例えば、バラ科、ブドウ科、ミカン科、ツバキ科、ブナ科及びニレ科に属する植物が挙げられる。

#### 【0033】

本発明に係る白紋羽病防除剤の土壤への混和量は、植栽場所の状況に応じて決定することができる。例えば、白紋羽病の発病の可能性が大きい場合(白紋羽病罹病樹に隣接した場所に植栽する場合や白紋羽病の発生跡地に植栽する場合など)では、本発明に係る白紋羽病防除剤量は、土壤体積比20~25%とする。また、白紋羽病の発病の可能性は小さいが予防的な処理を行う場合(隣接樹ではないが同じ敷地内の他の樹で白紋羽病の発病が確認されている場合など)には、本発明に係る白紋羽病防除剤量は、土壤体積比15~20%とする。さらに、白紋羽病の発病の可能性は極めて小さいが予防的な処理を行う場合(同じ敷地内での白紋羽病の発病がない場合など)では、本発明に係る白紋羽病防除剤量は、土壤体積比7.5~10%とする。

#### 【0034】

図1には、本発明に係る白紋羽病防除剤の施用手順の例を示す。

本発明に係る白紋羽病防除剤の施用において、新植樹や改植樹の場合(図1A)では、先ず、植栽用の穴を掘る。次いで、本発明に係る白紋羽病防除剤を掘り上げた土壤に適量混和する。混和後の本発明に係る白紋羽病防除剤を含む土壤を用いて、樹を植え付け、さら

10

20

30

40

50

に灌水を行う。なお、次回以降の施用では、根の伸長に合わせて施用する範囲を広げるとより高い効果が得られる。

【0035】

一方、既存樹(罹病樹)の場合(図1B)では、罹病根を中心にその大きさに合わせて穴を掘り、罹病根を完全に露出させる。次いで、罹病部を削り取るか、あるいは罹病して枯死した罹病根を取り除く。さらに、本発明に係る白紋羽病防除剤を掘り上げた土壤に適量混和するか、あるいは本発明に係る白紋羽病防除剤を罹病根に直接まぶす。そして、混和した場合には、混和後の本発明に係る白紋羽病防除剤を含む土壤を穴に埋め戻し、灌水を行う。あるいは、罹病根に直接まぶした場合には、掘り上げた土壤を穴に埋め戻し、灌水を行う。なお、次回以降の施用又は1回目の施用の際、罹病根以外の根部周辺の土壤にも本

10

【0036】

さらに、既存樹(健全樹)の場合では、主根部を中心に穴を掘る。次いで、本発明に係る白紋羽病防除剤を掘り上げた土壤に適量混和する。混和後の本発明に係る白紋羽病防除剤を含む土壤を穴に埋め戻し、灌水を行う。なお、次回以降の施用又は1回目の施用の際、罹病根以外の根部周辺の土壤にも本発明に係る白紋羽病防除剤を施用するとより高い効果が得られる。

【0037】

本発明に係る白紋羽病防除剤に含まれる非病原性菌株は植物体に対しては病原性を有さないものの、傷付いた植物組織に対しては影響を及ぼす可能性がある。従って、本発明に係る白紋羽病防除剤の施用時期として、植物の生育期はなるべく避け、例えば休眠期(晩秋～初春)とすることが望ましい。

20

【0038】

また、本発明に係る白紋羽病防除剤による効果の持続期間は、使用する木材チップの大きさに依存し、大きめの木材チップを用いた場合でおおよそ2年であり、小さめの木材チップでは1年である。それ以降の期間では、漸次、効果が低下することが予想される。従って、本発明に係る白紋羽病防除剤は、高い効果を持続するためには毎年～隔年施用することが望ましい。

【0039】

以上に説明した本発明に係る白紋羽病防除剤によれば、白紋羽病の防除を達成できる。同時に、本発明に係る白紋羽病防除剤には、木材チップとして例えば果樹剪定枝を使用することから、果樹剪定枝の処理問題の解決の一助となり、本発明は、環境にやさしい防除技術である。また、本発明に係る白紋羽病防除剤は、肥料効果も有する。

30

【0040】

さらに、本発明に係る白紋羽病防除剤によれば、木材チップを腐朽させて生成される物質を土壤に還元するので、資源の循環利用も期待される。

【実施例】

【0041】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

40

【0042】

W450株(非病原性菌株)を培養した剪定枝チップを用いた病原性菌株(白紋羽病菌)による白紋羽病発病の抑止試験

本実施例では、W450株を培養した剪定枝チップを用いた病原性菌株による白紋羽病発病の抑止試験を行った。なお、当該実験の手順を図2に示す。

【0043】

〔実施例1〕

W450株を培養したナシ剪定枝チップ(培養前乾燥重量60g)を、茨城県つくば市にある独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所構内の圃場土壤5Lに混和した。次いで、混和した土壤に、マルバカイドウ2年生挿し木苗をビニールポット(3号)に移植し、

50

2週間育成した。

【0044】

2週間の育成後、一旦ポットから挿し木苗を土壌ごと取り出し、その底部に、W563株(病原性菌株)を1ヶ月培養したナシ枝片(径0.7~1cm、長さ2~2.5cm)2個を置いた後、元に戻した(W450チップ区)。一方、対照区として剪定枝チップを混和していない土壌を用いた(対照区)。なお、各区において、18植物個体を用いた。

【0045】

接種2ヶ月後に、根部を掘り上げて根冠部におけるW563株による菌系の着生及び発病の有無を調査した。結果を図3に示す。図3には、W450チップ区及び対照区でのW563株の菌糸着生率及び罹病率を示す。

10

【0046】

図3に示すように、対照区では、全ての供試植物個体で発病が認められ、W563株の菌糸着生率及び罹病率が共に100%だったのに対し、W450チップ区では、W563株の菌糸着生率が66.7%、罹病率は44.4%であった。

【0047】

〔実施例2〕

実施例1と同様の試験を、W450株培養剪定枝チップの土壌への混和量を増やして行う共に、比較として未滅菌の剪定枝チップ(W450株を培養していない)を土壌に混和した試験区(チップ区)を設定した。

【0048】

W450株を培養したナシ剪定枝チップ(乾燥重量180g)を、圃場土壌5Lに混和した。次いで、混和した土壌に、マルバカイドウ2年生挿し木苗をビニールポットに移植し、2週間育成した。

20

【0049】

2週間の育成後、一旦ポットから挿し木苗を土壌ごと取り出し、その底部に、W563株(病原性菌株)を1ヶ月培養したナシ枝片2個を置いた後、元に戻した(W450チップ区)。一方、対照区として剪定枝チップを混和していない土壌を用いた(対照区)。あるいは、未滅菌剪定枝チップ(乾燥重量180g)を土壌に混和した区(チップ区)を設けた。なお、各区において、12植物個体を用いた。

【0050】

接種3ヶ月後に、根部を掘り上げて根冠部におけるW563株による菌系の着生及び発病の有無を調査した。結果を図4に示す。図4には、W450チップ区、チップ区及び対照区でのW563株の菌糸着生率及び罹病率を示す。

30

【0051】

図4に示すように、対照区では、全ての供試植物個体で発病が認められ、W563株の菌糸着生率及び罹病率が共に100%だった。チップ区では、W563株の菌糸着生率は91.7%、罹病率は83.3%であった。一方、W450チップ区では、全ての植物個体で、発病も菌系の着生も認められず、W563株の菌糸着生率及び罹病率が共に0%であった。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】図1は、本発明に係る白紋羽病防除剤の施用手順の例を示す。

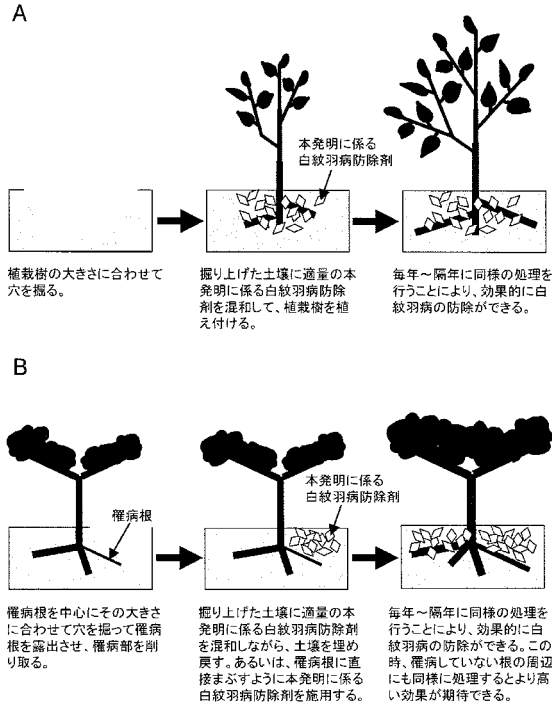
【図2】図2は、W450株を培養した剪定枝チップを用いた病原性菌株による白紋羽病発病の抑止試験の手順を示す。

【図3】図3は、実施例1における、W450チップ区及び対照区でのW563株の菌糸着生率及び罹病率を示す。

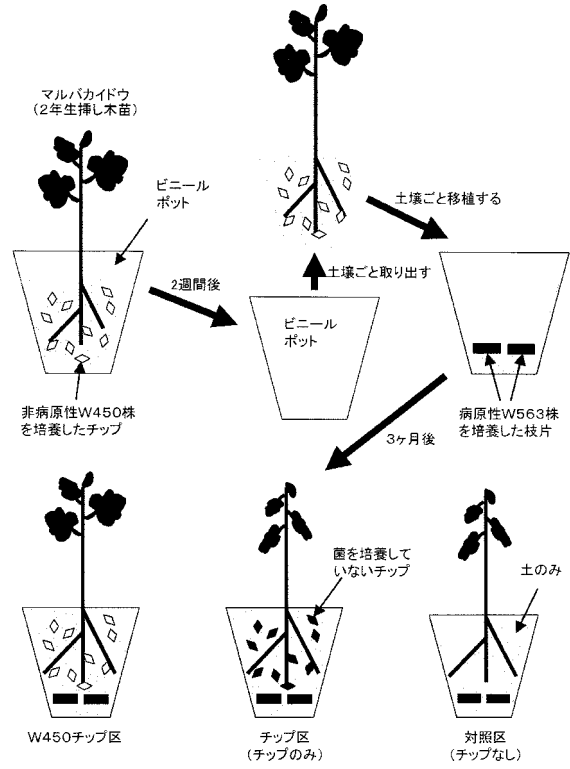
【図4】図4は、実施例2における、W450チップ区、チップ区及び対照区でのW563株の菌糸着生率及び罹病率を示す。

40

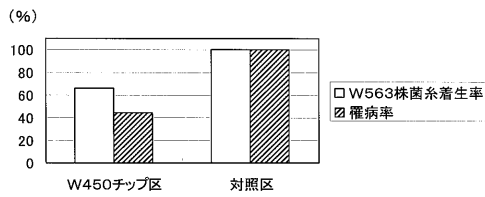
【図1】



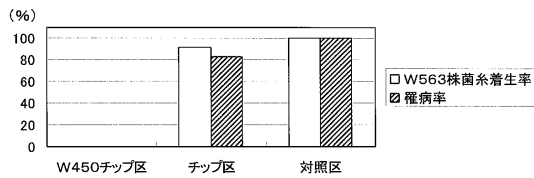
【図2】



【図3】



【図4】





---

フロントページの続き

(72)発明者 吉田 幸二

茨城県つくば市藤本2-1 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所内

審査官 馬籠 朋広

(56)参考文献 特開2002-218968(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A01N 63/00

A01G 7/00

C12N 1/14

CA/REGISTRY(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)