

(由本局填寫)

|        |
|--------|
| 承辦人代碼： |
| 大類：    |
| IPC分類： |

A6  
B6

本案已向：

|       |              |            |  |
|-------|--------------|------------|--|
| 國(地區) | 申請專利, 申請日期:  | 案號:        | , <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無主張優先權 |
| 美國    | 2001年 4月 16日 | 60/283,902 | <input checked="" type="checkbox"/> 有主張優先權                   |
| 美國    | 2002年 3月 11日 | 60/363,072 | <input checked="" type="checkbox"/> 有主張優先權                   |

|            |             |             |
|------------|-------------|-------------|
| 有關微生物已寄存於: | , 寄存日期:     | , 寄存號碼:     |
| 食品工業發展研究所  | 2002年 7月 8日 | CCRC 930054 |
| 食品工業發展研究所  | 2002年 7月 8日 | CCRC 930055 |

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

## 五、發明說明 ( 1 )

### 相關申請案之交叉參考：

本發明根據美國憲法第 35 U . S . C . § 119 ( e ) 條主張分別於 2001 年四月 16 日及 2002 年三月 11 日提出申請之美國專利臨時申請案第 60 / 283 , 902 號及第 60 / 363 , 072 號之權益。此等申請案之內容在此併入本發明之揭示以為參考。

### 發明領域：

本發明係關於能產製揮發性抗生素之新穎真菌的分離。此等揮發性物質對於植物、人類病原性真菌及細菌、昆蟲及線蟲類具有生物活性。

### 發明背景：

這整個申請案參照了多件文獻及書籍，其可由作者身份來源及日期得知。全部文獻之完整參考書目引用出處可見於本說明書最末部份，申請專利範圍的前方之處。

習知地真菌可產生抗生素，其可用在治療疾病、工業應用及作為殺蟲劑，此等抗生素有例如青黴素、頭孢子菌素、四環黴素及環孢子菌素等，但其並無一者具有揮發性。許多真菌菌種已知能釋放出低濃度的氣態物質，特別是具有獨特惡臭氣味的氣態物質，此現象促使對該等真菌性揮發物質進行化學分析 ( Bjurman 等人，1992 )。有些此等揮發性物質是許多種真菌都後產生的，但是其它物質

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 4 )

出的化合物所組成。在人造氣體之例中係將微生物暴露在 3 . 2 - 9 0 微升 / 毫升之人造化合物混合物下再測量微生物生長情形以得到 I C<sub>50</sub> 值。諸微生物相對於對照組之 % 生長率及活性係在暴露到 6 0 微升 / 毫升混合氣體下測量。活性係在移除化合物 3 天後才測定。

表 2 顯示使用蛭石種植一週後每一個花盆內甘藍菜植株的平均數目 ( 平均值 ± 標準差 ) 。盆栽係不經過儲存期便立刻播種。

表 3 顯示測定 M. albus 控制蘋果藍霉之活性的實驗結果。

表 4 顯示對 M. albus 產製之揮發性化合物之 G S / M S 分析結果。由於數個小峰及突破峰僅佔總面積的 1 % , 所以在總分析中省略掉該等峰。在此表中並沒有包括在控制組 P D A 平板所發現到的化合物。

表 5 顯示測定各類揮發性化合物之抑制效果之檢定結果。此結果係將各類化合物存在下測試微生物生長情形與不存在測試化合物下的對照組作比較, 而以測試微生物生長 % 來表示。測試時該等化合物之濃度為 M. albus 最佳測試濃度 6 0 微升 / 5 0 毫升空氣空間或 1 . 2 微升 / 毫升之濃度下該等化合物之相對濃度, 受試微生物係在該相對濃度下暴露兩天。

表 6 顯示使用 M. albus 揮發物質來處理感染黑穗病之大麥種子。使用未經處理之種子及無感染種子組作為對照組。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 5 )

### 進行本發明之模式：

於這整個發明揭示中，會確切指出引用出處來參照不同的文獻、專利及已公開之專利說明書。此等文獻、專利及已公開之專利說明書之揭示在此併入本發明之揭示以為參考且更完整地描述本發明所屬技術領域的狀態。

除非另有說明，否則本發明之施行係採用分子生物學（包括重組技術）、微生物學、細胞生物學、生物化學及免疫學之習知技藝，其係在本發明技術技巧範圍內。此等技藝在文件中有完整地解釋。此等方法係描述在如下文獻裡，可參考例如 Sambrook 等人，MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第二版(1989); CURRENT PROTOPOLS IN MOLECULAR BIOLGY (F. M. Ausubel 等人編纂(1987)); 如下系列 METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); PCR: A PRACTICAL APPROACH (M. MacPherson 等人, 牛津大學出版社 IRL 出版(1991)); 及 PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames & G. R. Taulor 編纂(1995))。

### 定義：

除非在文章內容中有清楚的指示，否則本文所用之單數形式，“一”、“一件”及“該”等用法亦包含其複數形式。例如，術語“一個細胞”還包括了多個細胞的情形，及其混合之情形。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 6 )

術語”包含 ( comprising ) ” 係意指含有所引述之元件之組成物及方法，不過並沒有排除掉其它的成份。當使用”基本上係由……所組成 ( consisting essentially of ) ” 來定義組成物及方法時，應意指排除掉對此等組合有任何根本影響之其它元件。所以根據此處之定義，”一種基本上含有該等元件之組成物”並沒有排除掉在分離及純化方法中及農藝上可接受載體上微量污染的情事。”由……所組成 ( consisting of ) ” 應意指排除掉微量元件之外的其它成份及施用本發明組成物實質方法步驟以外之步驟。各種此等轉變術語所定義之具體例係包括在本發明之範圍內。

在此使用時，”生物性控制”係定義成藉著利用第二種有機體來控制一種病原體或昆蟲。已知的生物控制機制包括腸細菌，其可藉著與外競爭性真菌競爭根的表面積來控制根的腐敗。細菌性毒素如抗生素已被用來控制病原體。可將該等毒素分離出來且直接施用在該植物上，或者可施用細菌菌種而讓細菌就地產製毒素。

術語”真菌”或”諸真菌”包括多種缺乏葉綠素、且具有含細胞核孢子之有機體。真菌之實例包括有酵母菌、絨毛狀的黴 ( molds )、寄生性的黴 ( mildews )、鏽病黴 ( rusts ) 及蕈類。

術語”細菌”包括任何不具有明顯細胞核的原核性有機體。

“殺害蟲性的”意指物質可以增加植物體害蟲死亡率或抑制其生長速率的能力。

訂

## 五、發明說明 ( 7 )

“殺真菌性的”意指物質可以增加真菌死亡率或抑制其生長速率的能力。

“殺昆蟲性的”意指物質可以增加昆蟲或其幼蟲死亡率或抑制其生長速率的能力。

“殺細菌性的”意指物質可以增加細菌死亡率或抑制其生長速率的能力。

“殺線蟲性的”意指物質可以增加線蟲死亡率或抑制其生長速率的能力。

“抗生素”包括所有能殺死或抑制微生物之物質。抗生素可由微生物所產生或藉合成或半合成製程來產製。所以該術語包含了能抑制或殺死真菌的物質如環己醯亞胺、耐司特丁 ( nystatin ) 。

術語“培育”意指使有機體在不同培養基上或之內增殖。“全肉湯培養液 ( whole broth culture ) ”係指含有細胞及培養基之液體培養液。“上清液”係指將生長在肉湯內的細胞藉著離心、過濾、沉澱或其它此技術習知的方法去除掉以後剩下的液體肉湯。

“有效份量”係足以造成有益或所需結果之份量。一有效份量可藉著一次或多次投藥來給予。在治療處理及預防的術語中，“一有效份量”係足以使得標的感染或疾病狀態和緩、安定、逆行、減慢或延緩其病程進展之份量。

“正對照組”係指習知具有殺害蟲活性之化合物。“正對照組”包括但不限於市售之化學性殺蟲劑。“負對照組”為不具有殺害蟲活性之化合物。負對照組之實例有水

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 8 )

及醋酸乙酯。

術語“代謝物”或“揮發物質”係指任何具有生物活性且由微生物醱酵生成之化合物、物質或副產物。在多數例中揮發物質在室溫及大氣壓力下會立刻揮發掉。

術語“突變株”係指母株的變異株以及獲得突變株或變異株的方法，該等突變株或變異株所需之生物活性係與母株所表現之活性很類似。“母株”在此係定義成突變作用前之原始 Muscodor 菌株。突變株可在無人為干擾下自然產生。它們亦可藉由多種方法及熟悉此技術人士習知之組成物處理來獲得。例如，母株可用化學物質如 N - 甲基 - N' - 硝基 - N - 亞硝基胍、乙基甲烷碘，或使用伽瑪射線、X 光或 UV 輻射來照射，或藉著熟悉此技術之人士習知的其它方式來處理。

“組成物”係意指活性劑與其它化合物、載劑或其它組成之組合，該其它組成可為惰性者（如可偵測劑或標幟劑或液體載劑）或活性者，如佐劑之組合。下文中提供農藝可用載劑之實例。真菌亦可與載劑或另一選擇地與至少一種化學性或生物性殺蟲劑一起配方成組成物。

所有數字性的標示如 pH 值、溫度、時間、濃度及分子量等，包括所顯示的範圍，都只是約略值，其可有加減 0.1 的差異。應明瞭地，雖然未必總是有清楚的說明，但是所有數字性的標示都有術語“大約”置於其前方。亦應了解地，雖然未必總是有清楚的說明，但是在此所描述的試劑都僅是範例性的且其均等物為熟悉此技術者所習知

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 9 )

。為了要使本發明內的組成物有良好的分散性及黏附性，將整個肉湯培養液、上清液及／或揮發物質與有助於分散及黏附的成份一起配方可能較有利。適當的配方劑為熟悉此技術者所習知，其可為例如可濕化的散劑、粒劑等，或可被微包膠在適當的基質內，或為液體物質如水性流動液及水性懸浮液、揮發性組成物及可乳化濃縮液。其它適當的配方為熟悉此技術者所習知。

“變異株”為一種菌株，其具有本發明菌株所有鑑定性特徵且可藉著其基因體在高嚴苛性條件下可與本發明微生物之基因體雜交而被鑑定出來，本發明微生物基因體的部份序列已被寄存在 GenBank 寄存機構。”雜交”為一種反應，其中一或多條多核苷酸鏈係藉著核苷酸單元鹼基間形成氫鍵來安定而反應成一個複合體。該氫鍵可藉著華生－克雷克 (Watson-Crick) 鹼基配對作用、胡格司丁 (Hoogsteen) 結合或任何其它序列特異性方式來產生。該複合體可含有兩條形成雙螺旋結構之雙股，或含有形成多股複合體之三股或多股，單獨一條自雜交的單股，或此等情形之任何組合。雜交反應可在不同”嚴苛性”下進行。一般，低嚴苛性雜交反應係在約 40℃ 於 10X SSC 溶液或等張離子強度溶液／溫度下進行。中嚴苛性雜交反應係在約 50℃ 下於 6X SSC 溶液中進行且高嚴苛反應一般係在約 60℃ 下於 1X SSC 中進行。

一變異株亦可定義成一種具有與 *M. roseus* 或 *M. albus*

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 10 )

基因體序列具有超過 85% 相同性，更佳地超過 90% 相同性或最佳地超過 95% 相同性之基因體序列之菌株。一條多核苷酸或多核苷酸區域（或一條多肽或多肽區域）與另一條序列具有特定百分率（如 80%、85%、90% 或 95%）之“序列相同性”意指在經比對比較該兩條序列時，該兩條序列具有相同鹼基（或胺基酸）的百分率。此等比對作用及序列同質性或相同性之百分率可使用此技術習知的軟體，如述於 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 等人編纂, 1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1 部份者來測定。較佳地，在比對時採用缺陷參數（default parameters）。一種較佳的比對程式為 B L A S T，其有使用缺陷參數。更詳言之，較佳的程式為 B L A S T N 及 B L A S T P，其使用如下缺陷參數：基因碼 = 標準型；過濾 = 無；股鏈 = 兩者；截止值 = 60；期望值 = 10；矩陣 = B L O S U M 6 2；說明 = 50 個序列；蒐尋 = H I G H S C O R E；資料庫 = 無重覆性，GenBank + E M B L + D D B J + P D B + GenBank C D S translations + SwissProtein + Spupdate + P I R。此等程式之詳細內容可見於如下網際網路網址：[www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST)。

本案申請人現已分離出一種新穎且命名為 Muscodor 之真菌且為其鑑定過相關特性。兩種新穎的 Muscodor 已被分離出來且鑑定相關特性，及 Muscodor albus 及 Muscodor

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 卅 )

roseus。Muscodor albus 之部份基因體序列係示於序列辨識碼：第 1 號及第 2 號 ( S E Q I D N O S : 1 及 2 ) 且 Muscodor roseus ( 標示為 A 3 - 5 ) 之部份基因體序列係示於 S E Q I D N O S : 3 及 4 。同樣也得到 M. roseus ( A 1 0 ) 之部份基因體序列。一件 M. albus 之分離培養物以寄存在 N R R L 且其寄存編號為第 3 0 5 4 7 號。一件標示為 A 3 - 5 之 M. roseus 之分離培養物亦寄存在 N R R L 且其寄存編號為 3 0 5 4 8 。所以，本發明提供一種已分離出來且名為 Muscodor 之新穎真菌及其兩個菌種 - M. albus 及 M. roseus, 及其突變株。

本發明亦提供由該分離之 Muscodor 培養物所產製的氣體組成物 ( “揮發物質” ) 。於一項要點中，該揮發性組成物具有表 4 所引用之成份。該氣體組成物可與適當的分散劑或載劑結合。於另一項要點中，該組成物可任意地含有一有效份量之一或多種殺真菌劑、殺昆蟲劑、殺線蟲劑、殺微生物劑、殺菌劑或一種食品保存劑。

本案申請人亦鑑定出該揮發性副產物之成份且由市售材料加以合成。該合成性揮發物質之成份係述於表 4 。應了解地，雖然未必總是有清楚的說明，但是該合成性組成物可如在此所述之方法般係作為 Muscodor 真菌產製之天然氣體副產物之替代品或其另一種選擇般地來利用。

Muscodor 氣體會影響數種與人體健康有關之其它微生物。它對於包括 C. albicans ( 表 2 ) 及 A. fumigatus 及 Pseudomonas 菌種之人類主要的真菌及細菌病原體具有致命

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 12

性。其可殺死污染人類食物之細菌如 *S. aureus* 及大腸桿菌 (表 2)。還發現到該氣體對於 *Stachbotrys* 菌種 (家庭及公共建築物之污染者) 及若干腐木性真菌具致命性。

所以, 該真菌及該真菌產製之氣體可用來抑制真菌、細菌、微生物、線蟲及昆蟲等生物之生長或殺死該等生物。使用熟悉此技術者習知之方法, 可使得該真菌或其揮發性副產物以有效份量來與該等有機生物接觸以殺死或抑制該等生物之生長。另一選擇地, 該等真菌或其揮發性副產物可用來處理人類或動物體排泄廢物, 如用來作為廢水或固體廢棄物管理或處理時的一項成份。它們亦可用來去除人類或動物體排泄廢物之污染, 例如用來減少或去除掉細菌及真菌的污染。再者, 該真菌及/或其揮發性氣體副產物可藉著將建築物、建材及建材間隙用有效份量之該揮發性副產物接觸來處理或預防建材及建築物內的有毒黴菌。僅係舉例性地, 有效份量之該揮發性副產物可在室內或在整棟建築物進行煙燻消毒時單獨使用或將其與其它煙燻消毒劑組合使用。

當應用在農藝上的用途時, 本發明提供一種處理或預防水果、種籽、植物或植物週圍的土壤免於受到真菌、細菌、微生物及昆蟲感染之方法, 其係用有效份量之 *Muscodor* 分離培養物或其揮發性副產物來與該等微生物接觸。

本發明進一步提供鑑定新穎 *Muscodor* 真菌的方法, 其包含將有效份量之欲篩選之真菌於培養條件下與 *M. albus*

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 13 )

或 *M. roseus* 之揮發性物質接觸且篩選出對 *M. albus* 或 *M. rosceus* 之揮發性物質具有耐受性之真菌，藉此便可鑑定出新穎的 *Muscodor* 真菌。本發明進一步提供藉此方法篩選出來之 *Muscodor* 分離真菌。

本發明還提供獲得一種揮發性組成物之方法，其係將本發明分離之 *Muscodor* 真菌予以培育且收集 *Muscodor* 生長期間產製的揮發性組成物。

提供如下實施例以顯示本發明。該等實施例並不具有限制性。

### 實施例

#### 實施例 1 - 真菌的分離

##### *Muscodor albus*

於 1997 年秋天，從位於宏都拉斯，La Ceiba 以西 20 哩處之成熟的 *Cinnamomum zeylamicum* 樹木取下數小段枝幹且立刻運回蒙大拿州立大學。將該等枝幹上數小片內側樹皮、邊材及外側的韌皮部組織無菌性地取下來且置放到含有水洋菜之培養皿中 (Strobel 等人, 1996)。於培育數天後，將發展出之真菌的菌絲頂端無菌地移除出來且置於馬鈴薯右旋糖洋菜 (PDA) 中。此外，在 7 天後將真菌菌落轉移到以伽瑪射線照射過之康乃馨葉上 (0.5 x 0.5 公分) 來促使孢子形成。在所分離的數種真菌中有一種真菌由於其具有腐臭的氣味特別受到注意，其被分離出來且標示為 "第 620 號" 且隨後被鑑定為

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 14

*Muscodor albus*。

*Muscodor roseus*

從澳洲北域南緯  $12^{\circ}59'39''$  及東經  $132^{\circ}28'50''$  處之蕨葉狀 *Grevellia* (*Grevillea pteridifolia*) 之數小段枝幹上分離出真菌。將小枝幹 (直徑 0.5 公分) 上數小片內側樹皮、邊材及外側的韌皮部組織無菌性地取下來且置放到含有水洋菜之培養皿中 (Strobel 等人, 1996)。於培育數天後, 將發展出之真菌的菌絲頂端無菌地移除出來且置於馬鈴薯右旋糖洋菜 (PDA) 中。此外, 在 7 天後將真菌菌落轉移到以伽瑪射線照射過之康乃馨葉及其它植物材料上 (0.5 x 0.5 公分) 來促使孢子形成。在所分離的數種真菌中有一種真菌由於其具有腐臭的氣味特別受到注意, 其被分離出來且標示為 "A3-5"。

還有一株 *Muscodor* 係從南緯  $15^{\circ}29'29''$  及東經  $131^{\circ}23'12''$  處之澳洲鐵木 (*Erythrophelum chlorostachys*) 的小枝幹上獲得的。此內生植物係使用 *M. albus* 之揮發性物質作為篩選工具而分離出來。該等藉以分離出內生植物之植物材料係藉著將快速生長之兩週齡 *M. albus* 培養物放置在欲篩選之真菌的同一洋菜板中來置放到該培養皿中。而後, 從該植物材料中唯一發展出的生物便是對 *M. albus* 具有耐受性之生物, 其可能為木生菌 (*xyleriaceous*) 族中其它揮發性抗生素之產製者或為 *M.*

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 15

albus 之親戚 ( Strobel 等人, 2001 )。從該等樹木中最常分離出的內生植物為 Pestalotiopsis 菌株及其它 Xylaria 菌株。該分離出的生物在此研究內被標示為 " A - 10 "。

### 實施例 2 真菌的生長及儲存

該等真菌係生長在多種不同的培養基中, 包括胰蛋白酶之大豆肉湯洋菜基 ( T S B A )、玉米碎粉洋菜基 ( C M A )、麥芽洋菜基 ( M A )、馬鈴薯右旋糖洋菜基 ( P D A ), 其係由密西根州底特律市之 Difco, Laboratories 所提供。爲了要促使孢子形成, 所以也將真菌培育在各別含有西方白柏 ( Pinus monticola )、黑胡桃 ( Juglans nigra ) 及楓樹 ( Acer saccharum ) 之小片木材刨片及 C. zeylanicum 之樹皮片樣本之水洋菜培養皿中。

爲了要測定如何能最佳地保存分離物 620 號, 所以嘗試了數種不同條件。將無菌之華特曼 1 號圓形濾紙置於 P D A 培養皿的表面, 使得真菌在該圓形濾紙上生長。該真菌係以洋菜栓塊的形式被接種到 P D A 培養皿上之圓形濾紙的中央, 將培養皿製於 22 °C 下培育 14 天。將圓形濾紙取出且於無菌條件下放置在薄層狀流動罩下 1 天, 或直到具有真菌菌絲體的濾紙乾燥爲止。然後將圓形濾紙切成許多小片且於不同條件下儲存。同樣地, 將含有真菌的洋菜栓塊置於無菌蒸餾水中且於 4 °C 下儲存。於另一組測試條件中, 係將生長在洋菜上的真菌菌絲小片置於 15 % 甘油中且儲存在 -70 °C 下。在每一種測試中, 真菌活性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 16 )

的測試係藉著將菌絲片段置於 P D A 平板上，於 3 - 4 天後檢查真菌生長的情形。

爲了要測定如何能最佳地保存 *M. roseus* 分離物（內部係標示成 " A 3 - 5 及 A 1 0 ”），所以嘗試了數種不同條件。將無菌之華特曼 1 號圓形濾紙置於 P D A 培養皿的表面，使得真菌在該圓形濾紙上生長。該真菌係以洋菜栓塊的形式被接種到 P D A 培養皿上之圓形濾紙的中央，將培養皿製於 22 °C 下培育 1 4 天。將圓形濾紙取出且於無菌條件下放置在薄層狀流動罩下 1 天，或直到具有真菌菌絲體的濾紙乾燥爲止。然後將圓形濾紙切成小片且儲存在 23 °C、4 °C、0 及 - 7 0 °C 下。同樣地，將含有真菌的洋菜栓塊置於無菌蒸餾水中且於 4 °C 下儲存。於另一組測試條件中，係將生長在洋菜上的真菌菌絲小片置於 1 5 % 甘油中且儲存在 - 7 0 °C 下。在每一種測試中，真菌活性的測試係藉著將菌絲片段置於 P D A 平板上，於 3 - 4 天後檢查真菌生長的情形。

### 實施例 3 真菌 D N A 之分離

用於 D N A 分離時，所有的真菌都是在 1 . 5 毫升之馬鈴薯右旋糖肉湯（P D A）內於 23 °C 下生長 1 8 到 2 4 小時。藉離心收獲菌絲體且用無菌 d d H<sub>2</sub>O 清洗兩次。藉 Lee and Taylor（1 9 9 0）的方法來萃取出所有的基因體 D N A。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

## 五、發明說明 ( 17

## 實施例 4 18S 核糖體 DNA 之擴增

各真菌 18S rDNA 基因之部份核苷酸鹼基對片段係藉著聚合酶連鎖反應 (PCR) 以單一片段與引子 UK4F (5' CYGGTTGATCCTGCCRG) 及 UREV (5' GYTACCTTGACGAAC TT) 來擴增。PCR 係在 50 微升反應管中進行，其內含有 0.1 微克基因體 DNA，各引子 0.4  $\mu$ M，0.16 mM 四種 dNTPs 及 5  $\mu$  Taq 聚合酶 (Promega) 於含有 10 mM Tris-HCl (pH 9.0 於 25  $^{\circ}$ C)，50 mM KCl，3 mM MgCl<sub>2</sub>，0.1% Triton X-100 之緩衝液中。擴增作用係進行 30 回循環 (45 s 於 94.5  $^{\circ}$ C，45 s 於 53.5  $^{\circ}$ C，90 s 於 72.5  $^{\circ}$ C)。

## 實施例 5 內部轉錄間隙序列 (Internal Transcribed Space sequences, ITS) 及 5.8S rDNA 之擴增

測試真菌之 ITS 區域係使用 PCR 及通用 ITS 引子 ITS5 (5' GGAAAGTAAAGTCGTAACAAGG) 及 ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC (White 等人, 1990) 來擴增。PCR 係在 50 微升反應管中進行，其內含有 0.1 微克基因體 DNA，各引子 0.4  $\mu$ M，0.16 mM 四種 dNTPs 及 5  $\mu$  Taq 聚合酶 (Promega) 於含有 10 mM Tris-HCl (pH 9.0 於 25  $^{\circ}$ C)，50 mM KCl，3 mM MgCl<sub>2</sub> 及 0.1%

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 18 )

Triton X - 100 之緩衝液中。PCR 循環條件係由 94 °C 下變性 1 . 5 分鐘，55 °C 下煉合 55 分鐘及在 72 °C 下延展 3 分鐘所組成且進行 40 回循環，最後一次延展係於 72 °C 下進行 10 分鐘 ( Willits, 1999 ) 。該 PCR 產物係用凝膠來純化且使用 QuickStep PCR 純化套組 ( Edge Biosystems ) 來脫鹽。

實施例 6 蒐尋及比對 18 S rDNA 及 ITS 1 & 2 序列

*Muscodor albus*

分別以序號 AF 324337 及 AF 324336 來將 *M. albus* 之 18 S rDNA 及 ITS 1 - 2 序列輸入 GenBank 中。此等序列亦用 BLAST 2 . 1 來蒐尋且與其它真菌序列進行比對且在網址

[www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) 用 NCBI 蒐尋。使用 Clustal W 版本 1 . 7 ( Thomson, J. and Gibson T., 1997 ) 來進行比較及比對序列，稍後以人工進行比對。

使用 PAU\* ( Swofford, 1999 ) 來進行具有探索蒐尋及最大化簡約保守式探索蒐尋之最大化簡約式解答法 ( Maximum parsimony bootstrap method, Felsenstein, 1985 ) 。該解答分析說明如下：100 回重複，樹狀二分 - 重接分枝交換，及隨機序列增添。所有字元均同樣重要。參考分類別：Taphrinales: *Protomyces inouyei* ( GenBank 序號 D11377 ) ， *Taphrina wiesneri* ( D12531 ) ， T.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 19 )

deformans(U00971)及 *T. pruni-subcordatae*(AB000957)。

*Muscodor roseus*

分別以序號 A Y 0 3 4 6 6 4 及 A Y 0 3 4 6 6 5 來將培養物收集體 " A 3 - 5 " 之 1 8 S r D N A 及 I T S 1 & 2 序列輸入 GenBank 中。同時分離株 " A - 1 0 " 之 1 8 S r D N A 則用 A Y 0 4 9 0 2 3 來表示。此外, " A 3 - 5 " 菌株之 1 8 S r D N A 及 I T S 1 & 2 序列亦用 B L A S T 2 . 1 ( Altschul 等人, 1 9 9 7 ) 來與其它真菌序列進行蒐尋比對, 且在網址 [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) 作 N C B I 蒐尋。使用 CLUSTALW 版本 1 . 7 ( Thomson and Gibson, 1997 ) 來進行比較及比對序列, 稍後再以人工進行比對。

在部份 1 8 S r D N A 序列中被比對出的 1 7 0 8 b p 序列之系統發生分析係使用系統發生簡約分析 ( Phylogeny Using Parsimony Analysis, PAUP\* ) 程式第 4 . 0 b 4 a 版 ( Swofford, 1999 ) 之最大化簡約分析來進行。簡約資料字元之數目為 1 9 0 , 及 1 4 4 8 個字元且為定數。該系統發生分析包括參考分類別時共對十八組分類別作分析。參考分類別有: *Traphinales: Taphrina wiesneri* ( GenBank accession number D12531 ), *Taphrina deformans* ( U00971 ) and *Taphrina pruni-subcordatae* ( AB000957 ) 。而剩餘的 1 5 個菌種則為: *Muscodor albus* ( AF324337 ), *Muscodor roseus* ( AY034664 ), *Xylaria carpophila*

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 20

(Z49785), *X. curta* (U32417), *X. hypoxylon* (U20378), *X. polymorpha* (AB014043), *Xylaria* sp. (AB014042), *Rosellinia necatrix* (AB014044), *Poronia punctata* (AF064052), *Daldinia concentrica* (U32402), *Hypoxylon fragiforme* (AB014046) and *Hypoxylon atroroseus* (U32411), *Pestalosphaeria hansenii* (AF242846) *Discostroma tricellular* (AF346546) and *Amphisphaeria* sp. (AF346545)。該解答分析說明如下：

1 0 0 回重覆，樹狀二分－重接分枝交換，及隨機序列增添。所有字元均同樣重要。

### 實施例 7 *Muscodor albus* 產製之揮發性抗生素之分析

本案發明出一種方法來分析在培養皿中生長之 *M. albus* 菌絲體上方空間之氣體。其係使用一種“固相微萃取”針筒來捕捉該真菌之揮發性物質。其纖維材料 (Supelco) 為 50 / 30 二乙烯苯 / carburen 於聚二甲基矽氧烷於安定撓曲纖維上。該針筒係透過鑽在培養皿旁的小洞來接上且暴露於該氣相中 4 5 分鐘。然後將針筒插入配備有質量選擇性偵測器之氣體層析儀 (Hewlett Packard 5890 Series II Plus)。使用薄膜厚度 0.5 mm 之 30 m × 0.25 mm I. D. Z B W a x 毛細管來進行揮發性物質的分離。該管柱係以如下溫度來程式化：25 °C 達 2 分鐘繼而以 5 °C / 分鐘達到 220 °C。其載氣為超高純度氮氣 (局部分配器) 且初管柱頭端壓力為 50 k P a。在分離期間氮壓力係配合烤箱的溫度遞變來改變以保持恆定的載氣流速

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 21 )

。在捕捉該揮發性氣體以前，纖維先用氮氣流於 240 °C 下調整 20 分鐘。使用 30 秒注射時間來將樣本纖維引入該 GC 中。該氣體層析儀係與質量解析度 1500 之 VG 70E - HF 雙焦距磁性質譜儀交界。該 MS 係在 35 - 360 amu 之質量範圍下以 0.50 秒每單位質量衰變的速度掃瞄。數據的取得及數據分析係在 VG SIOS / OPUS 介面及軟體組件上進行。對於 M. albus 所產生之未知成份的初步鑑定係透過圖書館使用 NIST 資料庫來進行比較。

對於僅含有 PDA 之培養皿及由該處取得之化何物作比較性分析，所取得的化合物大部份為苯乙烯，其會從含有真菌平板之分析結果中減除掉。對 20 / 28 化合物最後的確認係使用在此所述的 GC / MS 方法依據對可靠標準物的比較結果來進行。然而，有約僅構成該揮發物質的 20 % 之其它 8 種化合物則僅僅試驗性地使用 NIST 資料庫的資訊來鑑定，而沒有包含任何採用 M. albus 化合物之人工混合物來進行之生物檢定。

於第一次概算後，對於真菌培養物所發現到的各種化合物的定量分析則係根據 GC / MS 分析後所得到的相對峰域面積。此數據係用來決定在培養 M. albus 時其所產製各氣體成份的相對比率，以製備 M. albus 氣體之人工混合氣體。

實施例 8 真菌揮發性氣體之來源探尋

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 22

由 *M. albus* 所產製的大多數化合物都可由 Aldrich Chem Co. 取得，不過 valencene 係得自 Fluka Chem Co. 且合成性 bulnesene 則係得自 Dr. Clayton Heathcock of U. C. Berkeley，化學系且可根據 Heathcock and Ratcliffe (1971) 的步驟來合成。

無法購買取得之其它酯則使用 Hoefle, G. 等人 ( 1978 ) 所述的醃化方法來製備。

丙酸，2-甲基，3-甲基丁基酯

將異丁醃氣 ( 2 毫升，19.1 毫莫耳 ) 緩慢地加到異戊醇 ( 1 毫升，9.5 毫莫耳 )，4-二甲胺基吡啶 ( 583 毫克，4.8 毫莫耳 ) 及吡啶 ( 0.85 毫升，10.5 毫莫耳 ) 於二氯甲烷之 0 °C 溶液。在完成加入 5 分鐘後沉澱物變得很明顯。於氬氣下攪拌 12 個小時後，將反應物傾倒到 20 毫升 0.1 N HCl 中。各層分離開來且將水層用 20 毫升氯化甲烷萃取。將有機層合併且用 10 毫升飽和氯化銨水溶液清洗，然後再用 10 毫升飽和碳酸氫鈉水溶液清洗。有機層再用硫酸鎂脫水，過濾且於真空濃縮。透過 14 mm Vigreux 管柱 ( b p 60 - 62 °C，25 mm ) 蒸餾純化。將所產生的澄清無色油用 Amberlyst 15 攪拌以去除掉任何殘留的異丁醃氣。

<sup>1</sup>H NMR ( 250 MHz，CDCl<sub>3</sub> )

4.09 ( t，2 H，J 6.7 )，

2.53 ( m，1 H )，1.68 ( m，1 H )，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 23 )

1 . 5 2 ( q , 2 H , J 6 . 5 ) ,  
 1 . 1 6 ( d , 6 H , J 7 . 0 ) ,  
 0 . 9 2 ( d , 6 H , J 6 . 5 ) 。

## 丙酸，2 - 甲基 - 乙基酯

將異丁醯氯 ( 2 毫升，19 . 1 毫莫耳 ) 緩慢地加到乙醇 ( 0 . 5 5 毫升，9 . 5 毫莫耳 )，4 - 二甲胺基吡啶 ( 5 8 3 毫克，4 . 8 毫莫耳 ) 及吡啶 ( 0 . 8 5 毫升，10 . 5 毫莫耳 ) 於二氯甲烷之 0 °C 溶液。在完成加入 5 分鐘後沉澱物變得很明顯。於氫氣下攪拌 1 2 個小時後，將反應物傾倒到 2 0 毫升 0 . 1 N H C l 中。各層分離開來且將水層用 2 0 毫升氯化甲烷萃取。將有機層合併且用 1 0 毫升飽和氯化銨水溶液清洗，然後再用 1 0 毫升飽和碳酸氫鈉水溶液清洗。有機層再用硫酸鎂脫水，過濾且於真空濃縮。透過 1 4 m m Vigreux 管柱 ( b p 1 0 2 ° C ) 蒸餾純化。

<sup>1</sup> H ( 3 0 0 M H z , C D C l 3 )

4 . 1 2 ( q , 2 H , J 7 . 2 ) ,  
 2 . 5 2 ( m , 1 H ) ,  
 1 . 2 5 ( t , 3 H , J 6 . 9 ) ,  
 1 . 1 6 ( d , 6 H , J 7 . 2 ) 。

## 1 - 丁醇 3 - 甲基醋酸酯

於氫氣氛下，將乙醯氯 ( 6 . 5 毫升，9 1 . 8 毫莫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 24

耳) 逐滴加入異戊醇 ( 5 毫升, 45.9 毫莫耳), N, N - 二甲基吡啶 ( 2.8 克, 23 毫莫耳) 及無水吡啶 ( 4.1 毫升, 50.5 毫莫耳) 於二氯甲烷 ( 92 毫升) 之 0 °C 溶液。反應混合物被傾倒到 100 毫升的 0.1 N HCl 充, 且所產生的諸層分離開來。將有機層用 50 毫升飽和氯化銨水溶液清洗, 然後用硫酸鎂脫水。將有機層過濾且於真空下濃縮成澄清油。所得油用蒸餾純化 ( b p 134 - 136 °C ) 而得到醋酸異戊酯。

$^1\text{H NMR}$  ( 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  )

4.08 ( t, 2 H, J 6.9 ),

2.03 ( s, 3 H ), 1.68 ( m, 1 H ),

1.51 ( q, 2 H, J 6.9 ),

0.92 ( d, 6 H, J 6.6 ) 。

實施例 9 於試管內培養皿檢定中揮發性物質對真菌及人類病原體的抑制

將一長條洋菜膠從 PDA 平板的中間取出來, 將其製成兩塊大小相當且分離的小塊, 使微生物得以在其上生長, 如 Strobel 等人, 2001 所述。將一小片 *M. albus* 培養物洋菜膠置放在前述一小塊洋菜膠上, 將平板用塑膠袋封住且任其生長 10 天。於 10 天後, 在另一塊洋菜膠上用不同真菌病原體接種, 還有不含 *M. albus* 的切塊平板以作為對照組。各種處理都有三個平板。 *Penicillium expansum*, *Monilinia fructicola*, *Candida albicans* 及細菌係以

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 25 )

孢子／細胞懸浮液的形式來施加，而其它病原體則是用各平板內單獨一塊 3 或 6 m m 之菌絲體栓塊來施加。在 3 天後測量菌落大小來評估病原體生長情形。在實驗結束後將接種區的洋菜取出且轉移到新鮮的 P D A 平板上，來重新分離病原體以評估其活性。

所確定的 *M. albus* 揮發性化合物抑制及殺死測試生物的相對能力亦示於表 1。測試溶液的製備係將化合物以其在 *M. albus* 培養物氣相之相對比例來置放到小管中。將測試混合物放置到 P D A 平板中央的預消毒微小杯 ( 4 x 6 m m ) 中。當不使用時，則將混合物儲存在 0 °C 下。將在洋菜膠上剛培育好的測試生物切成 3 m m<sup>3</sup> 之洋菜小塊，每一種測試化合物至少有 3 塊洋菜小塊被放置在離微小杯 2 - 3 公分處且將培養皿用兩層石蠟膜包覆起來。在一段既定時間後測量洋菜小塊邊緣菌絲生長情形。不過在細菌及 *Candida albicans* 之例中，該等生物係藉著在 P D A 平板的測試側上劃線且對洋菜平板上已被接種的原始區域再劃線以檢查是否有目視可見的生長現象及活性。另外還有一組在微小杯中不放入溶液以建立適當的對照組。於每 5 0 C C P D A 平板上方空間施加 3 . 2 - 9 0 微升人工混合物進行測試且重覆 3 次以獲得各測試生物的 I C<sub>50</sub> 數據。在整個混合物中的各類化合物的效能亦以其在混合物最適濃度中的相對份量來進行測試，該最適濃度為標準培養皿內培養物上方每 5 0 C C 空間有 6 0 微升之測試混合物。舉例來說，酯類佔所鑑定之揮發性物質混合物的 4 0 %

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 26

，所以酯類的測定係以 26 . 4 微升 / 50 C C 空間的濃度來進行；相同的步驟也用在各個被鑑定出來的其它類化合物。最後，特別是在酯類中的各個個別的化合物則以其在 60 微升混合物中的濃度或相對比率來作測試。測試微生物的活性係藉著無菌地取出洋菜小塊且將其置於 P D A 平板上且在 1 - 3 天後觀查其生長情形。

除了 *F. solani* 及 *F. oxysporum lycopersici* 以外沒有其它病原體能在存在有 *M. albus* 下生長，所以該等生物的生長已被抑制了。兩種此等能在 *M. albus* 下存活的病原體於三天後被轉移到新鮮的平板上，其在 *M. albus* 存在下仍能存活。同樣地，*M. albus* 揮發性物質並不會殺死其本身或與其關係密切的 *Xylaria* 菌種，不過它們的確會抑制 *Xylaria* 菌種的生長（表 1）。

實施例 10 用試管內檢定來測試各類揮發性化合物及個別的揮發性成份

評估天然的 *M. albus* 揮發性物質中各類化合物以測定各類物質之相對生物活性。各類化合物係以其在 60 微升混合物 / 50 C C ( 1 . 2 微升 / C C ) 中的百分率含量來測試（表 5）此評估係對一組被選出的 7 種測試生物來進行。各類化合物對於該等測試化合物都有某些抑制活性（表 5）。不過比較性地，酯類較其它類化合物具有較高的抑制活性（表 5）。

酯類中的各個化合物都被個別地評估。當以表 5 中的

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

## 五、發明說明 ( 27

各個條件來對各種酯作比較性的測試時，我們發現到醋酸 1 - 丁醇 3 - 甲酯幾乎完全類似表 5 中所有酯類的結果。其佔所有被確認出來之之酯類的 62%，所以係以 0.32 微升 / C C 的濃度來測試。此外，丙酸 2 - 甲基 3 - 甲基丁基酯則有最小的抑制性生物活性，至於其它的酯類部份則僅有極微小的活性或無活性。雖然在生物檢定中酯類及醋酸 1 - 丁醇 3 - 甲酯具有抑制活性，但是在標準的 3 日曝露期中任何測試條件都沒有觀察到有任何測試真菌死亡的情形。此為一項極重要的觀察結果，因為在完整的人工氣體下及 *M. albus* 在培養皿中產製的天然氣體下都會觀察到測試生物有死亡的情形。此種結果強烈地建議說在 *M. albus* 揮發性物質之例中有一加成或協作的機制在運作。所以，雖然各類化合物具有或多或少的抑制活性，但是需要此等成份的完整混合才能造成真菌及細菌的死亡（表 1）。

基於 *M. albus* 之揮發性物質可以抑制及殺死大腸桿菌（表 1）之事實，我們便使用 *M. albus* 進行實驗以測定它的氣體是否能抑制及殺死在人類及動物排泄廢物中的微生物菌叢如大腸桿菌及其它糞便微生物。此等生物常為天災及戰爭等大災難期間造成痢疾及其它疾病的原因。可以想像到地，我們可以將 *M. albus* 發展且應用在田野施用上來去除人類及動物排泄廢物之污染。所以，根據我們的實驗，我們準備了兩週齡的 *M. albus* 菌落，其係生長在 P D A 培養皿的半邊。然後在培養皿上分隔開的另一半（使用標

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

## 五、發明說明 ( 28 )

準微生物方法) 以人類固體廢排泄廢物劃線。設置好對照組，其中不含有 *M. albus* 菌落。於 23 °C 下培育兩天後，明顯地在對照組平板中較含有 *M. albus* 之平板生長出更多細菌及真菌菌落。於一比較性的實驗中，僅將 *M. albus* 培育在人體液體排泄物 ( 尿液 ) 中便可妨阻其內細菌生長，相對地在對照組 ( 無 *M. albus* ) 中細菌則生長旺盛。

實施例 1 1 *M. albus* 在活體內抗土壤病原體 *Rhizoctonia solani* 之活性

用於此等實驗時，將生長在 P D A 平板上的一 *R. solani* 培養物加到 1 升生長用基質 ( 蛭石 ) 中使得生長用基質為 *R. solani* 感染。此舉使得植株有近乎 100% 死亡率且盆栽只有極低的存活率。然後將不同形式的 *M. albus* 加到該生長用基質中，然後將該基質加到 3 吋深的塑膠盆中。該等花盆中植入約 70 個花椰菜種子，然後將花盆置於平盤上且從底部給水。於約一週後計算植株的數目。於對照組包括僅含有 *R. solani* 者，僅含有 *M. albus* 者及僅有空白生長用基質者。視實驗的情形而定，每一種處理都具有 3 或 4 盆植栽，其係完全隨機性地來安置。

將 10 日齡之 P D B 培養物液體於攪拌機中均質化且以每升蛭石 50 或 200 毫升的比率來併入生長基質中。固體洋菜培養基處理係如同前文所述來進行，於每升中含有 2 個 2 週齡培養物的平板。花盆係在充填之後立刻播種。同時還研究將揮發性物質密封在花盆內的效果：在每一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 29 )

種處理下，有 3 個花盆上方用塑膠袋套住且以橡皮筋固定起來，而有其它 3 個花盆則任其毫無遮掩。於 3 天後將塑膠袋取下。結果顯示當以較高比率（200 毫升／每毫升蛭石）來施用液體培養物時可以有效防止植栽的腐壞，如同在 P D A 上的 Muscodor 固體培養物般（表 2）。施用 Muscodor 的效果似乎是即時性的，因為即使在栽種之前沒有經過培育期此等處理組仍有正常的萌發率。施用較低比率之液體培養物多少仍可減少植栽的腐敗但是不若前者有效。將揮發性氣體以塑膠袋密封在花盆中並沒有增加其效能（表 2）。

實施例 1 2 M. albus 對於有感染水果作採收後處理的活性

在 cv Gala 蘋果的中分線上用指甲劃出傷痕，將該等蘋果放在 3 . 8 升塑膠箱內的塑膠板上，使有傷口的一側朝上。在各塑膠箱中置入九顆蘋果且每一組處理含有三個箱子。將水果用青黴 *Penicillium expansum* 接種，其係在實驗前 2 4 小時（預接種）或在即將進行實驗之前吸取 2 0 微升孢子懸浮液（ $10^4$ ／毫升）置入各處傷口來進行。至於 Muscodor 煙薰消毒處理，則係將 1 4 0 克著生有 Muscodor 之裸麥穀粒置入容器中然後密封起來。對照組在密封箱子內僅含有接種過病原體之果實。此等果實穀粒係在室溫（19 - 22 °C）下培育。在經過 7、14 及 21 天後以受感染之果實的比率來評估染病情形（表 3）。在預接種之處理組中蘋果並沒有感染的情形，而在將果實暴露到

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

## 五、發明說明 ( 30 )

Muscodor 之前才進行接種的處理組中在第 21 天評估時只有 7% 之極低感染率。

### 實施例 13 M. albus 抗昆蟲及線蟲之活性

#### 線蟲 ( *Caenorhabditis elegans* )

將有壕溝系統之平板 ( Worapong 等人, 2001 ) 其一側用 *M. albus* 接種而另一側則接種大腸桿菌或與大腸桿菌一起自由生活之線蟲。於五天後, 不具有 Muscodor 之平板已產生極大的線蟲繁殖族群, 其已越過壕溝且在培養皿的另一側群集生活。在相鄰平板上大腸桿菌則已發展出正常的菌落形態。而以 Muscodor 處理之平板則已發展出基本菌落, 其菌絲體橫跨過 PDA 表面。所存在的線蟲顯得很遲緩, 不過仍能移動。在第七天時, Muscodor 已達到 PDA 邊緣, 其菌絲體越過壕溝伸到具有大腸桿菌的平板部份及具有圓蟲的平板部份。在洋菜基上僅有少數線蟲成蟲, 且其活動性極有限。

#### 甜菜夜盜蛾 ( *Spodoptera exigua* )

將含有約 150 克著生有 *M. albus* 且經高溫壓消毒之裸麥種子之三個小塑膠燒杯置於塑膠箱中 ( 約 250 平方吋 )。在室溫下設置另一個並列箱, 其不含有三個真菌燒杯。在兩個箱子中都含有一個 PDA 培養皿, 在其中央有一塊 *Rhizoctonia solani* 的小栓塊以作為生物檢定的指示劑。在各個箱子中置入含有甜菜夜盜蛾蟲卵之 96 井微力價

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 3)

平板，該等蟲卵係被放置在人工餵養食品上。兩天後，不含有 Muscodor 之箱自內的卵開始孵化且 *R. solani* 發展出新的菌絲。在含有 *M. albus* 之裸麥培養物之箱子中的夜盜蛾蟲卵則無法孵化。再者，*R. solani* 的生長也受到抑制。五天後，沒有作處理之箱子內夜盜蛾幼蟲已達第二齡至第三齡。

在具有夜盜蛾幼蟲之箱子中置入成對的微力價平板，該等幼蟲已藉人工餵養長到第三天大。與沒有作處理的對照組比較，在 Muscodor 箱子中的平板之幼蟲則停止進食且生長停滯。五天後，於有處理之平板中的夜盜蛾幼蟲已死亡。

玉米根甲蟲 ( Corn rootworm beetles, *Diabrotica undecimpunctata* )

在具有玉米根甲蟲蟲卵的箱子中放入成爲的微力價平板，其中該等蟲卵係被放置在人工餵養食品上。當平板被放置到測試箱中時蟲卵剛好正要開始孵化。在 Muscodor 箱子中約有一半的蟲卵孵化。剩下的卵並未孵化且在兩煙內所有幼體都死掉了。在沒有作處理之對照組箱子中則正常地孵化出許多四處蠕動的幼蟲，在一週後於每一井內都有 3 - 6 隻三齡幼蟲

實施例 1 4 以 *Muscodor albus* 處理感染黑穗病之大麥種子  
在對照性的重覆實驗中，將感染 *Ustilago hordei* ( 覆蓋

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 32

性黑穗病，表 6 ) 的大麥種子各放到兩個含有 *M. albus* 氣體之洋菜平板中達四天，然後種植在溫室的測試盆中。

15 週後，採收植物且評估在種子頭端黑穗病的情形。在這兩組暴露到 *M. albus* 氣體之植物中，此疾病的控制達到 100%，且在該等植物上並沒有發現到有任合氣體處理所造成的抑制或損害的現象。在同樣數目的對照組植物（無處理組及感染 *U. hordei* 之種子）在此實驗中種子頭端有感染之數目則分別有 50% 及 41%。同樣地，如預期般，無感染的種子所萌生的植物不含有生病的穀粒。

### 結果及討論

*Muscodor albus*, gen. et sp. nov., 為一種次真菌性 (deuteromycetous, Muceliales Serilia) 之內生植物型物種，其與子囊菌屬 *Xylaria* 有分子關連性。此真菌之 18S rDNA (2089 bp) 與 *Xylariaceae* 之代表性的成員之基因有 96 - 98% 的同質性。再者，*M. albus* 之 ITS1, 5.8S 及 ITS2 序列 (652 bp) 與數種 *Xylaria* 菌種包括 *X. arbuscula*, *X. longipes* 及 *X. mali* 則有 89 - 92% 程度的親近關係。由於 18S rDNA 及 ITS1 & 2 5.8S rDNA 都是獨一無二的，所以 *Muscodor* 被認為為一種分類上獨特的屬及種 (Worapong 等人, 2001)。

我們也曾測試過 *M. albus* 之揮發性氣體對於接種病原性真菌之植物的效果。該等揮發性氣體本身對於所測試的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 33 )

高等植物並沒有不良影響。然而，當使用該揮發性物質來處理接種 *Ustilago hordei* 之大麥種子時，其可對大麥覆蓋性黑穗病達 100% 的控制。所以基於揮發性抗生物質產製真菌在實際應用上潛在的重要性，所以我們認為測知在自然界中是否存在有其它此類生物是很重要的。

藉著使用分離內生植物性真菌之標準技術，且利用 *M. albus* 之揮發性物質作為培養物的選汰工具，我們已分離出至少其它兩種能產製揮發性抗生素之內生植物。此等生物係個別來自兩種澳洲的原生植物樹種。此兩種真菌培養物與 *M. albus* 具有相同性，它們的培養物都沒有子實結構，不產生孢子，有惡臭且對許多微生物有抑制或致命效果。不過，藉著同樣的測試步驟，則發現到此等生物具有不同於 *M. albus* 之培養性、化學性及分子生物學上的特性。

過去早已顯示出一生物分子的分子特性對它本身係獨一無二的，特別是當其詳細結構（孢子生成）或其它特性逸失時，更可以用分子特徵來作分類。所以，將系統發生性的特性標示方法結合了形態學的資料可有助於真菌的鑑定。通常，因為 rDNA 基因具有高度保守性，所以會以 rDNA 來作為分類標的（Bruns 等人，1991；Guarro 等人，1999；Mitchell 等人，1995）。除了 18S rDNA 以外，ITS 1 & 2 序列也是保守性的。當將 *M. roseus* "A3-5" 之部份 18S rDNA 序列（2055 bp）用 BLASTN 2.2.1 在 GenBank 資料庫中蒐尋之後，結果顯示其與 *M. albus* 的 2089 bp（

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

## 五、發明說明 ( 34

A F 3 2 4 3 3 7 ) 在第 1 - 9 8 1 位置, 1 3 1 9 - 2 0 4 8 位置有 1 0 0 % 相同性, 且與 *Xylaria polymorpha* 之 9 8 2 b p ( A B 0 1 4 0 4 3 ) 及 *Hypoxylon fragiforme*(ABO14046)有 9 8 % 相同性, 且與 *Rosellinia necatrix* 之 9 8 2 b p ( A B 0 1 4 0 4 4 ) 有 9 7 % 相同性。此外, 分離株 " A - 1 0 " 之 1 8 S r D N A ( 2 0 5 1 b p ) 則與分離株 " A 3 - 5 " 之序列有 9 9 % 相同性。

另一方面, 對於 *M. albus* " A 3 - 5 " 之 I T S 1 & 2 及 8 S r D N A 序列的比較性分析則顯示其與 *Muscodor albus* 之 I T S 1 & 2 ( A F 3 2 4 3 3 7 ) , *X.arbuscula* CBS 452.63(AF163029)及 CBS 454.63(AF163028) 、 *X. enteroleuca* ABS 148(AF163033),*X. longipes* CBS 148.73(AF163038) 、 *X. mali* CBS 385.35(AF163040) 、 *X. cornu-damae* CBS 724.69(AF163031)分別有 9 9 , 9 1 , 9 1 , 9 1 , 9 0 及 8 9 % 相同率。並沒有發現到任何序列與其部份 1 8 S r D N A 或 I T S 1 & 2 及 5 . 8 S r D N A 序列完全相同。

基於 1 8 S 序列的系統發生分析顯示 *M. roseus* 為 *M. albus* ( A F 3 2 4 3 3 7 ) 的姐妹組, 其在 1 0 0 組重覆數下測得之健全解答信心值 ( robust bootstrap confidence ) 為 1 0 0 % 。此外, 最大簡約式分析顯示 *M. albus* 及 *M. roseus* 兩者與 *Xylariaceae* 如 *Aylaria* spp.,*Rosellinia necatrix*(AB014044)及 *Poronia punctata* ( A F 0 6 4 0 5 2

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 35

) 的關係比起與 *Amphisphaeriaceae* 之三個代表屬：  
*Pestalosphaeria hansenii* ( A F 2 4 2 8 4 6 )、  
*Discostroma tricellular* ( A F 3 4 6 5 4 6 ) 及  
*Amphisphaeria sp.* ( A F 3 4 6 5 4 5 ) 之關係更為接進，  
 其以 1 0 0 組重覆數所測得的解答信心值為 6 8 % ( Felsenstein, 1985 )。此結果亦為嚴格保守性探索蒐尋系統發生樹之 3 0 組相等最簡約 1 8 S r D N A 分支樹所支持。所以，*M. roseus* 應放在 *Xylariales* 目 *Xylariaceae* 科之下。再者，對 *M. roseus* " A 3 - 4 " 之 1 8 S r D N A 及其 I T S 1 & 2 及 5 . 8 S r D N A 的比較結果則與 *M. albus* 具有高度相同性 ( Worapong 等人，2 0 0 1 ) 同樣地，分子生物資料 ( 1 8 S r D N A ) 則建議說 *M. roseus* 之兩株分離株 " A 3 - 5 " 及 " A - 1 0 " 關係應當十分接近，且基本上為同一種生物。再者，該等分子生物資料則可支持將前文所述的 *M. albus* 與在此所提出的新穎真菌菌種 - *M. roseus* 加以區分之想法。

雖然 *M. roseus* 之分子生物性顯示此生物最適於放在 *Xylariaceae* 之下，但是該生物亦顯示出與 *M. albus* 的 1 8 S r D N A 有親近的關係。然而，由於此種關聯性係基於有限的 r D N A 分子層級，所以也可以辯稱此兩種真菌係相同的。然而，我們對 *M. albus* 及 *M. roseus* 的其它化學特性作了檢驗且發現到它們有所不同。所以，*M. albus* 及 *M. roseus* 都具有產生惡臭氣味物質之生化能力，該等物質顯示出強烈的抗生素性質，此兩種生物產製的多種揮發性物質

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 36

藉 GC / MS 來測量顯示為相同物質。雖然經常被注意到真菌的確會產生多種有味道的物質，但是 *Muscodor* 真菌所具有之令人印象深刻之抗生素特性則相當獨特 (Bjurman 等人, 1992; Rapoir 等人, 2000 及 Schnurer 等人,

1999)。不過，此兩種真菌的揮發性物質中仍含有不同的化合物 (Strobel 等人, 2001)。舉例來說，*M. albus* 可產生 2-壬酮、石竹烯及醋酸 2-苯基乙基酯，而此等化合物並沒有在 *M. roseus* 的任一分離株中發現到。另一方面，兩株 *M. roseus* 分離株則製造出一些在 *M. albus* 揮發性物質中沒有偵測到的化合物，如 2-丁烯酸乙酯，1, 2, 4-三甲基苯及 2, 3-壬二烯。此結果提供此報告一些化學性的支持，建議說 *M. albus* 與 *M. roseus* 在分類上係不同的。

其它方面，我們同樣檢驗了 *M. roseus* (分離株 "A 3-5" 及 "A-10") 其它更典型的特性且與 *M. albus* 比較。該等 *M. roseus* 分離株在所有測試培養基上都產生一種生長緩慢、緻密的、淡玫瑰色菌絲。相對地 *M. albus* 在所有測試的培養基內則產生帶白色的菌絲 (Worapong 等人, 2001)。在任何一個培養基中都沒有孢子形成，包括含有宿主植物材料或康乃馨葉之培養基也如此。菌絲直徑略有差異 (0.8 - 3.6 微米) 且經常交纏在一起形成較複雜的結構，甚至菌絲核。此等菌絲通常比 *M. albus* 之菌絲更大。在培養基裡 *M. roseus* 的菌絲體通常會形成比 *M. albus* 之菌絲體更為複雜的結構。事實上，根據我們的經

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

### 五、發明說明 ( 37

驗，在真菌培養物中菌絲核的出現並不常見，然而此種結構卻經常可在 *M. roseus* 培養物中發現。

最後，我們還注意到 *M. roseus* 最佳的儲存條件係在濾紙上乾燥後再儲存在  $-70^{\circ}\text{C}$  下。在此等條件下，即使超過 1.5 年真菌仍有活性。雖然此種生物也可以在  $4^{\circ}\text{C}$  下無菌水中儲存，但是 6 個月後則難以確定能由此儲存物重新取得有活性的生物。同樣地，將該真菌保存在 15% 甘油儲存在  $-70^{\circ}\text{C}$  下亦可有效地保存該生物的活性。

前述的討論及實施例僅係用來顯示本發明技術。對於熟悉此技術者極明顯地，可在不悖離本發明之精神及範疇下對於上述內容進行不同修正。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 38

## 參考資料：

1. Altschul, S. F., et al. (1997). *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
2. Bacon C.W. and White JR. J.F. *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker Inc., New York.
3. Bjurman J. and Kristensson, J. (1992) *Mycopathologia* 118: 173.
4. Bruns, T. D., et al. (1991). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 525-564.
5. Dennis, C. & Webster, J. (1971) *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57: 41-48
6. Felsenstein, J. (1985). *Evolution* 39: 783-791.
7. Guarro, J., et al. (1999). *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 454-500.
8. Hawksworth, D.C. and Rossman, A. Y. (1987) *Phytopath.* 87: 888.
9. Heathcock, R. and Ratcliffe, R. (1971). *J. Am. Chem. Soc.* 93: 1746.
10. Hoefle, G. et al., (1978) *Vorbrueggen, Agnew. Chem., Int. Ed. Engl.* 17: 569.
11. Lee, S. B. and Taylor, J. W. (1990). In *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications*. Edited by Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky J. J., White, T. J. Academic Press, Inc., California: pp. 282-287.
12. Li, J.Y. et al., (2000), *Org. Lett.* 2: 767.
13. Li, J.Y. et al., (2001), *Phytochem.* 56: 463.
14. Mitchell, J. I., et al. (1995). *Mycologist* 9: 67-75.
15. Nelson, P.V. (1998) *Greenhouse Operation and Management* 5<sup>th</sup> ed. Prentice-Hall.
16. Rapior, S., et al. (1995). *Mycologia* 92: 305-308.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 39

17. Rapior, S. (2000), *Mycologia* 92: 305.
18. Schnürer, J., et al. (1999). *Fungal Genetics and Biology* 27: 209-217.
19. Schnurer, J. et al., (1999), *Fungal Genetics and Biology* 27: 209.
20. Stierle, A. et al., (1993), *Science* 260: 214.
21. Strobel, G.A. et al., (2001), *Microbiol.* 147: 2943-2950.
22. Strobel, G. A., et al. (1996). *Microbiology* 142: 435-440.
23. Strobel, G. A., et al. (2000). *Mycotaxon.* 76: 257-266.
24. Swofford, D. L. (1999). *Phylogenetic Analysis Using parsimony (\*and Other Methods)*. Version 4.0d64. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
25. Thomson, J. and Gibson T. (1997). *Clustal V. Multiple Sequence Alignments*. In: *Documentation (Installation and Usage)* European Molecular Biology Laboratory Postfach Germany: 1-37.
26. White, T. J., et al. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. Edited by Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky J. J., White, T. J. Academic Press, Inc., California: 315-324.
27. Willits, D. A. and Sherwood, J. E. (1999). *Phytopath.* 89: 212-217.
28. Worapong, J. et al. (2001). *Mycotaxon.* 79: 67-69.
29. Yang, X. et al., (1994), *Plant Science* 102:1.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 40 )

表 1.M. albus 之揮發性化合物及 M. albus 化合物之人造混合物對一組測試微生物之影響

| 測試微生物                           | 於暴露在<br>M. albus 下<br>2 天後相對<br>於對照組<br>之生長% | 於暴露在<br>M. albus 培<br>養物 3 天<br>後之活性 | 置於人造<br>氣體下 2 天<br>之 IC <sub>50</sub><br>( $\mu$ l/CC) | 於人造氣<br>體中相對<br>於對照組<br>之生長% | 於暴露在<br>人造氣體<br>3 天後之<br>活性 |
|---------------------------------|--|--------------------------------------|--|------------------------------|-----------------------------|
| <i>Pythium ultimum</i>          | 0  | 死亡                                   | 0.48±0.01  | 0                            | 死亡                          |
| <i>Phytophthora cinnamoni</i>   | 0  | 死亡                                   | 0.29±0.06  | 0                            | 死亡                          |
| <i>Penicillium expansum</i>     | 0  | 死亡                                   | #  | #                            | #                           |
| <i>Rhizoctonia solani</i>       | 0  | 死亡                                   | 0.08±0.02  | 0                            | 死亡                          |
| <i>Ustilago hordei</i>          | 0  | 死亡                                   | 0.31±0.09  | 0                            | 死亡                          |
| <i>Stagnospora nodorum</i>      | 0  | 死亡                                   | 0.15±0   | 0                            | 死亡                          |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | 0  | 死亡                                   | 0.17±0.05  | 0                            | 存活                          |
| <i>Scerotinia minor</i>         | 0  | 死亡                                   | #  | #                            | #                           |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>    | 0  | 死亡                                   | 0.41±0.05  | 0                            | 存活                          |
| <i>Monilinia fructicola</i>     | 0  | 死亡                                   | #  | #                            | #                           |
| <i>Fusarium solani</i>          | 19.4±0.284                                   | 存活                                   | 1.13±0.07  | 42.0±2                       | 存活                          |
| <i>Fusarium oxysporum</i>       | 4  | 存活                                   | #  | #                            | #                           |
| <i>Verticillium dahliae</i>     | 0  | 死亡                                   | 0.3±0  | 0                            | 死亡                          |
| <i>Cercospora beticola</i>      | 17.5±3.5                                     | 存活                                   | 0.12±0.15  | 8±2                          | 存活                          |
| <i>Tapesia yallundae</i>        | 0  | 死亡                                   | 0.64±0   | 0                            | 死亡                          |
| <i>Xylaria sp.</i>              | 25±0   | 存活                                   | 0.41±0.03  | 0                            | 存活                          |
| <i>Muscodor albus</i>           | 100±0  | 存活                                   | 0.6±0  | 17.5±7.5                     | 存活                          |
| <i>Escherichia coli</i>         | 0  | 死亡                                   | #  | 0                            | 死亡                          |
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | 0  | 死亡                                   | #  | 0                            | 死亡                          |

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 4)

| 測試微生物                     | 於暴露<br>在 M.<br>albus 下<br>2 天後<br>相對於<br>對照組<br>之生長<br>% | 於暴露<br>在 M.<br>albus<br>培養物<br>3 天後<br>之活性 | 置於人<br>造氣體<br>下 2 天<br>之 IC <sub>50</sub><br>( $\mu$ l/CC) | 於人造<br>氣體中<br>相對於<br>對照組<br>之生長<br>% | 於暴露<br>在人造<br>氣體 3<br>天後之<br>活性 |
|---------------------------|--|--|--|--------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Micrococcus luteus</i> | 0  | 死亡   | #  | 0                                    | 死亡                              |
| <i>Candida albicans</i>   | 0  | 死亡   | #  | 微量                                   | 存活                              |
| <i>Bacillus subtilus</i>  | 0  | 存活   | #  | 0                                    | 存活                              |

說明：在人造混合物中各種已被明確確定之化合物份量係藉著應用 G C / M S 分析所得到之化合物的電子離子化橫切面（佔總面積之%）來求得。接著將該等人造混合物放置在含有 P D A 之測試培養皿中央且預先消毒過之微小杯（4 × 6 m m）中來測試。將含有新鮮培育之測試微生物（或劃線微生物）之洋菜小栓塊放在離該微小杯約 2 - 3 公分處。然後將平板用兩層石蠟包裹起來且於 23 °C 下培育兩天或更久。對於從接種洋菜栓塊邊緣到菌絲體菌落邊緣呈線形生長的菌絲進行測量。# 表示在此實驗設計中並沒有進行測量。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

## 五、發明說明 ( 42

表 2.揮發性物質下花椰菜種植一週後每個花盆內花椰菜植株的平均數目(平均值±標準差)

| Muscodor 處理  | 無感染       | 感染 Rhizoctonia |
|--------------|-----------|----------------|
| 未密封花盆        |           |                |
| 檢查           | 6 5 ± 1   | 1 ± 1          |
| 液體量:50 ml/L  | 6 4 ± 1 1 | 3 9 ± 1 1      |
| 液體量:200 ml/L | 6 1 ± 8   | 6 3 ± 1 5      |
| PDA 培養物      | 6 2 ± 5   | 6 8 ± 1        |
| 密封花盆         |           |                |
| 檢查           | 6 5 ± 1   | 1 ± 1          |
| 液體量:50 ml/L  | 5 9 ± 3   | 3 1 ± 1 9      |
| 液體量:200 ml/L | 5 7 ± 2   | 6 6 ± 1 1      |
| PDA 培養物      | 6 2 ± 6   | 6 2 ± 1 0      |

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 43

表 3. 將即將暴露於 Muscodor 之前才用青黴接種之組與預接種組比較, 蘋果在用青黴 (*Penicillium expansum*) 感染 7 天, 14 天及 21 天後蘋果受感染之百分率。無處理之對照組並沒有暴露於 Muscodor 之下

| 處理        | 7 天 | 14 天 | 21 天   |
|-----------|-----|------|--------|
| 無處理之對照組   | 100 | 100  | 100    |
| Muscodor  | 0   | 0    | 7 + 13 |
| 24 小時前預接種 |     |      |        |
| 無處理之對照組   | 100 | 100  | 100    |
| Muscodor  | 0   | 0    | 0      |

a: 由於果實數目少所以標準差偏高。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 44

表 4.M. albus 產製之揮發性化合物之 GC/MS 分析

| RT    | 總面積(%) | M/z | 可能的化合物   | MW  |
|-------|--------|-----|--|-----|
| 3:45  | 0.33   | 114 | 辛烷   | 114 |
| 4:19  | 0.93   | 58  | 丙酮   | 58  |
| 4:37  | 0.68   | 74  | 醋酸甲酯   | 74  |
| 5:56  | 7.63   | 88  | 醋酸乙酯   | 88  |
| 6:51  | 0.31   | 102 | 丙酸,2-甲基,甲基酯  | 102 |
| 7:16  | 6.24   | *   | 乙醇   | 46  |
| 8:03  | 2.07   | 116 | 丙酸,2-甲基乙基酯   | 116 |
| 11:45 | 0.58   | *   | 丙酸,2-甲基 2-甲基,丙基酯   | 144 |
| 12:05 | 2.06   | 74  | 異丁醯醇   | 74  |
| 12:50 | 22.24  | *   | 1-丁醇,3-甲基,醋酸酯  | 130 |
| 14:57 | 1.53   | *   | 丙酸,2-甲基,3-甲基丁基酯  | 158 |
| 15:28 | 22.99  | *   | 1-丁醇,3-甲基-   | 88  |
| 16:08 | 0.29   | 138 | #呋喃,2-戊基-  | 138 |
| 18:53 | 0.29   | 142 | #4-壬酮  | 142 |
| 20:38 | 0.41   | 142 | 2-壬酮   | 142 |
| 21:07 | 0.30   | 204 | #萘十氫-4a-甲基-1-甲撐-7-[1-甲基乙叉)-<br>,(4aR-反式)-                              | 204 |
| 22:54 | 1.51   | 204 | #萘,1,2,3,4,5,6,7,8-八氫-1,4-二甲基-7-(1-甲<br>基乙烯基)-,[1S-(1.α,4.α,7.α)]      | 204 |
| 23:16 | 0.94   | 204 | #環己烯,4-(1,5-二甲基-1,4-己二烯基)-1-甲<br>基-                                    | 204 |
| 25:20 | 3.63   | 204 | #1H-3a,7-甲撐萘,2,3,4,7,8,8a-六氫-3,6,8,8-四<br>甲基-,[3R-(3.α,3a.β,7.β,8a.α)] | 204 |
| 25:30 | 6.08   | 88  | 丙酸,2-甲基  | 88  |

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 45

| RT    | 總面積(%) | M/z | 可能的化合物  | MW  |
|-------|--------|-----|---|-----|
| 26:04 | 0.48   | 204 | 石竹烯   | 204 |
| 27:55 | 0.34   | 204 | #萘,1,2,4a,5,6,8a-六氫-4,7-二甲基-1-(1-甲基乙基)-[1R-(1.α,4a.α,8a.α)]                     | 204 |
| 28:34 | 0.36   | 204 | #螺[5,5]十一碳-2-烯,3,7,7-三甲基-11-甲撐  | 204 |
| 28:50 | 1.07   | 204 | 萹,1,2,3,5,6,7,8,8a-八氫-1,4-二甲基-7-(1-甲基乙基)-,[1S-(1.α,7.α,8a.β)]<br>俗名: Bulnesene  | 204 |
| 28:57 | 3.24   | 204 | 萘,1,2,3,5,6,7,8,8a-八氫-1,8a-二甲基-7-(1-甲基乙基)-,[1R-(1.α,7.β,8a.α)]<br>俗名: Valencene | 204 |
| 31:12 | 1.74   | *   | 醋酸,2-苯基乙基酯  | 164 |
| 33:17 | 1.06   | 122 | 苯基乙醇  | 122 |
| 39:00 | 9.76   | 201 | 不知  | 204 |

\*不論是在標準化合物或分析化合物之光譜中都沒有觀察到有分子-離子峰。

#此係標示有觀察到此成份之光譜及停留時間且此物質為在 NIST 資料庫中所發現性質最符合之可能化合物,但是此等資料並沒有利用適當的相同標準物以保留時間或 MS 來確認。此等化合物並沒有置於生物檢定使用之人造混合物中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 46

表 5. 各類揮發性化合物之抑制效果是將測試微生物的生長情形與不存在該等測試化合物之對照組比較後,以測試微生物生長%來表示。

| 測試微生物                           | 醇類                   | 酯類                   | 酮類                   | 酸類                   | 脂質                   |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                                 | 0.48 $\mu$ l/cc      | 0.53 $\mu$ l/cc      | 0.02 $\mu$ l/cc      | 0.09 $\mu$ l/cc      | 0.08 $\mu$ l/cc      |
|                                 | 相對於對<br>照組生長<br>情形之% | 相對於對<br>照組生長<br>情形之% | 相對於對<br>照組生長<br>情形之% | 相對於對<br>照組生長<br>情形之% | 相對於對<br>照組生長<br>情形之% |
| <i>Pythium ultimum</i>          | 11.2 $\pm$ 4         | 0                    | 67.5 $\pm$ 7         | 40.9 $\pm$ 3         | 75 $\pm$ 0           |
| <i>Rhizoctonia solani</i>       | 55 $\pm$ 5           | 0                    | 67.5 $\pm$ 7.5       | 67.5 $\pm$ 7.5       | 40 $\pm$ 0           |
| <i>Tapesia yallundae</i>        | 35 $\pm$ 15          | 0                    | 75 $\pm$ 25          | 100 $\pm$ 0          | 100 $\pm$ 0          |
| <i>Xylaria sp.</i>              | 75 $\pm$ 25          | 0                    | 100 $\pm$ 0          | 100 $\pm$ 0          | 100 $\pm$ 0          |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | 29 $\pm$ 3           | 8.1 $\pm$ 1.5        | 20.6 $\pm$ 12        | 40 $\pm$ 0           | 78 $\pm$ 2           |
| <i>Cercospora beticola</i>      | 58 $\pm$ 8           | 5 $\pm$ 5            | 100 $\pm$ 0          | 83 $\pm$ 17          | 100 $\pm$ 0          |
| <i>Fusarium solani</i>          | 70 $\pm$ 10          | 55 $\pm$ 5           | 90 $\pm$ 10          | 80 $\pm$ 20          | 80 $\pm$ 10          |

\*與無處理之對照組比較下所有菌絲生長之測量值都是如表 1 所述般進行。

#在暴露於此表所示之人造測試混合物之任一類成份下 3 天後,並沒有發現到有微生物之殺死。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 47

表 6. 在有或沒有 *Muscodor albus* 預處理下大麥種子頭  
端有 *Ustilago hordei* 感染之種子數目

| 處理             | 患病植株對健康植株之比率 |           |
|----------------|--------------|-----------|
|                | 實驗 1         | 實驗 2      |
| 無處理            | 1 6 / 3 2    | 1 3 / 3 1 |
| M. albus 揮發性物質 | 0 / 3 3      | 0 / 4 2   |
| 無感染對照組         | 0 / 4 1      | 0 / 3 9   |

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 四、中文發明摘要(發明之名稱：

新穎之內生植物性真菌及其利用方法 )

本發明提供新穎的內生植物性真菌 *Muscodor*，其可產製對特殊植物病原體、細菌、線蟲及昆蟲具有活性之揮發性抗生素混合物。本發明亦提供一種處理或保護植物、土壤及種子免於微生物感染的方法，其包含施用有效份量之能產製揮發性抗生素之 *Muscodor* 菌種。本發明亦關於一種殺真菌劑、殺細菌劑、殺昆蟲劑及殺線蟲劑之組成物，其含有此新穎的 *Muscodor* 菌株及由該菌株產製的抗生素及代謝物，該等物質可單獨存在或者還組合了其它化學性及生物性殺蟲劑。本發明還提供一種鑑定及分離能產製氣體之有關真菌之方法。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

## 英文發明摘要(發明之名稱：Novel endophytic fungi and methods of use )

This invention provides a novel endophytic fungus, *Muscodor*, that produces a mixture of volatile antibiotics with activity on specific plant pathogens, bacteria, nematodes and insects. Also provided is a method for treating or protecting plants, soil and seeds from microbial infections comprising applying an effective amount of a volatile antibiotic producing *Muscodor* sp. The invention also relates to fungicidal, bactericidal, insecticidal and nematocidal compositions comprising this novel *Muscodor* strain and the antibiotics and metabolites produced by this strain either alone, or in combination with other chemical and biological pesticides. Also provided is a method for identifying and isolating related gas producing fungi.

訂

原

公告本

93年12月9日修正(原)

|      |                           |
|------|---------------------------|
| 申請日期 | 91年4月15日                  |
| 案號   | 91107629                  |
| 類別   | A01N3/02, 25/00, C12N1/00 |

A4  
C4

(以上各欄由本局填註)

民國 93 年 12 月修正

發 明 專 利 說 明 書  
新 型

|             |               |   |
|-------------|---------------|---|
| 一、發明<br>名稱  | 中 文           | 新穎之內生植物性真菌及其利用方法  |
|             | 英 文           | Novel endophytic fungi and methods of use   |
| 二、發明<br>創作人 | 姓 名           | (1) 蓋瑞 史崔貝爾 Strobel, Gary A.<br>(2) 丹尼斯 曼克 Manker, Denise C.<br>(3) 朱利安 莫察 Mercier, Julien  |
|             | 國 籍           | (1) 美國                      (2) 美國                      (3) 加拿大   |
|             | 住、居所          | (1) 美國蒙大拿州波茲曼菲爾威大道二一〇七號<br>2107 Fairway Drive, Bozeman, MT 59715, U.S.A.<br>(2) 美國加州·大衛培度弄3037號<br>3037 Prado Lane, Davis, CA 95616, USA<br>(3) |
| 三、申請人       | 姓 名<br>(名稱)   | (1) 蓋瑞 史崔貝爾<br>Strobel, Gary A.   |
|             | 國 籍           | (1) 美國  |
|             | 住、居所<br>(事務所) | (1) 美國蒙大拿州波茲曼菲爾威大道二一〇七號<br>2107 Fairway Drive, Bozeman, MT 59715, U.S.A.  |
|             | 代 表 人<br>姓 名  | (1)   |

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 2 )

94年5月20日修(更)正替換頁

似乎常為某一物種所特有 ( Schnurer 等人 , 1 9 9 9 ; Rapior 等人 , 2 0 0 0 ) 。 Dennis & Webster(1971)曾報導說特殊木黴屬 ( Trichoderma spp. ) 真菌所製造之揮發性物質可以抑制受試真菌如 *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* 及 *Fusarium oxysporum* 之生長。但此等作者並未報導此等物質對任何受試真菌具致死作用, 而且並沒有對此等揮發性化學物質作詳細的化學分析, 不過曾建議乙醛為其中一種揮發性物質。所以, 雖然多年以來人們曾對諸真菌培養物之揮發性化合物略加注意, 但是卻不曾報導過由真菌所產生之能殺死微生物之揮發性混合物 ( lethal mixture of volatile antimicrobials ) 。

同樣習知地多種微生物可展現出能控制植物疾病之生物活性。雖然在鑑別及發展生物性殺蟲劑以控制具農業及園藝重要性之不同植物疾病的領域上人們已有所進展, 不過大多數所用殺蟲劑仍屬合成性的化合物。許多此等化學性的殺真菌劑已被 E P A 列為致癌物質且對於野生動物及其它非目標物種有毒。舉例來說, 甲基溴為一種廣泛使用的土壤用殺真菌劑且可用來處理採收後之微生物感染現象。但由於甲基溴對於人類及動物有高度毒性且對於大氣有不良影響, 所以甲基溴的使用即將被制止, 故而極需要發掘出能替代此物質及其它合成性殺蟲劑之較安全的替代品。

發明概述：

本發明提供包括 *Muscodor albus* 及 *Muscodor roseus* 之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

94年5月20日修(更)A7  
B7

### 五、發明說明 ( 3 )

新穎內生植物性真菌，其可產生具有抗真菌、細菌、昆蟲及線蟲活性之揮發性抗生素的混合物。於一項要點中，該 *Muscodor* 菌株係使用在此提供的資料來鑑別，其包括但不限於列在序列編號 ( SEQ IN NOs ) 第 1 至 4 號之部份基因體序列。根據國際承認用於專利程序的微生物保存布達配斯條約，兩株新穎菌株在 2002 年二月 1 日已寄存在 NRRL，其寄存編號分別為第 30547 號及第 30548 號，且亦於 2002 年 7 月 8 日寄存於台灣食品工業發展研究所 (FIRDI) 之生物資源保存中心 (BCRC)，其寄存編號分別為 CCRC 930054 和 CCRC 930055。

本發明亦提供含有該真菌及 / 或該等揮發性物質之組成物。該等組成物可用來處理土壤，並保護植物、種籽、果粒及果實免於受到病原性真菌及細菌的侵犯。該等組成物亦可用來保護採收後的食物免於細菌性及真菌性感染。該等組成物可進一步地用來處理人類或動物廢棄物及用來處理及 / 或預防建築物及建材如木頭上有毒霉菌的出現。本發明進一步提供處理及預防土壤、植物、種籽、果實、排泄廢物、建築材料及採收後食物產品遭受細菌、昆蟲、線蟲及真菌感染之方法。

表格簡單說明：

表 1 顯示 *M. albus* 之揮發性化合物及 *M. albus* 諸化合物之人造混合物對一組測試微生物的效果。將該等測試微生物暴露在 *M. albus* 氣體後，再評估氣體移除後該等微生物的活性。該人造氣體則係由 *M. albus* 氣體分析後所鑑別

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

98年9月9日修(更)正本

五、發明說明(1)

序列表

<110> 蓋瑞 史崔貝爾

<120> 新穎之內生植物性真菌及其利用方法

<140> 091107629

<141> 2002-04-15

<150> US 60/283,902

<151> 2001-04-16

<150> US 60/363,072

<151> 2002-03-11

<160> 4

<170> FastSEQ windows 版 4.0

<210> 1

<211> 2089

<212> DNA

<213> Muscodor albus

<400> 1

|            |            |            |             |            |             |      |
|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| ccggttgatc | ctgccagtag | tcatatgctt | gtctcaaaga  | ttaagccatg | catgtctaag  | 60   |
| tataagcaat | tatacagcga | aactgcgaat | ggctcattaa  | atcagttatc | gtttatttga  | 120  |
| tagtacctta | ctacttggat | aaccgtggta | attctagagc  | taatacatgc | taaaaatccc  | 180  |
| gactcacgga | gggatgtatt | tattagatta | aaaaccaatg  | cccctcgggg | ctttctgggtg | 240  |
| attcataata | acttcacgaa | tcgcatggcc | ttgctcggcc  | gatggttcat | tcaaatttct  | 300  |
| gccctatcaa | ctttcgatgg | cagggctttg | gcctgccatg  | gttacaacgg | gtaacgggag  | 360  |
| gttagggctc | gaccccgag  | aaggagcctg | agaaacggct  | actacatcca | aggaaggcag  | 420  |
| caggcgcgca | aattacccaa | tcccgcacag | gggaggtagt  | gacaataaat | actgatacag  | 480  |
| ggctcttttg | ggtcttgtaa | ttggaatgag | tacaatttaa  | atcccttaac | gaggaacaat  | 540  |
| tggagggcaa | gtctggtgcc | agcagccgag | gtaattccag  | ctccaatagc | gtatatttaa  | 600  |
| gttgtgcag  | ttaaaaagct | cgtagtggaa | ccttgggctt  | ggctggccgg | tccgcctcac  | 660  |
| cgctgcact  | ggttcggccg | ggcctttccc | tctggggagc  | cccatgcctt | tcattaggtg  | 720  |
| tggtagggaa | ccaggacttt | tactgtgaaa | aaattagagt  | gttcaaagca | ggcctatgct  | 780  |
| cgaatacatc | agcatggaat | aatagaatag | gacgtgtggt  | tctattttgt | tggtttctag  | 840  |
| gaccgccgta | atgattaata | gggacagtcg | ggggtgtcag  | tattcaattg | tcagaggtga  | 900  |
| aattcttggg | tttattgaa  | actaactact | gcgaaagcat  | tcaccaagga | tgttttcatt  | 960  |
| aatcaggaac | gaaagttagg | ggatcgaaga | cgatcagata  | ccgtcgtagt | cttaaccata  | 1020 |
| aactatgccg | actagggatc | gggctgtggt | atgttttgac  | ccgctcggca | ccttacgaga  | 1080 |
| aatcaaagtc | tttgggttct | ggggggagta | tggctcgaag  | gctgaaactt | aaagaaattg  | 1140 |
| acggaagggc | accaccagga | gttaaccagc | gttacattcg  | tgcgactctg | ctccaaaag   | 1200 |
| taggcctgta | gaaggctcgg | tggcttgctg | ataactacta  | gtctcctgta | atggaggcga  | 1260 |
| caccctaaa  | gtgcggggac | atcctgttaa | aagtctagac  | gccggacctg | gctcggaaac  | 1320 |
| gagtcaggg  | cgccagatta | accatctggg | ttggctaata  | agtgtagac  | ttgggactat  | 1380 |
| ccgcagccaa | acacctgagc | tgctagcagt | acgggtggagg | ttcagagact | tgacaggggt  | 1440 |
| gggtgagcag | tgttcgcttg | cttaagataa | agtccgggga  | cgatgaaaa  | tgagtccaa   | 1500 |
| ctgtaataac | ttacaaccgt | aataacggga | gcctgcggct  | taatttgact | caacacgggg  | 1560 |
| aaactcacca | ggtccagaca | caatgaggat | tgacagattg  | agagctcttt | cttgattttg  | 1620 |
| tgggtggtg  | tgcatggccg | ttcttagttg | ctggagtgat  | ttgtctgctt | aattgcgata  | 1680 |
| acgaagcga  | cttaaacctg | cttaattgac | gctattgctt  | tggcagtagg | ctggcttctt  | 1740 |
| agagggacta | tccgctcaag | cggatggaag | tttgaggcaa  | taacaggtct | gtgattccct  | 1800 |
| tagatgttct | gggcccgcag | cgctttacac | tgacaggggc  | agcgagtact | tccttagcag  | 1860 |
| agatgcttgg | gtaatcttgt | taaaccctgt | cgtgctgggg  | atagagcatt | gcaattattg  | 1920 |
| ctcttcaacg | aggaattcct | agtaagcgta | agtcatcaac  | ttgctgtgat | tacgtccctg  | 1980 |
| ccctttgtac | acaccgcccg | tcgctactac | cgattgaaatg | gctcagtgag | gctttcggac  | 2040 |

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(2)

tggccaggg gagtcggcaa cgacaccca gggccgaaa gttatccaa 2089

<210> 2
<211> 652
<212> DNA
<213> Muscodor albus

<400> 2
tggagtaaa agtcgtaaca aggtctcctg tgggtaacca gcggagggat cattacagag 60
ttttccaac tcccaaccct atgtgaactt acctttgttg cttcggcggc ggaggctacc 120
ctatagggga taccacatag tggttaccct gtagtcccag gtgctagatc gtgctcaacg 180
tcttatcgtc tacgactagc taccgggtg ccttccccgc cggcggccaa ctaaactctg 240
ttttatggc attctgaatt ataaacttaa taagttaaaa cttcaacaa cggatctctt 300
ggttctggca tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag taatgtgaat tgcagaattc 360
agtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgccatta gcattctagt gggcatgcct 420
gttcgagcgt catttcacca ctttaagcct gttgcttagc gttgggagcc tacggcactg 480
cccgtagctc cctaaagtga ttggcggagt tggttctcac tctaggcgta gtaaacttat 540
ctcgcctctg tagtggttcc ggcccctgcc gtaaaacccc ctatatcaaa ggttgacctc 600
ggatcaggta ggaatacccg ctgaacttaa gcatatcaat aagccgggag ga 652

<210> 3
<211> 2055
<212> DNA
<213> Muscodor roseus

<400> 3
ccagtagtca tatgcttgtc tcaaagatta agccatgcat gtctaagtat aagcaattat 60
acagcgaaac tgcgaatggc tcattaatc agttatcgtt tatttgatag taccttacta 120
cttggataac cgtggtaatt cttagagctaa tacatgctaa aaatcccgcac tcacggaggg 180
atgtatattat tagattaaaa accaatgccc ctcggggctt tctgggtgat cataataact 240
tcacgaatcg catggccttg cggcggcgat ggttcattca aatttctgcc ctatcaactt 300
tcgatggcag ggtcttggcc tgccatggtt acaacgggta acggaggggt agggctcgac 360
cccggagaag gagcctgaga aacggctact acatccaagg aaggcagcag gcgcgcaaat 420
tacccaatcc cgacacgggg aggtagtac aataaatact gatacagggc tctttgggtt 480
cttghtaattg gaatgagtac aatttaaatc ctttaacgag gaacaattgg agggcaagt 540
tgggtccagc agccgcggta attccagctc caatagccta tattaaagt gttgcagtt 600
aaaagctcgt agttgaacct tggcctggc tggccggctc gcctcaccgc gtgcaactgt 660
tcggccggggc ctttccctct ggggagccc atgcctttca ttaggtgtgg tggggaacca 720
ggacttttac tgtgaaaaaa ttagagtgtt caaagcaggc ctatgctcga atacatcagc 780
atggaataat agaataggac gtgtggttct attttgttgg tttctaggac cgccgtaatg 840
attaataggg acagtcgggg gtgtcagat tcaattgtca gaggtgaaat tcttggattt 900
attgaagact aactactgcg aaagcattca ccaaggtgt tttcattaat caggaacgaa 960
agttagggga tcgaagacga ttgcccagag cccgggggct ctggtgcaact ggttagccgg 1020
tgtatctggc cgtccataat taggcgcgag cctagttagt ctataacgca ctataggcga 1080
caccgtcaaa ttgcggggac atccttagag cctctaccac acctgcccgc tagaaatagc 1140
gagcagtcgt aacagcgtag gggattggac aatccgcagc caaatccgta ccctgagagg 1200
gctacccggg acttccgggt ggcactccgg ccaggatgca gttcacagac tagacgtcgg 1260
tgggggagta ctcttaaga tatagtcgag ccgcctaga aatggggcgt gatagaagca 1320
gataccgctc tagtcttaac cataaactat gccgactagg gatcgggagg gttattttt 1380
tgaccgctc ggcaccttac gagaaatcaa agtctttggg ttctgggggg agtatggctg 1440
caaggctgaa acttaaagaa attgacggaa gggcaccacc aggagtggag cctgaggctt 1500
aatttgactc aacacgggga aactcaccag gtccagacac aatgaggatt gacagattga 1560
gagctctttc ttgattttgt ggggtggtgg gcatggccgt tcttagttgg tggagtatt 1620
gtctgtccta attgagataa cgaacgagac ctttaacctg taaatagccc ctattgcttt 1680
ggcagtaggc tggcttcta gagggactat ccgctcaagc ggatggaagt ttgaggcaat 1740
aacaggctcgt tggatgcctt agatgttctg ggccgcacgc gcgttacact gacaggggca 1800
gagagtagct ccttagcaga gatgcttggg taatcttgtt aaaccctgtc gtgctgggga 1860
tagagcattg caattattgc tcttcaacga ggaattccta gtaagcgtaa gtcacact 1920
tgcggtgatt acgtccctgc cttttgtaca caccgcccgt cgctactacc gattgaatgg 1980
ctcagtgagg ctttcggact ggcccagggg agtcggcaac gacaccccag ggccgaaaag 2040
ttatccaaat cggtc 2055

<210> 4
<211> 650

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

## 五、發明說明 ( 3 )

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Muscodor roseus

&lt;400&gt; 4

|            |            |            |            |            |             |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| tggaagtaaa | agtcgtaaca | aggtctccgt | tggtgaacca | gctggaggat | cattacagag  | 60  |
| ttttctaaac | tccaaccct  | atgtgaactt | acctttggtg | cttcggcggc | ggaggctacc  | 120 |
| ctatagggga | taccacatag | tggttaccct | gtagtcccag | atgctagatc | gtgctcaacg  | 180 |
| tcttatcgtc | tacgactagc | taccgggtgg | ccctccccgc | cggcggccaa | ctaaactctg  | 240 |
| tttttatggc | attctgaatt | ataaacttaa | taagttaaaa | ctttcaacaa | cggatctctt  | 300 |
| ggttctggca | tcgatgaaga | acgcagcgaa | atgcgataag | taatgtgaat | tgcagaattc  | 360 |
| agtgaatcat | cgaatctttg | aacgcacatt | gcgcccatta | gcattctagt | gggcatgcct  | 420 |
| gttcgagcgt | catttaccac | ttaagccctg | ttgcttagcg | ttgggagcct | acggcactgc  | 480 |
| ccgtagctcc | ctaaagtgat | tggcggagtt | ggttctcact | ctaggcgtag | taaactctatc | 540 |
| tcgcctctgt | agtggttccg | gcccctgccg | taaaaccccc | tatatcaaag | gttgacctcg  | 600 |
| gatcaggtag | gaatacccg  | tgaacttaag | catatcaata | agccggagga |             | 650 |

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

### 六、申請專利範圍

1. 一種 *Muscodor albus* 分離培養物。
2. 一種 *Muscodor roseus* 分離培養物。
3. 一種 *Muscodor albus* 或 *Muscodor roseus* 分離培養物之用途，該用途係用於製造揮發性組成物，該揮發性組成物係用於抑制選自真菌、細菌、微生物、線蟲或昆蟲之生物的生長、或處理或保護水果、植物、種子、穀粒或植物四周之土壤免受選自真菌、細菌、微生物、線蟲或昆蟲之生物之感染、或處理或保護建材免受有毒之黴菌之感染。
4. 一種抗微生物組成物，其含有如申請專利範圍第 1 或 2 項之分離培養物及載劑。
5. 如申請專利範圍第 4 項之抗微生物組成物，其中該載劑為農藝上可接受之載劑。
6. 如申請專利範圍第 4 項之抗微生物組成物，其進一步包含農藝上有效份量之選自殺真菌劑、殺昆蟲劑、抗微生物劑、殺細菌劑、殺線蟲劑或食品保存劑的農藝用組成物。
7. 一種抑制選自真菌、細菌、微生物、線蟲或昆蟲之生物生長之方法，其包含令該生物暴露於有效份量之如申請專利範圍第 1 或 2 項之分離培養物下。
8. 一種處理或保護水果、植物、種子、穀粒或植物四周之土壤免受選自真菌、細菌、微生物、線蟲或昆蟲之生物感染之方法，其包含令該生物暴露於有效份量之如申請專利範圍第 1 或 2 項之分離培養物下。
9. 如申請專利範圍第 8 項之方法，其進一步包含令該水

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 六、申請專利範圍

果、植物、種子、穀粒或植物四周之土壤與有效份量之選自殺真菌劑、殺昆蟲劑、抗微生物劑、殺細菌劑、殺線蟲劑或食品保存劑之農藝用組成物接觸。

10. 一種處理或保護建材免受有毒黴菌感染之方法，其包含令該建材與有效份量之如申請專利範圍第 1 或 2 項之分離培養物接觸。

11. 一種鑑定新穎 *Muscodor* 真菌之方法，其包含暴露有效份量之欲被篩選的真菌於培養條件下之 *Muscodor albus* 或 *Muacodor roseus* 的揮發物下，選擇對 *Muscodor albus* 或 *Muacodor roseus* 之揮發物具抗性之真菌，及鑑定新穎的 *Muscodor* 真菌。

12. 一種獲得由如申請專利範圍第 1 或 2 項之分離培養物所產製的揮發性組成物之方法，其包含培育分離之 *Muscodor albus* 或 *Muscodor roseus* 及收集由生長之 *Muscodor albus* 或 *Muscodor roseus* 所產製的揮發性組成物。

13. 一種經分離之 *Muscodor* 真菌。

14. 如申請專利範圍第 1 項之分離培養物，其中該 *Muscodor albus* 係 *Muscodor albus* 620。

15. 如申請專利範圍第 2 項之分離培養物，其中該 *Muscodor roseus* 係 *Muscodor roseus* A3-5。

16. 一種抑制至少一種選自真菌、細菌、微生物、線蟲或昆蟲之生物生長之方法，其包含暴露該生物於有效份量之如申請專利範圍第 13 項之經分離之 *Muscodor* 真菌下。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 六、申請專利範圍

17. 一種處理或保護水果、植物、種子、穀粒或植物四周之土壤免受至少一種選自真菌、細菌、微生物、線蟲或昆蟲之生物感染之方法，其包含暴露該生物於有效份量之如申請專利範圍第 13 項之經分離之 Muscodor 真菌下。

18. 一種處理或保護建材免受有毒黴菌感染之方法，其包含暴露該建材於有效份量之如申請專利範圍第 13 項之經分離之 Muscodor 真菌下。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂