



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201316901 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：101126810 (22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 07 月 25 日

(51)Int. Cl. : *A01N25/00 (2006.01)* *C12N1/20 (2006.01)*
 C12R1/125 (2006.01)

(30)優先權：2011/07/25 美國 61/511,508
 2011/11/04 美國 61/556,016
 2012/06/19 美國 61/661,763

(71)申請人：艾格拉葵斯特公司 (美國) AGRAQUEST, INC. (US)
 美國

(72)發明人：羅依堤 理德 ROYALTY, REED NATHAN (US)；湯瑪斯 凡吉斯 THOMAS,
 VERGHESE (IN)；懷特森 羅伊 WHITSON, ROY (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：44 項 圖式數：8 共 57 頁

(54)名稱

生物性防治線蟲之方法

BIOCONTROL OF NEMATODES

(57)摘要

本發明提供使用芽孢桿菌(Bacillus)菌株作為殺線蟲劑的方法及相關組成物。



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201316901 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：101126810 (22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 07 月 25 日

(51)Int. Cl. : *A01N25/00 (2006.01)* *C12N1/20 (2006.01)*
C12R1/125 (2006.01)

(30)優先權：2011/07/25 美國 61/511,508
2011/11/04 美國 61/556,016
2012/06/19 美國 61/661,763

(71)申請人：艾格拉葵斯特公司 (美國) AGRAQUEST, INC. (US)
美國

(72)發明人：羅依堤 理德 ROYALTY, REED NATHAN (US)；湯瑪斯 凡吉斯 THOMAS,
VERGHESE (IN)；懷特森 羅伊 WHITSON, ROY (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：44 項 圖式數：8 共 57 頁

(54)名稱

生物性防治線蟲之方法

BIOCONTROL OF NEMATODES

(57)摘要

本發明提供使用芽孢桿菌(Bacillus)菌株作為殺線蟲劑的方法及相關組成物。

六、發明說明：

相關申請案

本申請案根據 35 U.S.C.第 119 條款主張下述臨時專利申請案的優先權：於 2011 年 7 月 25 日提交申請之美國臨時申請案第 61/511,508 號、於 2011 年 11 月 4 日提交申請之美國臨時申請案第 61/556,016 號及於 2012 年 6 月 19 日提交申請之美國臨時申請案第 61/661,763 號。前述之各臨時專利申請案係以引用方式將其全部內容併入本文。

【發明所屬之技術領域】

本發明關於植物寄生性線蟲之防治。

【先前技術】

植物寄生性線蟲對許多種作物造成重大損害，估計每年造成全球 5%至 12%之作物產量損失。線蟲造成根部損傷是很常見的且會導致具有較小之根系統的植物發育不良，顯示出葉片缺乏礦物質的症狀且很容易枯萎。線蟲造成之損害亦使植物易於被許多種植物致病性真菌及細菌感染。

爲了打擊和防治線蟲，農民通常使用化學殺線蟲劑。這些包括氣體及液體熏蒸(諸如甲基溴及氯化苦(chloropicrin))以施放有機磷酸鹽及胺基甲酸酯類，諸如硫磷嗪(thionazin)及歐殺滅(oxamyl)。這些化學殺線蟲劑已經持續使用了幾十年。雖然化學殺線蟲劑可有效防治標的線蟲，但這些方法有嚴格限制。一種限制爲該化學殺線蟲劑不能用來對抗

已經滲透入根部之線蟲。另一限制為與製造及使用化學殺線蟲劑相關之危險。化學殺線蟲劑具有很強的毒性並可導致人體中毒及死亡。因此，國家對此有所限制且有時禁用某些殺蟲劑。尤其是，由於甲基溴具有消耗臭氧的作用其在大多數國家中被禁用。

由於這些限制和禁令，目前缺乏可行之線蟲解決方案。本發明提供用於取代或減少使用化學殺蟲劑之安全且有效的方法。本發明在提供既能抑制線蟲滲透入植物根部，並能同時防止那些線蟲成熟以克服此初始障礙的方法上亦是獨一無二的。

【發明內容】

本發明提供用於防治植物寄生性線蟲的方法及組成物。本發明提供用於防治線蟲之方法，其包含對植物、植物部分和/或植物位置施放有效量之枯草芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis*) QST713、枯草芽孢桿菌 QST713 之突變株和/或枯草芽孢桿菌 QST713 之代謝物。於一些實施例中，該枯草芽孢桿菌 QST713 係以包括枯草芽孢桿菌 QST713、其代謝物，以及可選擇地，殘留之醱酵基質的醱酵產物形式施放。於一實施例中，該醱酵產物基本上係由枯草芽孢桿菌 QST713 細胞或枯草芽孢桿菌 QST713 突變株細胞所組成。

本發明之以枯草芽孢桿菌為基礎的組成物可減少根結線蟲 (root knot nematodes) 之蟲卵、減少根結線蟲滲透入

植物和/或抑制滲透入植物之根結線蟲成熟。於一些實施例中，標的線蟲(即，防治之線蟲)為引起疾病之根結線蟲。於某些情況下，該線蟲係來自根結線蟲(*Meloidogyne*)品種。於其他實施例中，本發明之組成物的標的線蟲為囊線蟲(cyst nematode)。於某些情況中，該標的線蟲係來自囊線蟲(*Heterodera*)品種。於其他實施例中，該標的線蟲係來自黃金線蟲(*Globodera*)品種。於其他實施例中，該標的線蟲係來自以下品種：針線蟲(*Paratylenchus*)、短體線蟲(*Pratylenchus*)、擬毛刺線蟲(*Paratrichodorus*)、小環線蟲(*Criconemella*)、螺旋線蟲(*Helicotylenchus*)、根結線蟲(*Meloidogyne*)及輪線蟲(*Criconemoides*)。於一特定之情況中，該線蟲為偽強壯螺旋線蟲(*Helicotylenchuspseudorobustus*)(螺旋 HP)或雙角螺旋線蟲(*Helicotylenchusdigonicus*)(螺旋 HD)。

於一些實施例中係將上述組成物與至少一種其他殺蟲劑(諸如殺真菌劑、殺昆蟲劑、殺線蟲劑)或除草劑混合。於一實施例中，該殺蟲劑為殺線蟲劑。於某些實施例中係將本發明之以枯草芽孢桿菌為基礎之組成物與經配製之可能從市面上購得的殺線蟲劑在桶中混合。於其他實施例中係將以枯草芽孢桿菌為基礎之組成物與活性成分(即，可以有效對抗真菌、昆蟲、線蟲或雜草之化合物)混合，然後再與惰性劑一起配製，從而使多種活性物質形成一種產品。於一實施例中，另一殺線蟲活性成分為胺基甲酸酯或有機磷酸鹽。於另一實施例中，其為生物殺線蟲劑。

本發明提供包含枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株及

第二線蟲防治劑之組成物。於一些實施例中，該第二線蟲防治劑為胺基甲酸酯或有機磷酸鹽。

本發明進一步提供另外包含配製惰性劑或其他配製成分的任何本發明組成物，該其他配製成分有，諸如多醣(澱粉、麥芽糊精、甲基纖維素)、蛋白質(諸如乳清蛋白質、肽類、膠)、糖類(乳糖、海藻糖、蔗糖)、脂類(卵磷脂、植物油、礦物油)、鹽(氯化鈉、碳酸鈣、檸檬酸鈉)及矽酸鹽(黏土、無定形二氧化矽、煙化/沈澱之二氧化矽、矽酸鹽)。於一些實施例(諸如那些其中係將組成物施放至土壤中者)中，本發明之組成物包含可促進該組成物摻入土壤中之載體，諸如水或礦物質或有機物質(諸如泥炭)。於一些實施例(諸如那些其中該組成物係用於處理種子，或作為根浸液者)中，該載體為促進組成物黏附在種子或根部之結合劑或黏貼劑。於其中該組成物係作為種子處理劑之另一實施例中，該配製成分為著色劑。於其他組成物中，該配製成分為防腐劑。

於一些實施例中，該組成物係在種植前被施放至植物、植物部分或植物之位置(諸如土壤)。於其他實施例中，該組成物係在種植時施放。再於其他實施例中，該組成物係在種植後施放。

於某些實施例中，在施放該組成物前先進行包含鑑別需要處理之植物和/或植物生長位置的步驟。於一些實施例中，該鑑別工作包括測定該植物生長的位置是否超過線蟲侵染之經濟閾值。

於一些實施例中，本發明包含套組，該套組包括枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株，以及使用其作為殺線蟲劑之指示說明。於一些實施例中，這些指示說明為產品標籤。於一些實施例中，該指示說明指導使用者以每英畝約 2×10^{12} 至約 6×10^{13} cfu 之比率使用枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株。於一些實施例中，這些指示說明係指示將作為殺線蟲劑之枯草芽孢桿菌與化學殺線蟲劑組合使用。於某些情況中，該指示說明指導使用者當使用化學殺線蟲劑作為單獨之處理劑時以低於該化學殺線蟲劑之產品標籤上所推薦者之比率使用該化學殺線蟲劑。於一些其他實施例中，該指示說明可能指導使用者將枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株施放在與植物根部接觸之土壤、植物基部之土壤或植物基部周圍特定距離內之土壤中(例如在植物基部周圍約 5 厘米、約 10 厘米、約 15 厘米、約 20 厘米、約 25 厘米、約 30 厘米、35 厘米、約 40 厘米、約 45 厘米、約 50 厘米、約 55 厘米、約 60 厘米、約 65 厘米、約 70 厘米、約 75 厘米、約 80 厘米、約 85 厘米、約 90 厘米、約 95 厘米、約 100 厘米或更遠之距離內)。該指示說明亦可能指導使用者在約 10 至約 18 天之間隔下多次施放枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株和/或以每次施放每克土壤約 7×10^5 至約 1×10^7 cfu 之比率施放。該指示說明可能進一步指導使用者在種植時組合使用枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株與化學殺線蟲劑，並在後續施藥單獨使用枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株。於一實施例中，該指示說明指導

使用者以每克土壤約 7×10^5 至約 1×10^7 cfu 之比率單次施放該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株。於另一實施例中，該指示說明指導使用者以每克土壤約 1×10^5 至約 3×10^6 cfu 之比率多次施放該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株。

發明之詳細說明

此處所提及之所有出版物、專利及專利申請案，包括任何圖形及附錄均以引用方式併入本文中，其程度如同各個別出版物或專利申請案被具體且個別地指明以引用方式併入本文中。

下列描述中包含可能有用於理解本發明之資訊。該描述並非承認此處提供之任何資訊為先前技術或與本發明目前所主張之專利有關，或者任何明確或含蓄地引用之出版物為先前技術。

SERENADE[®] 產品 (EPA 註冊編號 69592-12) 包含獨特，有專利權之枯草芽孢桿菌菌株 (菌株 QST713) 及許多不同之脂肽，這些脂肽與枯草芽孢桿菌 QST713 協同作用以破壞疾病的病原體並提供優越之抗微生物活性。SERENADE[®] 產品係用來保護植物 (諸如蔬菜、水果、堅果和蔓生作物) 對抗疾病，諸如火疫病 (Fire Blight)、灰黴病 (Botrytis)、酸腐病 (Sour Rot)、銹病 (Rust)、菌核病 (Sclerotinia)、白粉病 (Powdery Mildew)、細菌性斑點病 (Bacterial Spot) 及白黴病 (White Mold)。SERENADE[®] 產品可以液體或乾燥配方之形式取得，該配方可以葉面和/或土壤處

理劑之形式施放。SERENADE[®]產品(包括 SERENADE[®] ASO、SERENADE[®] MAX 及 SERENADE SOIL[®])之環保主標章的副本可透過全國殺蟲劑資訊檢索系統(NPIRS[®])USEPA/OPP 殺蟲劑產品標籤系統(PPLS)公開取得。

SERENADE[®] ASO(水相懸浮液-有機(Aqueous Suspension-Organic))含有 1.34%之作為活性成分的乾燥 QST713 及 98.66%之其他成分。SERENADE[®] ASO 係經配製成含有最少為 1×10^9 cfu/克之 QST713，而 QST713 之最大量則已被確定為 3.3×10^{10} cfu/克。SERENADE[®] ASO 之替代商業名稱包括 SERENADEBIOFUNGICIDE[®]、SERENADESOIL[®] 及 SERENADE[®] GARDEN DISEASE。欲瞭解更多資訊，請參閱日期為 2010 年 1 月 4 日之 SERENADE[®] ASO 及 SERENADE SOIL[®]之美國環保主標章(其各以引用方式將其全部內容併入本文)。

SERENADE[®] MAX 含有 14.6%之作為活性成分的乾燥 QST713 及 85.4%之其他成分。SERENADE[®] MAX 係經配製成含有最少為 7.3×10^9 cfu/克之 QST713，而 QST713 之最大量則已被確定為 7.9×10^{10} cfu/克。欲瞭解更多資訊，請參閱 SERENADE[®] MAX 之美國環保主標章(其以引用方式將其全部內容併入本文)。

枯草芽孢桿菌 QST713、其突變株、其上清液和其脂肽代謝物，以及使用彼等來防治植物病原體和昆蟲的方法充分地描述於美國專利案第 6,060,051；6,103,228；6,291,426；6,417,163 及 6,638,910 號中；各篇中所教示之

每項內容各被具體且全部以引用方式併入本文。在這些美國專利案中，該菌株被稱為 AQ713，此與 QST713 同義。在為專利申請程式之微生物備案取得國際承認的布達佩斯條約(Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure)的規定下，枯草芽孢桿菌 QST713 已在 1997 年 5 月 7 日存放在 NRRL，保存編號為 B21661。本專利說明書中關於 QST713 之任何引用係指如同存在於 SERENADE[®]產品中，存放在 NRRL 中之保存編號為 B21661 或在模擬製造 SERENADE[®]產品之條件下在生物反應器或搖瓶中製備之枯草芽孢桿菌 QST713(又名 AQ713)。

上文中提及之專利描述枯草芽孢桿菌 QST713 全基質之上清液對抗秀麗隱桿線蟲(*Caenorhabditiselegans*)N2 菌株的試驗。這些試驗顯示出該上清液缺乏殺線蟲活性。

在 1998 年提交美國專利申請案第 09/074,870 號(其對應於上述專利)時，QST713 菌株根據傳統、生理、生化及形態學方法被命名為枯草芽孢桿菌。芽孢桿菌種的分類學從那時開始發展，尤其是基於遺傳學和定序技術之進步，從而使物種命名主要係根據 DNA 序列，而非 1998 年所使用的方法。在比對來自解澱粉芽孢桿菌 FZB42(*B. amyloliquefaciens* FZB42)、枯草芽孢桿菌 168 及 QST713 之蛋白質序列後，在解澱粉芽孢桿菌 FZB42 中所發現之蛋白質約 95%與 QST713 中之蛋白質具有 85%或更高之同一性；而枯草芽孢桿菌 168 中之蛋白質僅 35%與

QST713 中之蛋白質具有 85%或更高之同一性。然而，即使遺傳學上具較高之信賴度，在相關的科學文獻和規範性文件中仍然存在分類上之模糊性，反映過去 15 年來對芽孢桿菌分類逐步瞭解。例如，以枯草芽孢桿菌株 FZB24(其與 FZB42 同樣與 QST713 密切相關)為基礎的殺蟲產品在環境保護局之文件中被歸類為枯草芽孢桿菌解澱粉變種。由於命名學中之這些複雜性，此特殊芽孢桿菌種根據該文件而被各自命名為枯草芽孢桿菌、解澱粉芽孢桿菌、枯草芽孢桿解澱粉菌變種。因此，如同目前僅根據序列比較及推斷之分類所預期者，我們保留枯草芽孢桿菌 QST713 之命名，而非將其更名為解澱粉芽孢桿菌。

術語“突變株”一詞係指自 QST713 衍生之遺傳變種。於一實施例中，該突變株具有 QST713 之所有識別特性。於一特定之情況中，該突變株至少如母 QST713 株般防治線蟲。於另一實施例中，突變株為其基因組序列與 QST713 菌株具有大於約 85%、大於約 90%、大於約 95%、大於約 98%或大於約 99%之序列同一性的遺傳變異體。突變株可經由以下方式取得：以化學劑或放射線處理 QST713 細胞或從 QST713 細胞群中選擇自發性突變株(諸如抗噬菌體突變株)，或藉由實行本技藝之人士所熟知之其他方式。

本發明之組成物可根據本技藝中所熟知之方法(包括使用美國專利案第 6,060,051 號中所描述的基質及其他方法)經由培養枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株取得。傳統

之大規模微生物培養方法包括液體深層醱酵、固態醱酵或液體表面培養。趨向醱酵結束時，當營養素被耗盡，枯草芽孢桿菌細胞開始從生長階段轉移到孢子形成階段，從而使醱酵的最終產物大部分為孢子、代謝物及殘餘的醱酵基質。孢子形成為枯草芽孢桿菌之自然生命週期的一部分，一般係由細胞回應養分限制開始。醱酵係經過設置以取得高水準之枯草芽孢桿菌菌落形成單位，並促進孢子形成。從醱酵產生之培養基質中的細菌細胞、孢子和代謝產物可以直接使用或藉由習知之工業方法(諸如離心、切向流過濾、深部過濾及蒸發)濃縮。本文中醱酵基質及基質濃縮物均稱為“醱酵產物”。本發明之組成物包括醱酵產物。於一些實施例中，該濃縮之醱酵基質係經由例如滲濾過程清洗，以移除殘留之醱酵基質及代謝物。

醱酵基質或基質濃縮物可在添加或不添加載體下使用習知之乾燥過程或方法(諸如噴霧乾燥、冷凍乾燥、盤式乾燥、流化床乾燥、滾筒乾燥或蒸發)乾燥。

所產生之乾燥產物可進一步加工(諸如藉由研磨或造粒)，以取得特定之顆粒大小或物理模式。下文中描述之載體亦可在乾燥後添加。

本發明之新穎變種及芽孢桿菌株的不含細胞之醱酵基質製品可藉由本技藝已知之任何方式取得，諸如萃取、離心和/或過濾醱酵基質。那些熟習本技藝之人士將可察知所謂的不含細胞之製劑可能不會毫無細胞，而是根據用來去除細胞之技術(例如，離心之速度)大致上無細胞或基本

上無細胞。所產生之不含細胞的製劑可以乾燥和/或與協助其施放在植物或植物生長基質中的組分一起配製。上文中描述之用於醱酵基質的濃縮方法和乾燥技術亦適用於不含細胞之製劑。

枯草芽孢桿菌之代謝物可根據美國專利案第 6,060,051 號中所提出之方法取得。本文所使用之術語“代謝物”可能指半純化和純化或大致上純化的代謝物，或尚未從枯草芽孢桿菌分離出的代謝物。於一些實施例中，藉由離心醱酵基質製造不含細胞之製劑後，該代謝物可藉由尺寸排阻過濾法純化，諸如交聯葡聚糖樹脂 (Sephadex resins)(包括 LH-20、G10 和 G15 及 G25)，其可將代謝物根據截留分子量分組成不同分液，諸如分子量小於約 2000 道耳吞，小於約 1500 道耳吞，小於約 1000 道耳吞，等，因為脂肽係介於 800 道耳吞至 1600 道耳吞之間。

上文中描述之用於配製醱酵基質的濃縮方法和乾燥技術亦適用於代謝物。

本發明之組成物可包括添加在包含細胞、不含細胞之製劑或代謝物的組成物中以提高效力、穩定性及可用性和/或用於協助加工、包裝及最終用途之配製惰性劑。這類配製惰性劑及成分可包括載體、穩定劑、營養物或物理性能改質劑，其可單獨或組合添加。於一些實施例中，載體可能包括液體物質，諸如水、油和其他有機或無機溶劑，以及固體物質，諸如礦物質、聚合物或生物衍生或化學合成之聚合物複合物。於一些實施例中，該載體為促進該組

成物黏附至植物之一部分(諸如種子或根)的結合劑或黏接劑。見,例如,Taylor, A. G., et al., "Concepts and Technologies of Selected Seed Treatments", *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 321-339(1990)。穩定劑可包括抗結塊劑、抗氧化劑、乾燥劑、防護劑或防腐劑。該營養物可包括碳、氮及磷的來源,諸如糖、多醣、油、蛋白質、胺基酸、脂肪酸及磷酸鹽。物理性能改質劑可包括膨脹劑、潤濕劑、增稠劑、pH調節劑、流變改質劑、分散劑、佐劑、表面活性劑、抗凍劑或著色劑。於一些實施例中,該包含細胞、不含細胞製劑或藉由醱酵產生之代謝物的組成物可不使用任何其他配製劑,在有或沒有作為稀釋劑之水的存在下直接使用。於一些實施例中,該配製惰性劑係在濃縮醱酵基質後,及乾燥期間和/或乾燥後加入。

本發明之組成物可包含載體以改善回收率、效力或物理性質和/或用於協助包裝及投服,該載體為添加在包含含有脂肽之醱酵產物、不含細胞之脂肽製劑或脂肽之純化、半純化或粗萃取物的組成物中的惰性配製成分。這類載體可單獨或組合添加。

本發明之組成物可與其他化學和非化學添加劑、佐劑和/或處理劑混合和/或輪流使用,其中這類處理包括,但不限於化學和非化學殺真菌劑、殺昆蟲劑、殺蟎劑、殺線蟲劑、肥料、營養物、礦物質、植物生長素、生長刺激劑,等。

與以枯草芽孢桿菌為基礎之本發明組成物混合的殺線

蟲劑可為化學或生物殺線蟲劑。本文所使用之術語“化學殺線蟲劑”不包括熏蒸劑，而術語“熏蒸劑”包含在種植前施藥至土壤且透過土壤(土壤中的空氣和/或土壤水分)擴散，並可以氣體(諸如甲基溴)、揮發性液體(諸如氯化苦)或揮發性固體(諸如棉隆(dazomet))形式施放的廣譜殺蟲化學劑。

於一些實施例中，該化學或生物殺線蟲劑為市售之配製產品且與本發明之組成物在桶中混合和/或輪流使用。於其他實施例中，該化學或生物殺線蟲劑之活性成分(無惰性劑)係在配製前與以枯草芽孢桿菌 QST713 為基礎之組成物混合(具惰性劑)，從而使該組成物形成一種經配製之產品。

這類混合物或輪換程式中所使用之化學殺線蟲劑有胺基甲酸酯、胺基甲酸肟酯(oximecarbmates)及有機磷殺線蟲劑。胺基甲酸酯類殺線蟲劑包括苯菌靈(benomyl)、克百威(carbofuran)(呋喃丹(FURADAN[®]))、丁硫克百威(carbosulfan)及除線威(cloethocarb)。胺基甲酸肟酯包括滅威(alanycarb)、涕滅威(aldicarb)(TEMIK[®]或為來自 Syngenta 之 AVICTA[®] Complete Pak 種子處理劑的一部分)、涕滅威(aldoxycarb)(STANDAK[®])、歐殺滅(oxamyl)(VYDATE[®])、硫雙滅多威(thiodicarb)(來自拜耳作物科學之 AERIS[®]種子施放系統的一部分)及威線肟(tirpate)。有機磷殺線蟲劑包括豐索磷(fensulfothion)(DANSANIT[®])、滅克磷(ethoprop)(MOCAP[®])、除線特(diamidafos)、苯線磷(fenamiphos)、伐線丹(fosthietan)

、磷胺(phosphamidon)、硫線磷(cadusafos)、毒死蜱(chlorpyrifos)、
、酚線磷(dichlofenthion)、大滅松(dimethoate)、噻唑磷
(fosthiazate)、速殺硫磷(heterophos)、依殺滅朵松(isamidofos)
、依殺松(isazofos)、甲拌磷(phorate)、磷克(phosphocarb)、
特丁磷(terbufos)、硫磷嗪(thionazin)、三唑磷(triazophos)
、依米噠磷(imicyafos)及甲基滅蚜磷(mecarphon)。各化合物
後之附加說明的名稱爲上述各化學物質之代表性市售配
製劑。其他有用於這類混合物之化學殺線蟲劑包括螺蟲乙
酯(spirotetramat)(MOVENTO[®])、MON37400 殺線蟲劑及氟
蟲腓(fipronil)。

用於這類混合物或輪換程式中的生物殺線蟲劑包括幾丁
質與尿素混合物、堆肥萃取物及茶(包括經曝氣及未經曝氣
二者)；包含真菌疣胞漆斑菌(*Myrothecium verrucaria*)和/或
來自疣胞漆斑菌之代謝物之組成物(市售商品爲 DITERA[®])
、包含真菌淡紫擬青黴(*Paecilomyces lilacinus*)之組成物(
市售商品爲，例如 MELOCON[®]或 BIOACT)；包含巴斯德
氏芽菌屬(*Pasteuria*)之細菌(包括 *P. usgae*)的組成物(市售
商品爲，例如 ECONEM[®])；包含來自芽孢桿菌屬之細菌的
組成物，該芽孢桿菌屬之細菌包括堅強芽孢桿菌(*Bacillus*
firmus)(包括在 1995 年 5 月 29 日保存在法國巴斯德研究
所國家微生物收集和培養中心，保存編號爲 CNMC I-1582
之菌種，市售商品爲，例如 VOTIVO[®])、枯草芽孢桿菌、
解澱粉芽孢桿菌、短小芽孢桿菌(*Bacillus pumilus*)(包括
於 1999 年 1 月 14 日保存在 NRRL 之編號爲 B-30087 的菌

種和其突變株)及蠟樣芽孢桿菌(*Bacillus cereus*)；以及包含殺線蟲之鏈黴菌屬(諸如利迪鏈黴菌(*Streptomyces lydicus*))的組成物(市售商品為 ACTINOVATE[®])。生物殺線蟲劑亦包括以植物為基礎之殺線蟲劑，諸如以棟樹(包括來自該植物的種子或油)或印棟素(*azadirachtin*)、棟樹種子之二次代謝物為基礎的產品、以芝麻油為基礎的產品(諸如 DRAGONFIRE[®])、香芹酚及以植物萃取物(諸如 NEMA-Q[®]，從智利之奎拉雅皂樹(*Quillajasaponaria*)取得)為基礎的產品。生物殺線蟲劑亦包括分離出之由細菌所產生的化合物，諸如由阿弗曼鏈黴菌(*Streptomyces avermentilis*)製造之菌素(mectins)，包括阿維菌素(*abamectin*)(其係由阿維菌素 B1a 及 B1b 之組合物所組成)和除蟲菌素(*avermectin*) B2a，以及最初在梨火疫病菌(*Erwinia amylovora*)中被鑑定出之超敏蛋白(Harpin 蛋白)，包括超敏蛋白_{EA}及超敏蛋白_{αβ}。

本發明之組成物有用於防治植物寄生性線蟲，諸如，例如根結、囊、病變及環線蟲，包括根結線蟲屬(*Meloidogyne* spp.)、孢囊線蟲屬(*Heterodera* spp.)、黃金線蟲屬(*Globodera* spp.)、短體線蟲屬(*Pratylenchus* spp.)和小環線蟲屬(*Criconemella* sp.)。該組成物亦有用於防治杉木半穿刺線蟲(*Tylenchulus semipenetrans*)、毛刺線蟲屬(*Trichodorus* spp.)、長針線蟲屬(*Longidorus* spp.)、腎狀線蟲屬(*Rotylenchulus* spp.)、劍線蟲屬(*Xiphinema* spp.)、刺線蟲屬(*Belonolaimus* spp.)(諸如長尾刺線蟲(*B. longicaudatus*))、輪線蟲屬(*Criconemoides* spp.)、矮化線蟲屬

(*Tylenchorhynchus* spp.)、紐帶線蟲屬(*Hoplolaimus* spp.)、盤旋線蟲屬(*Rotylenchus* spp.)、螺旋線蟲屬(*Helicotylenchus* spp.)(諸如偽強壯螺旋線蟲(*Helicotylenchuspseudorobustus*)(螺旋 HP)及雙角螺旋線蟲(*Helicotylenchusdigonicus*)(螺旋 HD))、穿孔線蟲屬(*Radopholus* spp.)(諸如柑橘穿孔線蟲(*R.citrophilis*)及相似穿孔線蟲(*R. similis*))、莖線蟲屬(*Ditylenchus* spp.)、擬毛刺線蟲屬(*Paratrichodorus* spp.)及其他植物寄生性線蟲。於一些實施例中，該標的為孢囊線蟲，諸如大豆孢囊線蟲(*Heteroderaglycines*)(soybean cyst nematode)、甜菜孢囊線蟲(*Heterodera schachtii*)(beet cyst nematode)、禾穀孢囊線蟲(*Heterodera avenae*)(Cereal cyst nematode)、南方根結線蟲(*Meloidigyne incognita*)(Cotton(或 southern)root knot nematode)、馬鈴薯金線蟲(*Globoderarostochiensis*)及馬鈴薯孢囊線蟲(*Globoderapallida*)(potato cyst nematodes)。於其他實施例中，該標的為根結線蟲，諸如南方根結線蟲(棉根結線蟲)、爪哇根結線蟲(*M. javanica*)(Javanese root knot nematode)、北方根結線蟲(*M. hapla*)(Northern root knot nematode)及花生根結線蟲(*M. arenaria*)(peanut root knot nematode)。

本文中所使用之術語“防治”係指滅殺、在數量上減少和/或減少根結線蟲生長、攝食或正常生理發育，包括根結線蟲滲透根及在根內發育的能力。有效量為能顯著減少線蟲生長、攝食、根部滲透、在根部成熟和/或整體正常線蟲生理發育和/或因感染線蟲造成之植物宿主的症狀(

諸如形成蟲癭或減少根和/或植物生長)的量。於一些實施例中，症狀和/或線蟲係減少至少約 5%、至少約 10%、至少約 20%、至少約 30%、至少約 40%、至少約 50%、至少約 60%、至少約 70%、至少約 80%或至少約 90%。

本發明之組成物可用於處理多種農業和/或園藝作物，包括用於長成種子、生產和景觀美化者。可使用本發明之組成物處理的代表性植物包括，但不限於下列者：球根類蔬菜；穀物；柑橘類水果(諸如葡萄柚、檸檬和橙橘)；棉花及其他纖維作物；葫蘆科植物；茄果類蔬菜；葉菜類蔬菜(諸如芹菜、結球和散葉萵苣及菠菜)；豆類；油籽作物；花生；梨果類水果(諸如蘋果及梨)；核果類(諸如杏仁、胡桃及核桃)；根蔬菜；塊莖類蔬菜；球莖類蔬菜；煙草、草莓和其他漿果；油菜作物(諸如西蘭花和捲心菜)；葡萄；菠蘿；及開花植物、花壇植物和觀賞植物(諸如蕨類植物及玉簪)。本發明之組成物亦可用於處理多年生植物，包括種植作物，諸如香蕉和咖啡，以及出現在森林、公園或景觀美化場者。

本文所描述之組成物係施放在植物、植物之一部分(諸如種子、根、根莖、球莖、球根或塊莖)和/或該植物或植物部分生長的位置(諸如土壤)以防治植物寄生性線蟲。本發明之組成物可以葉面噴灑液之形式、種子/根/塊莖/根狀莖/球根/球莖處理劑之形式和/或土壤處理劑之形式施放。該種子/根/塊莖/根狀莖/球根/球莖可在種植前、種植期間或種植後接受處理。

本文所描述之組成物係施放在植物、植物之一部分(諸如種子、根、根莖、球莖、球根或塊莖)和/或該植物或植物部分生長的位置(諸如土壤)以防治線蟲，從而增加作物產量。於一些實施例中，作物產量係增加至少約 5%，於其他實施例中，作物產量係增加至少約 10%，再於其他實施例中，作物產量係增加至少約 15%，還有其他實施例中，作物產量係增加至少約 20%。

當作爲種子處理劑時，本發明之組成物根據種子的大小以約 1×10^2 至約 1×10^9 cfu/種子之比率施放。於一些實施例中，該施放率爲約 1×10^3 至約 1×10^8 cfu/種子或約 1×10^4 至約 1×10^7 cfu/種子。

本發明之組成物亦可以根浸液之形式以約 1×10^3 至約 1×10^8 cfu/植物根系統之比率施放。

當作爲土壤處理劑時，本發明之組成物可以土壤表面灌注液之形式從耨柄打入、注入和/或施放在犁溝中或與灌溉用水混合進行施放。可在種植前、播種期間、或播種後、或移栽後及植物生長的任何階段施放之灌注液土壤處理劑的施放率爲每英畝約 4×10^7 至約 8×10^{14} cfu、或每英畝約 4×10^9 至約 8×10^{13} cfu、或每英畝約 4×10^{11} 至約 8×10^{12} cfu、或每英畝約 2×10^{12} 至約 6×10^{13} cfu、或每英畝約 2×10^{12} 至約 3×10^{13} cfu。於一些實施例中，該施放率爲每英畝約 1×10^{12} 至約 6×10^{12} cfu，或每英畝約 1×10^{13} 至約 6×10^{13} cfu。在種植時用於犁溝處理劑之施放率爲每 1000 行腳約 2.5×10^{10} 至約 5×10^{11} cfu。於一些實施例中，該施放

率為每 1000 行腳約 6×10^{10} 至約 3×10^{12} cfu，或每 1000 行腳約 6×10^{10} 至約 4×10^{11} cfu，或每 1000 行腳約 6×10^{11} 至約 3×10^{12} cfu，或每 1000 行腳約 6×10^{11} 至約 4×10^{12} cfu。熟習本技藝之人士將瞭解如何調整用於撒播處理劑和其他較不常見的土壤處理劑之比率。

本發明之組成物可在種植之前或種子發芽之前被引入土壤中。本發明之組成物亦可被引入與植物的根接觸之土壤、植物基部的土壤或植物基部周圍(例如在植物基部周圍約 5 厘米、約 10 厘米、約 15 厘米、約 20 厘米、約 25 厘米、約 30 厘米、約 35 厘米、約 40 厘米、約 45 厘米、約 50 厘米、約 55 厘米、約 60 厘米、約 65 厘米、約 70 厘米、約 75 厘米、約 80 厘米、約 85 厘米、約 90 厘米、約 95 厘米、約 100 厘米或更遠的距離內)或植物基部下方的土壤中。該組成物可藉由使用多種技術施放，包括，但不限於滴灌、噴水器、土壤注射或土壤灌藥。該組成物亦可施放在塞狀育苗盤中之土壤和/或植物上，或在移栽到不同的植物位置之前施放幼苗。當施放在與植物的根接觸之土壤、植物基部或植物基部周圍之特定距離內(包括為土壤灌藥處理劑之形式)時，該組成物可以單次施藥或多次施藥之形式施放。該組成物可以上文列舉之用於土壤灌藥處理的比率或每克土壤約 1×10^5 至約 1×10^8 cfu、每克土壤約 1×10^5 至約 1×10^7 cfu，每克土壤約 1×10^5 至約 1×10^6 cfu、每克土壤約 7×10^5 至約 1×10^7 cfu、每克土壤約 1×10^6 至約 5×10^6 cfu 或每克土壤約 1×10^5 至約 3×10^6 cfu 施放

。於一實施例中，本發明之組成物係以每克土壤約 7×10^5 至約 1×10^7 cfu 之比率單次施放。於另一實施例中，本發明之組成物係以每克土壤約 1×10^6 至約 5×10^6 cfu 之比率單次施放。於其他實施例中，本發明之組成物係以每克土壤約 1×10^5 至約 3×10^6 cfu 之比率多次施放。

當本發明之組成物係以多次施藥來施放時，這些施放程式可能間隔約 1 至約 28 天、約 1 至約 21 天、約 1 至約 14 天、約 7 至約 28 天、約 7 至約 21 天、約 7 至約 14 天或約 10 至約 18 天進行。

本發明之以枯草芽孢桿菌為基礎的組成物可單獨施放或與一或多種其他殺線蟲劑(諸如化學和生物殺線蟲劑)組合施放。於一些實施例中係將枯草芽孢桿菌 QST713 與至少一種其他殺線蟲劑共同配製並將該經共同配製之產品施放在植物或植物位置上。於一些其他實施例中，該以枯草芽孢桿菌為基礎的組成物係與市售之化學或生物殺線蟲製劑在桶中混合，並施放在植物及植物位置上。於其他實施例中，本發明之以枯草芽孢桿菌為基礎的組成物係緊接在施放該市售之化學或生物殺線蟲製劑之前或之後施放在植物和/或植物位置上。於其他實施例中，本發明之以枯草芽孢桿菌為基礎的組成物係與市售之化學或生物殺線蟲製劑輪流施放至植物及/或植物位置上。於涉及數次施放殺線蟲劑之輪流施放的程式中，本發明之組成物可單獨或與其他殺線蟲劑組合施放。於一種情況中，該以枯草芽孢桿菌為基礎的組成物係以種子處理劑之形式施放，或以犁溝

或灌注處理劑之形式施放，如下文中所更詳細討論者。

雖然本申請者不欲受限於任何特定理論，枯草芽孢桿菌 QST713 被認為係藉由受處理之植物中的經誘導系統抗性(Induced Systemic Resistance)(ISR)來防治線蟲。對於 ISR 之解釋請參閱 Bakker, P. A. H. M., “Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp.” *Phytopathology* 97(2): 239-243(2007)。ISR 可能有僅在介於以枯草芽孢桿菌 QST713 處理與隨後以線蟲挑戰植物之間的某一滯後期後才會生效。於一些實施例中，該以枯草芽孢桿菌為基礎的組成物係在種植時與第二殺線蟲劑組合施放，且後續施藥係單獨施放該以枯草芽孢桿菌為基礎的組成物或與另一種殺線蟲劑組合施放。以第二殺線蟲劑進行之初次處理可在滯後期之期間保護植物，直到該以枯草芽孢桿菌為基礎的組成物已觸發 ISR。在上述實施例的一些情況中，該第二化學或生物殺線蟲劑之市售製劑係以低於該第二化學或生物殺線蟲劑之產品標籤上所推薦之用作單獨之殺線蟲劑的比率施放。於一實施例中係在種植時將枯草芽孢桿菌 QST713 與歐殺滅(VYDATE[®])一起施放，並於後續施藥單獨施放枯草芽孢桿菌 QST713。

於其他實施方式中，本發明之以芽孢桿菌為基礎的組成物係在施放熏蒸劑後施放在植物和/或植物位置。熏蒸劑可藉由旋液肥開溝器(shank injection)進行施放，一般係在土壤表面下至少 8 英寸。熏蒸劑之液體製劑亦可以透過表面滴灌化學灌溉施放以使熏蒸劑移至土壤表面下 8 英

寸或更深。以塑膠布覆蓋經處理之土壤床來將熏蒸劑保留在土壤中數天。此係在種植前完成並使空氣在種植前排出。此處所描述之以芽孢桿菌為基礎的組成物係在將空氣排出後，在種植之前、種植時或種植之後施放。於一些實例中，該熏蒸劑係以低於該產品標籤上所推薦之比率施放。

化學和生物殺線蟲劑描述於上文中。熏蒸劑殺線蟲劑包括鹵代烴，諸如氯化苦(CHLOR-O-PIC)；甲基溴(METH-O-GAS)及其組合(諸如 BROM-O-GAS 及 TERR-O-GAS)；1,3-二氯丙烯(TELONE II、TELONE EC、CURFEW)及1,3-二氯丙烯與氯化苦之組合物(TELONE C-17、TELONE C-35及 INLINE)；碘甲烷(MIDAS)；甲基異氰酸酯釋出劑，諸如甲基二硫代胺基甲酸鈉(VAPAM、SOILPREP、METAM-SODIUM)；1,3-二氯丙烯與異硫代氰酸甲酯(VORLEX)之組合物；和二硫化碳釋出劑，諸如四硫代碳酸鈉(ENZONE)；及二甲基二硫化物或 DMDS(PALADINO)。上述各熏蒸劑之商品製劑的實例提供在化學名稱後之括號內。

本發明之組成物亦可作為經整合之蟲害管理("IPM")方案的一部分來施放。這類方案描述於各種出版物中，尤其是由大學合作推展所出版者。這類方案包括以不能作為目標線蟲之宿主的作物輪作、栽培和耕作方式以及使用移植。例如，該以芽孢桿菌為基礎之組成物可在芥末或其他抑制線蟲作物之生長季節後施放。

於一些實施例中，先鑑別需要處理之位置後再將本發明之組成物施放在植物、植物部分或植物位置上。這種鑑

別可能透過視覺鑑別顯示出萎黃病、發育不良、壞死或枯萎(即，顯示出營養不足)的植物，通常再加上對線蟲問題之歷史的知識來進行；植物採樣；和/或土壤採樣。植物採樣可能在生長季節期間進行或在最終收穫後立即採樣。將植物從土壤中移出並檢查其根，以測定在一片田野內之線蟲問題的性質和程度。在根結線蟲方面，根癭嚴重性係經由測量形成蟲癭之根系的比例來測定。由根結線蟲引起的蟲癭可與固氮土壤細菌之小瘤區別，因為蟲癭不容易與根部分離。根結線蟲土壤族群隨著根癭之嚴重性而增加。於一些情況中，在種植任何易感染的作物時檢測到任何程度之根癭係暗示有根結線蟲的問題，尤其是在採樣區中或採樣區附近。孢囊線蟲亦可藉由植物採樣及詳盡檢查根部之孢囊來鑑別。

土壤採樣提供測定侵染一定體積之土壤或根部的線蟲和/或線蟲蟲卵的數量之方法。在初次懷疑問題時、最後收穫時或在種植新作物之前的任何時間(包括先前作物之作物破壞前)可進行土壤採樣。大學合作推廣方案提供土壤採樣服務，包括佛羅裏達大學、俄勒岡州立大學及內布拉斯加-林肯大學。此外，這類方案提供如何收集樣本之指導。例如，於收穫後預測採樣之一種方法中係以規律的之字形模式從超過 5 或 10 英畝(取決於作物的價值，較高價值之作物的採樣英畝較少)之 10 至 20 個田野位置收集 6 到 10 英寸深之土壤樣本。於一測試已建立之植物的方法中係從有症狀，但並非死亡或垂死的可疑植物移出根及土

壤深度為 6 至 10 英寸之土壤樣本。

於一些實施例中，鑑別係涉及測定線蟲侵染是否已達到經濟閾值；亦即，預計未經處理的經濟損失會超過處理費用的點。該經濟閾值係根據種植之作物、地理、氣候、時間、土壤類型和/或土壤溫度而改變。關於此主題之論文已發表多篇且可從不同領域之大學合作推廣方案中取得指導方針。見，例如 Robb, J.G., et al., "Factors Affecting the Economic Threshold for *Heterodera schachtii* Control in Sugar Beet," *Economics of Nematode Control* January-June 1992; Hafez, Saad L., "Management of Sugar Beet Nematode," *University of Idaho Current Information Series (CIS) 1071* (1998); 及 *UC IPM Pest Management Guidelines: Tomato* UC ANR Publication 3470 Nematodes A. Ploeg, *Nematology*, UC Riverside (January 2008)。本技藝之一般技術人士熟知測定特定作物在一年之特定時間內的經濟閾值之技術。

於一些實施例中，該土壤採樣透露出線蟲侵染將會導致產量為未受侵染土壤之正常產量的約 80%、約 90%或約 95%。

於一些實施例中，每公斤土壤樣本之根結線蟲幼蟲的經濟閾值為至少約 250、至少約 300、至少約 500、至少約 750、至少約 1000、至少約 2000、至少約 3000、至少約 4000、至少約 5000 或至少約 6000。

於一些實施例中，每 1 立方厘米土壤之孢囊線蟲卵及

幼蟲的經濟閾值為至少約 0.5、至少約 1、至少約 2、至少約 3、至少約 4。根據上述之 Hafez(1998)，一個孢囊可能被估計為 500 個可存活之卵及幼蟲。

下列實施例僅用於說明，而非用於限制本發明。

【實施方式】

實例 1

枯草芽孢桿菌 QST713 對抗爪哇根結線蟲 (*Meloidogyne javanica*) 的活性

以黃瓜種子蘇丹 (Sultan) 變種進行研究，以測定 QST713 對抗爪哇根結線蟲的活性。以不同比率之 QST713 的全基質或市售之 SERENADE[®] ASO 產品處理含有 20 克砂和一個未發芽之種子的 50 毫升離心管。該全基質與 SERENADE[®] ASO 產品之不同處在於該產品在菌落形成單位 (cfu) 和代謝物方面較濃縮，該產品之 cfu 至少較該全基質高 1 個對數。此外，除了其他成分外，該產品與防腐劑一起配製，從而使該產品較全基質酸。為了取得 QST713 之全基質培養液，在含有 Luria 基質 (LB) 之種子燒瓶中接種 QST713 並將其於 30°C 下培養一整夜。第二天，將來自各種子燒瓶的等分試樣接種入在 1 升搖瓶中之 200 毫升的以大豆為底質的基質中並生長至孢子形成。簡單地說，將搖瓶培養物維持在 30°C 至 32°C 之溫度下且將搖動器之速度設為 200 至 220 rpm。約培養 3 天後，當細胞生長和代謝物的產生已經停止時，收穫該培養基質。令處理過之種

子在溫室中發芽並生長。處理後(DAT)四到五天，在各管中接種 100 隻根結線蟲之二齡幼蟲。10 DAT，將幼苗之根癭百分比評為 0-4 級，結果描述於表 1 中。

然後，以酸品紅(fuschin)為根染色以觀察線蟲滲透及發育，並在萊卡(Leica)解剖顯微鏡下觀察。在線蟲滲透方面，計算每一根部內之全部線蟲幼蟲數。在線蟲發育方面，計算全部脂肪幼蟲之數量(包括晚二齡幼蟲(J2's)及三齡幼蟲(J3's))。如表 1 中之詳細描述為線蟲滲透入根部之程度及滲透後之線蟲發育評級。所使用之技術的細節請參閱 C. O. Omwega, 等人, "A Nondestructive Technique for Screening Bean Germ Plasm for Resistance to *Meloidogyne incognita*," *Plant Disease*(1988)72(11): 970-972。

表 1.細菌全基質之線蟲拮抗活性的評級計劃。結癭指數係根據根癭的百分比。滲透等級係以相對於未處理之對照組(UTC)中的線蟲幼蟲的線蟲幼蟲平均總數計算。該發育等級反映出根內之脂肪線蟲幼蟲(晚 J2 齡/J3 齡)的總數。

結癭指數		滲透等級		發育等級	
0	無	0	無	0	無
1	1-24%	1	1-10%	1	1-3
2	25-49%	2	11-50%	2	3-10
3	50-74%	3	51-75%	3	11-30
4	>75%	4	76-100%	4	>30

第 1 圖顯示出與未處理的對照組相比較，施放 QST713 全基質可減少根癭形成。第 2 圖顯示出與未處理之對照組相比較，施放各種比率之 SERENADE[®] ASO 產品可減少結癭、滲透及發育。注意，因為該數據係以上述的評級系統為基礎，其並不總是可能觀察到劑量反應。

實例 2

AQ713 於防治番茄中之根結線蟲卵的效力

以番茄種子進行另一項實驗以測試 QST713 對抗根結線蟲卵之效力。AQ713-批次 1 為如實施例 1 中之描述製備的全基質培養。於生物反應器中製備 AQ713-批次 2 和 AQ713-批次 3。簡單地說，將一小瓶貯存培養液解凍並轉移到無菌 Difco 營養基質之燒瓶中。然後，將燒瓶培養液培育在溫度為 28°C 至 32°C 的旋轉搖動器上，旋轉速度為 200 至 220rpm 以促進細胞生長並取得高細胞密度，然後將其加入在 20 升生物反應器中之 12 升的以大豆為底質的生長培養基中。將該生物反應器之溫度設定為 30°C 至 32°C，攪拌速度設為 500 至 1000 rpm，pH 值在 6 至 8 之間緩衝，通氣量設為 0.5 至 1.0 VVM。約培養 3 天後，當細胞生長和代謝物的產生已經停止時，收穫該培養液。藉由灌藥以 QST713 處理三週齡之番茄植株。然後，將花盆保持在溫室 10 天，再於每盆中接種 5000 個根結線蟲(“RKN”)卵。接種線蟲後 42 天收穫植物。依 Hussey RS, Barker KR, "A Comparison of Methods of Collecting Inocula of

Meloidogyne spp., Including a New Technique, "Plant Disease Reporter, 1973; 57: 1025-1028 中之詳細描述使用 1% NaOCl 溶液從番茄植株的根收集蟲卵。AQ713 可減少每一植株所觀察到之根結線蟲卵的數量。數據代表蟲卵之直接計數，而非計分系統。與未經處理之樣本(UTC)相比較的結果顯示於第 3 圖中。

實例 3

SERENADE SOIL® 產品對抗各種線蟲之效力

進行“埋藏袋(Burried bag)”之研究以測定 SERENADE SOIL® 產品對抗草莓田中各種類型之線蟲的效力。埋藏袋研究常用於評估土壤處理劑(尤其是熏蒸劑)之有效性。將含有已知濃度之線蟲的土壤樣本放置在尼龍網袋中並埋在草莓植物床中約六至八英寸之深度。依表 2 中所示施放各種處理劑。使用 INLINE 產品作為陽性對照組並與 SERENADE SOIL® 產品組合使用。

表2

治療編號	治療劑名稱	比例	施藥碼	施藥日期
1	未治療	-	-	-
2	Serenade Soil®	4夸脫/英畝	BCD	11/24/11, 01/27/11, 04/1/11
3	先使用 Inline 後再 使用 Serenade Soil®	20加侖/英畝 4夸脫/英畝	A BCD	11/3/10 11/24/10, 01/27/11, 04/1/11
4	Inline	20加侖/英畝	A	11/3/10

在處理劑 B 後，在 2010 年 12 月 8 日收集袋子並計算

線蟲(成蟲和幼蟲)。結果顯示於下。

評估之線蟲	未經治療之對照組	4夸脫之 Serenade Soil®	20加侖之 InLine	20加侖之 InLine +4奈脫之 +SerenadeSoil®
根結線蟲 (<i>Meloidogyne</i>)	578 a	69 b	18 b	20 b
小環線蟲 (<i>Criconemella</i>)	1,322 a	36 b	10 b	10 b
針線蟲 (<i>Paratylenchus</i>)	15 a	2 a	11 a	6 a

其後為相同字母的方式無顯著差異， $P=0.05$ (Student-Newman-Kewls)。

依實施例 2 中之描述，在上文所示之最後一次施藥後的數週，從小塊土地移除一些植物並分析根部之根結線蟲。第 4 圖顯示出所有處理劑均減少根結線蟲卵/根。

在隨後之實驗中，與未經處理之對照組相比較，SERENADE SOIL® 產品顯示出可有效防治馬鈴薯植株中之擬毛刺線蟲屬及針線蟲屬。與未經處理之對照組相比較，SERENADE SOIL® 產品亦顯示出對抗草莓植株中之偽強壯螺旋線蟲(螺旋 HP)、雙角螺旋線蟲(螺旋 HD)及輪線蟲屬的活性，和對抗番茄植株中之輪線蟲屬的活性以及對抗馬鈴薯中之針線蟲屬的活性。

實例 4

以枯草芽孢桿菌 QST713 處理之間的滯後期及對抗爪哇根結線蟲之效力

使用先前描述於實施例 1 中的實驗技術，以黃瓜植株

進行以下實驗。簡單地說，製備 AQ713 之全基質培養物並在第 0 天 (T0) 用來處理黃瓜種子 (10^5 CFU/克種子)。在 1 天、6 天、9 天、14 天之時間間隔 (T1、T6、T9 及 T14)，以線蟲幼蟲挑戰黃瓜植株。在接種線蟲幼蟲後 14 天 (DPI) 收穫各時間點之樣本。定量滲透入根部的爪哇根結線蟲 (RKN) 的數量 (見第 5A 圖)，以及發育之幼蟲的數量 (見第 5B 圖)。各數據點代表在 6 株黃瓜植株中之線蟲的平均數量。當黃瓜植株中之 AQ713 處理與線蟲挑戰之間的滯後期大於 6 天時，與未經處理之對照組 (UTC) 水準相比較下，AQ713 可有效防治 RKN 滲透及發育。

爲了確認當處理與線蟲挑戰之間有一些滯後期時 AQ713 可良好作用的觀察結果，依實施例 2 中之描述在第 0 天 (T0) 以 AQ713 全基質 (10^5 CFU/克沙) 浸濕 4 週齡之番茄苗並在 1、2 或 3 週 (T7、T14 或 T21) 以 1000 RKN 幼蟲/盆進行挑戰。在 42DPI 收穫各時間點之樣本並計算每一根部之總蟲卵數。每個數據點代表在 5 個番茄植株中的平均蟲卵數。本實驗中，AQ713 處理與隨後之線蟲挑戰之間的滯後期需爲約 14 天或更久才能有效地將番茄根中之 RKN 蟲卵數降至低於未經處理之對照組 (UTC) 的水準 (參見第 6 圖)。

實例 5

多次施放 SERENADE® ASO 產品與單次施放之比較

在將植株移植到直徑約 8 英寸之花盆時將 SERENADE® ASO 產品施放在番茄植株上，然後依表 3 中之詳細描述以

多次施放之形式每兩週(即，每兩週一次)進行處理一次。將 SERENADE[®] ASO 產品施放在植物基部周圍(在植物基部約 2 至 3 英寸內)的土壤。6 夸脫/英畝之劑量大約相當於 1×10^5 CFU/克土壤(即，在植物基部之約 2 至 3 英寸內的土壤)。然後，將花盆保持在溫室中十天，再於每一盆內接種 1000 隻根結線蟲 J2 幼蟲。接種線蟲後 42 天收穫植物，依實施例 1 和實施例 2 中之描述評估蟲癭之等級(見第 7A 圖)並計算總蟲卵數(見第 7B 圖)。為鮮芽稱重以鑑定處理劑對植物生長的影響(見第 7C 圖)。所有數據點代表 4 個測量值的平均值。與單次施放相比較，多次施放 SERENADE[®] ASO 產品普遍增強線蟲防治及對應植物之生長。

表3

治療劑	劑量	施藥
Serenade ASO	6夸脫/英畝	移植時
Serenade ASO	3夸脫/英畝	每隔二週施藥3次
Serenade ASO	6夸脫/英畝	每隔二週施藥3次
Serenade ASO	12夸脫/英畝	每隔二週施藥3次
Serenade ASO	18夸脫/英畝	每隔二週施藥3次
未處理之對照組	無	無

實例 6

在移植時單次施放不同劑量之 SERENADE[®] ASO 產品
依表 4 中之詳細描述在移植時將不同劑量之 SERENADE[®]
ASO 產品單次施放於番茄植株之花盆中。

表4

治療劑	劑量	施藥
Serenade ASO	4夸脫/英畝	移植時
Serenade ASO	20夸脫/英畝(5x)	移植時
Serenade ASO	40夸脫/英畝(10x)	移植時
Serenade ASO	80夸脫/英畝(20x)	移植時
Serenade ASO	160夸脫/英畝(40x)	移植時
未處理之對照組	無	無

如上所述，劑量 6 夸脫 / 英畝大約相當於 1×10^5 CFU/克土壤。然後，將花盆保持在溫室中 10 天，再於每一盆內接種 3000 個根結線蟲卵。接種線蟲後 7 週收穫植物並計算總蟲卵數(見第 8 圖)。所有數據點代表 4 個測量值的平均值。一般而言，與未處理組的植物相比較，大於 4 夸脫 / 英畝之比率將增加對線蟲卵之防治，40 夸脫 / 英畝之處理劑可造成約 70% 防治。

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示 QST713 全基質對受到根結線蟲侵染之根部形成蟲癭之處理效果。注意，在此圖形及其他圖形中，QST713 全基質係定名為 AQ713。此圖形中，該未經處理之對照組係定名為“UTC”。

第 2 圖顯示在受到根結線蟲侵染之幼苗上以不同比率之 SERENADE® ASO 產品處理的效果。具體而言，結果顯示出根部形成蟲癭和被滲透之程度，以及對線蟲發育的效

果。對應於各處理劑 (Serenade ASO 5.0%、2.5%和 1.0%，以及 UTC) 之各組三條長條棒中的第一條長條棒代表根部形成蟲癭，第二條長條棒代表線蟲滲透情形，而第三條長條棒代表線蟲發育。

第 3 圖代表與未經處理之植物 (圖形中定名為 UTC) 相比較，以不同批次之 AQ713 全基質處理時每株植物的根結線蟲卵。

第 4 圖代表與未經處理之植物 (定名為 UTC) 及以單獨之 INLINE 產品處理之植物相比較，以單獨之 SERENADE SOIL[®] 產品處理或使用 SERENADE SOIL[®] 與 INLINE 產品 (含 1,3-二氯丙烯 + 氯化苦之活性成分) 組合處理時每株植物之根結線蟲卵。表 2 中列舉各種處理組，其在圖中被定名為 T1、T2、T3 及 T4。

第 5 圖代表以 AQ713 全基質處理及在 1 天、6 天、9 天和 14 天 (T1、T6、T9 及 T14) 之時間間隔以線蟲幼蟲挑戰時每株植物根部之根結線蟲的滲透情形 (第 5A 圖) 及每株植物根部之根結線蟲的發育情形 (第 5B 圖)。第 5A 圖中，虛線代表未經處理之對照組 (“UTC”)，而實線代表以 AQ713 處理者。

第 6 圖代表在第 0 天 (T0) 以 AQ713 全基質浸濕植物且在 1、2 或 3 週 (T7、T14 或 T21) 以線蟲挑戰時每株植物根部由根結線蟲所產生之全部蟲卵。未經處理之對照組 (UTC) 為每一接種日期之各對長條棒中的第一條長條棒。每對長條棒中的第二條長條棒代表以 AQ713 處理所得到

的結果。

第 7 圖代表經單次或多次施放 SERENADE[®] ASO 產品進行處理之植物的每株根部形成蟲癭之比率(第 7A 圖)、總產卵數(第 7B 圖)及新芽重量(第 7C 圖)。

第 8 圖代表經單次施放不同劑量之 SERENADE[®] ASO 進行處理之植物的每克根部之全部蟲卵數。

發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101126810

A01N 25/00 (2006.01)

※申請日：101年07月25日

※IPC分類：C12N 1/20(2006.01)

C12R 1/125(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

生物性防治線蟲之方法

Biocontrol of nematodes

二、中文發明摘要：

本發明提供使用芽孢桿菌(Bacillus)菌株作為殺線蟲劑的方法及相關組成物。

三、英文發明摘要：

The present invention provides a method for using a *Bacillus* strain as a nematicide and related compositions.

七、申請專利範圍：

1.一種用於防治線蟲之方法，其包含對植物和/或植物生長地點施放有效量之枯草芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis*) QST713 或枯草芽孢桿菌 QST713 之突變株。

2.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中係先確認該植物和/或植物生長地點需要處理再進行施放。

3.如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該確認包含測定該植物生長地點超過線蟲侵染之經濟閾值。

4.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該地點為土壤。

5.如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株係在種植前施放。

6.如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株係在種植時施放。

7.如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株被施放在犁溝中。

8.如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株係在種植後施放。

9.如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株係以每英畝約 2×10^{12} 至約 6×10^{13} cfu 之比率施放以供土壤灌藥處理或以每 1000 行腳 (row feet) 約 6×10^{10} 至約 4×10^{12} cfu 之比率施放以供犁溝中處理。

10.如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該比率為每英畝約 1×10^{13} 至約 6×10^{13} cfu 或每 1000 行腳約 7.5×10^{11}

至約 4×10^{12} cfu。

11.如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株被施放至土壤以與植物根部或植物基部之土壤接觸。

12.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株係以每克土壤約 7×10^5 至約 1×10^7 cfu 之比率進行單次施放。

13.如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株係以每克土壤約 1×10^6 至約 5×10^6 cfu 之比率進行單次施放。

14.如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株係以每次施放每英畝約 2×10^{12} 至約 6×10^{13} cfu 之比率進行多次施放以供土壤灌藥處理。

15.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株係以每次施放每克土壤約 1×10^5 至約 3×10^6 cfu 之比率進行多次施放。

16.如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該多次施放係間隔約 10 至約 18 天進行。

17.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株係藉由滴灌、噴水器、土壤注射或土壤灌藥施放。

18.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株被施放至種子。

19.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該枯草芽孢

桿菌 QST713 或其突變株為醱酵產物。

20.如申請專利範圍第 19 項之方法，其中該醱酵產物包含枯草芽孢桿菌 QST713 細胞或枯草芽孢桿菌 QST713 之突變株細胞、代謝產物及殘餘的醱酵基質。

21.如申請專利範圍第 1 項之方法，其進一步包含施放第二殺線蟲劑。

22.如申請專利範圍第 21 項之方法，其中該第二殺線蟲劑為選自下列群組之殺線蟲劑：胺基甲酸酯、有機磷酸鹽及生物殺線蟲劑。

23.如申請專利範圍第 21 項之方法，其中該第二殺線蟲劑係與該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株組合施放。

24.如申請專利範圍第 21 項之方法，其中該第二殺線蟲劑係與該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株輪流施放。

25.如申請專利範圍第 23 項之方法，其中該第二殺線蟲劑為配製之市售產品。

26.如申請專利範圍第 23 項之方法，其中該第二殺線蟲劑係以低於該第二殺線蟲劑之產品標籤上所推薦之比率施放，該產品標籤上所推薦之比率係該第二殺線蟲劑單獨作為處理劑時所施放者。

27.如申請專利範圍第 23 項之方法，其中在種植時將該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株與該第二殺線蟲劑組合施放，且後續之施藥單獨施放該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株。

28.如申請專利範圍第 27 項之方法，其中該後續之施

藥係間隔約 10 至約 18 天進行。

29.如申請專利範圍第 28 項之方法，其中該第二殺線蟲劑為歐殺滅(oxamyl)。

30.如申請專利範圍第 21 項之方法，其中該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株被施放在與植物根部接觸或植物基部之土壤位置。

31.如申請專利範圍第 30 項之方法，其中該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株係以每克土壤約 1×10^5 至約 3×10^6 cfu 之比率施放。

32.如申請專利範圍第 1 至 31 項中任一項之方法，其中該線蟲係選自下列群組：針線蟲屬(*Paratylenchus* spp.)、擬毛刺線蟲屬(*Paratrichodorus* spp.)、小環線蟲屬(*Criconemella* spp.)、螺旋線蟲屬(*Helicotylenchus* spp.)、根結線蟲屬(*Meloidogyne* spp.)及輪線蟲屬(*Criconemoides* spp.)。

33.如申請專利範圍第 32 項之方法，其中該線蟲為根結線蟲屬。

34.一種組成物，其包含枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株及第二殺線蟲劑。

35.如申請專利範圍第 34 項之組成物，其中該第二殺線蟲劑係選自下列群組：胺基甲酸酯、有機磷酸鹽及生物殺線蟲劑。

36.一種套組，其包含枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株及彼作為殺線蟲劑之用途的指示說明。

37.如申請專利範圍第 36 項之套組，其中該指示說明指導使用者以每英畝約 2×10^{12} 至約 6×10^{13} cfu 之比率施放該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株以供土壤灌藥處理或以每 1000 行腳約 6×10^{10} 至約 4×10^{12} cfu 之比率施放該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株以供犁溝中處理。

38.如申請專利範圍第 37 項之套組，其中該比率為每英畝約 1×10^{13} 至約 6×10^{13} cfu 或每 1000 行腳約 7.5×10^{11} 至約 4×10^{12} cfu。

39.如申請專利範圍第 36 項之套組，其中該指示說明指導使用者施放該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株至土壤以與植物根部或植物基部之土壤接觸。

40.如申請專利範圍第 39 項之套組，其中該指示說明指導使用者以每克土壤約 7×10^5 至約 1×10^7 cfu 之比率單次施放該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株。

41.如申請專利範圍第 40 項之套組，其中該指示說明指導使用者以每克土壤約 1×10^5 至約 3×10^6 cfu 之比率多次施放該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株。

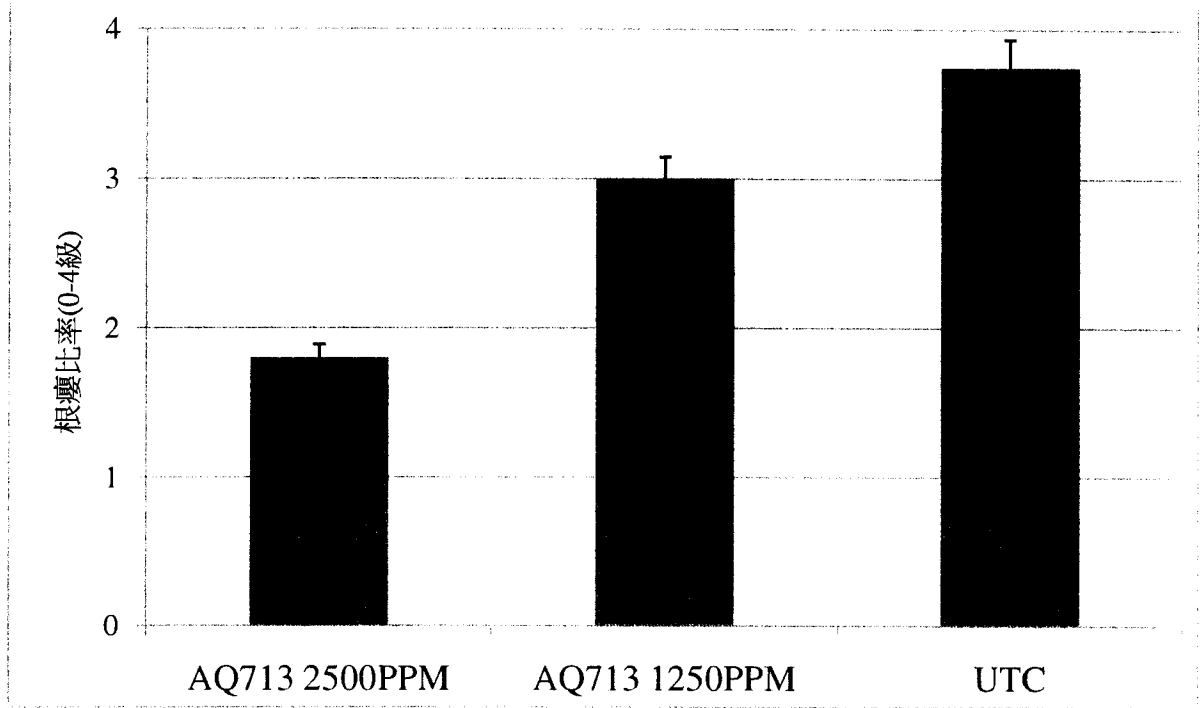
42.如申請專利範圍第 36 項之套組，其中該指示說明指導使用者將該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株與化學殺線蟲劑組合使用，並進一步指導使用者以較該化學殺線蟲劑之產品標籤上所推薦之比率為低的比率使用該化學殺線蟲劑。

43.如申請專利範圍第 36 項之套組，其中該指示說明進一步指導使用者在種植時組合使用該枯草芽孢桿菌

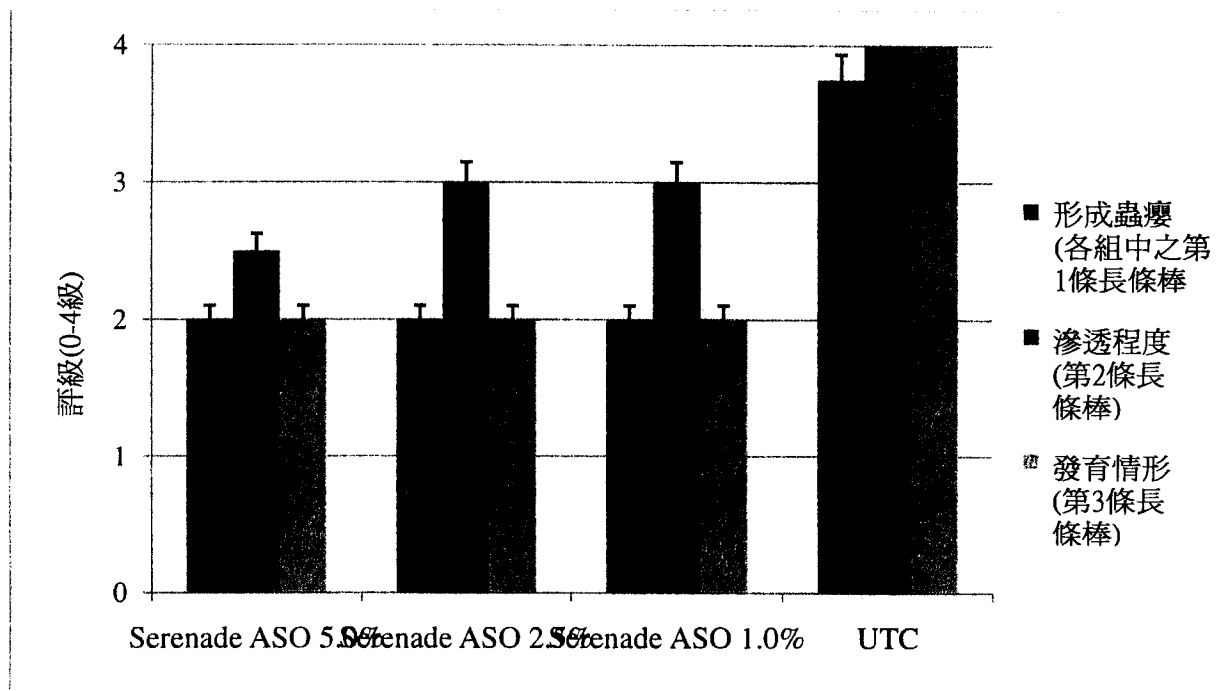
QST713 或其突變株與化學殺線蟲劑，且後續之施藥單獨使用該枯草芽孢桿菌 QST713 或其突變株。

44.如申請專利範圍第43項之套組，其中該後續之施藥係間隔約10至約18天進行。

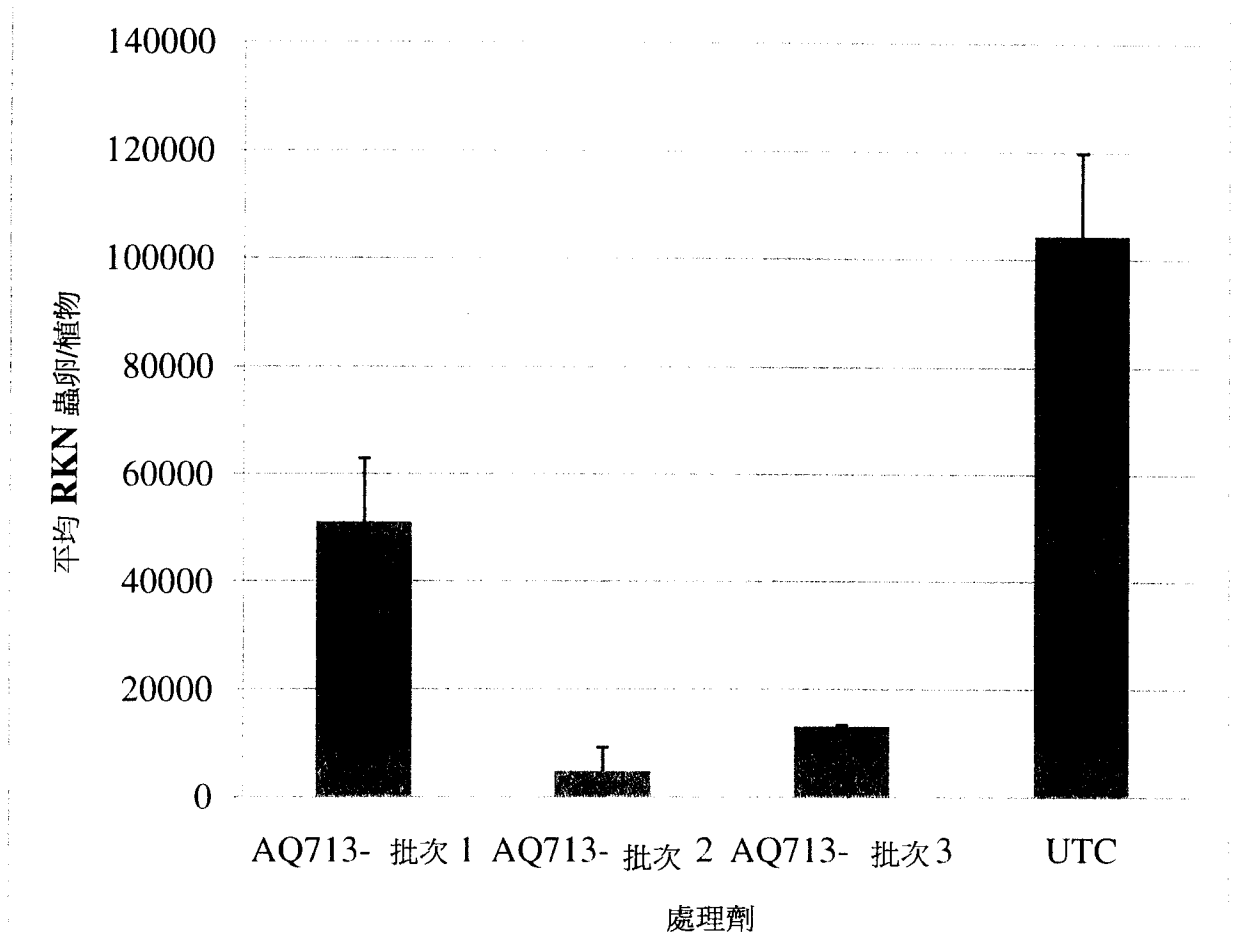
第1圖



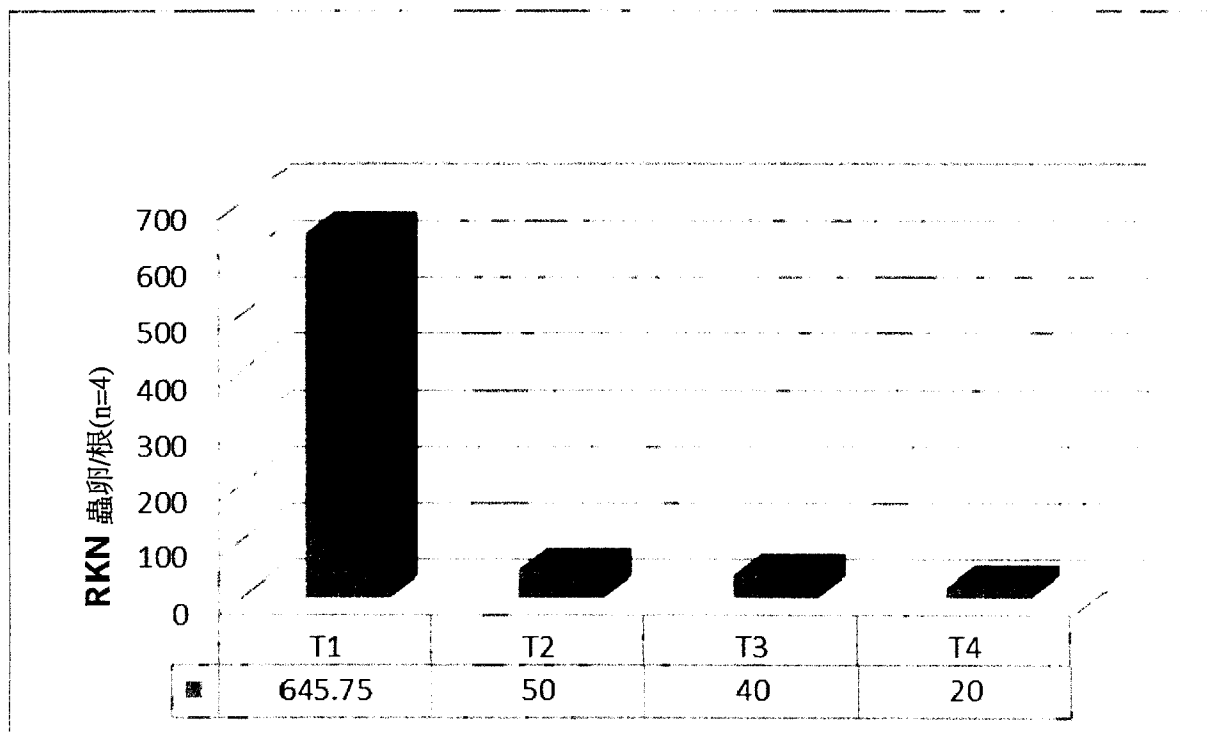
第2圖



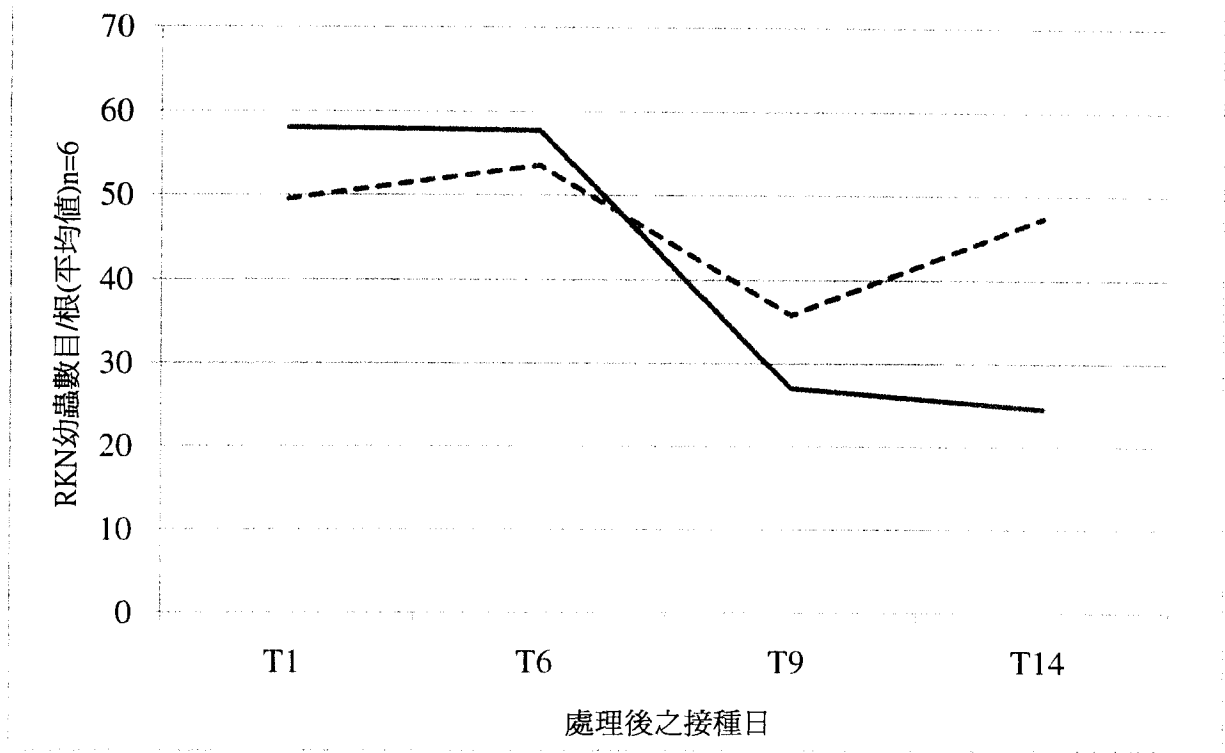
第3圖



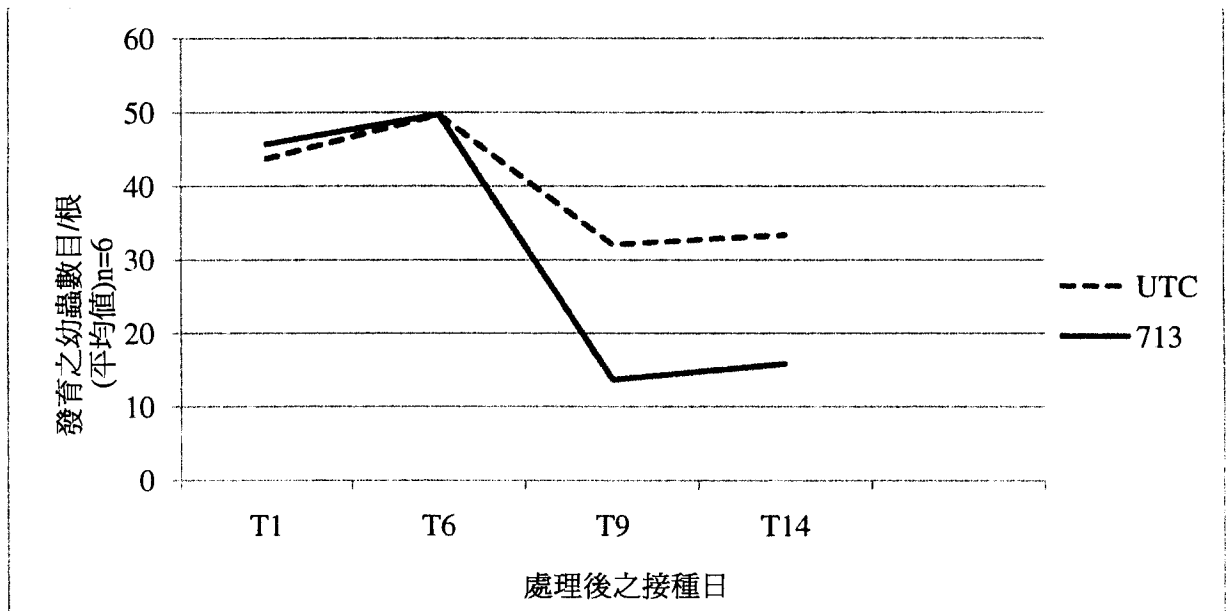
第4圖



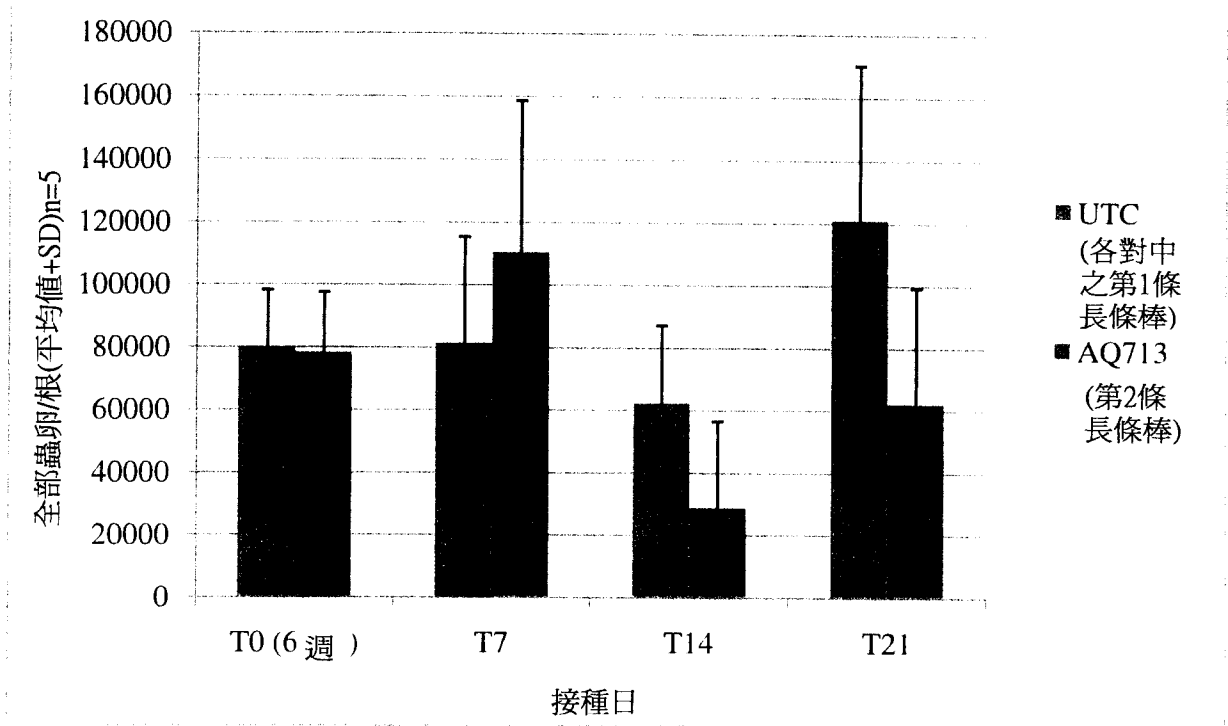
第5A圖



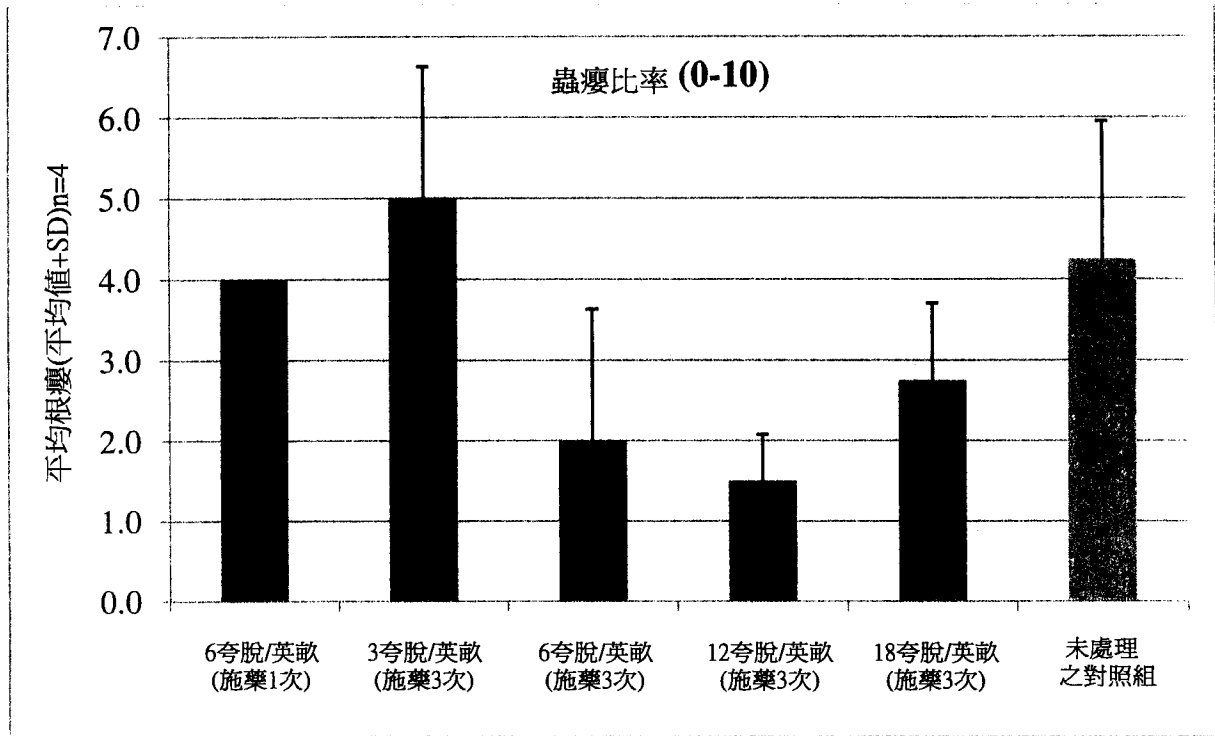
第5B圖



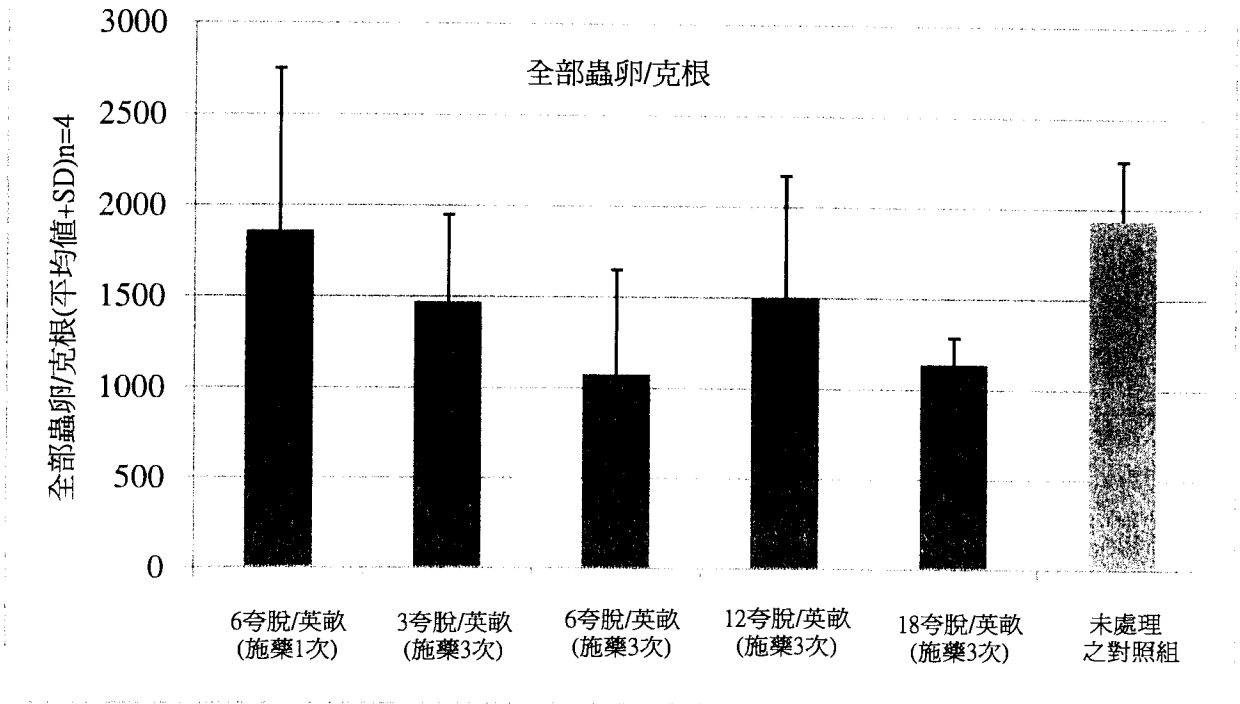
第6圖



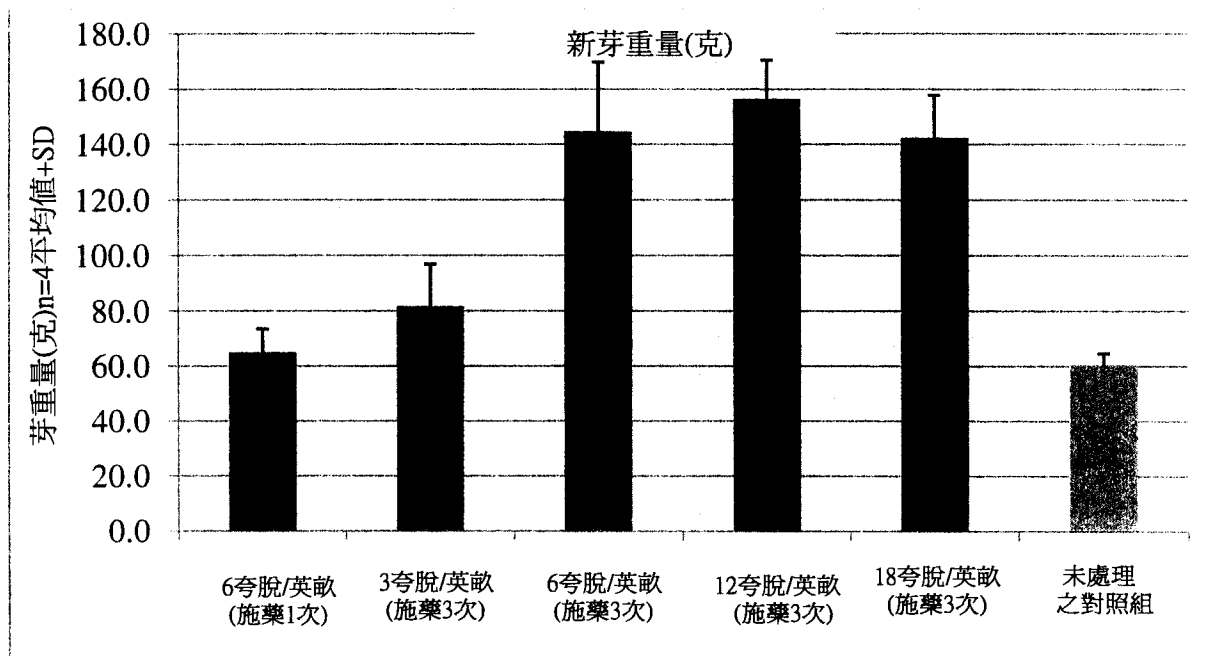
第7A圖



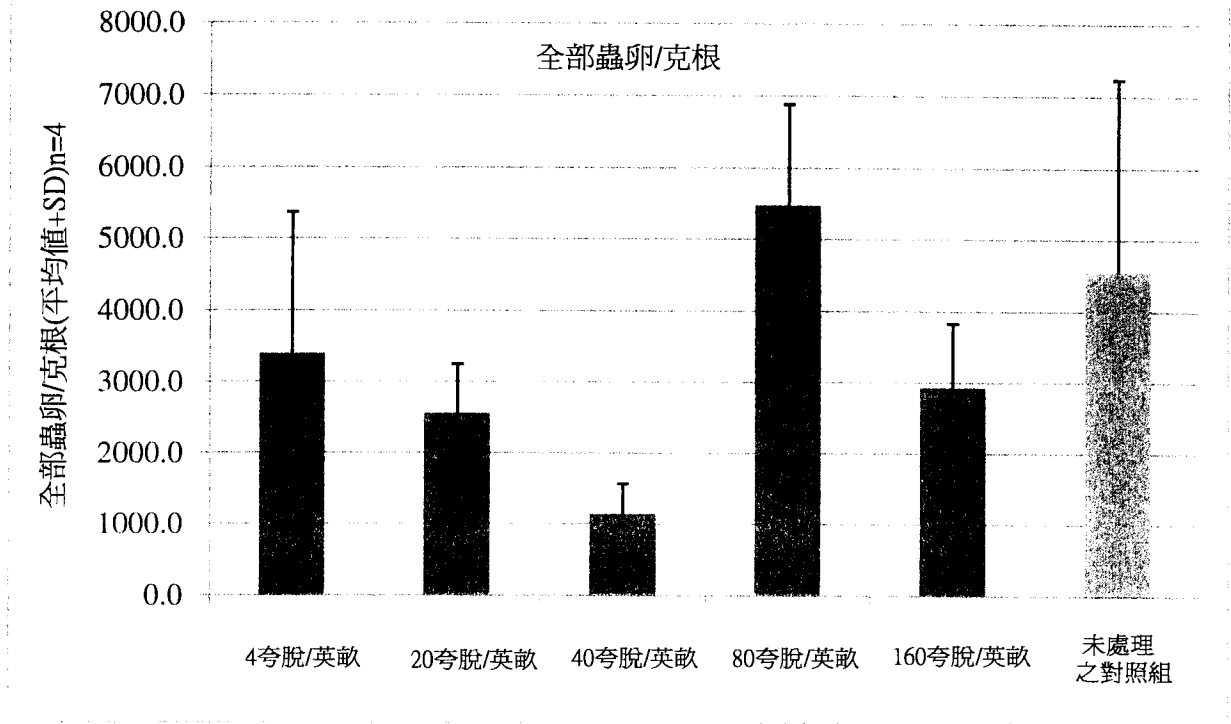
第7B圖



第7C圖



第8圖



四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：無

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無