



(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 201428097 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：102128992

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 08 月 13 日

(51)Int. Cl.：

C12N1/20 (2006.01)

A01N63/02 (2006.01)

C12R1/07 (2006.01)

(30)優先權：2013/03/15 美國

13/835,677

2012/08/14 美國

61/683,174

(71)申請人：魅潤生物創新公司 (美國) MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. (US)

美國

(72)發明人：艾索卡 拉特納卡 ASOLKAR, RATNAKAR (IN)；哥多華 克蘿絲 安娜 露西亞 CORDOVA-KREYLOS, ANA LUCIA (MX)；麥科特 克里斯托弗 MCCORT, CHRISTOPHER (US)；威爾克 黛博拉 WILK, DEBORA (US)；托德 卡莉 TODD, CARLY (US)；蘇海 SU, HAI (CA)；魅潤 帕梅拉 MARRONE, PAMELA (US)

(74)代理人：林邦棟

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：20 共 98 頁

(54)名稱

具有抗真菌及抗細菌功效與促生活性之芽孢桿菌品種

BACILLUS SP. STRAIN WITH ANTIFUNGAL, ANTIBACTERIAL AND GROWTH PROMOTION ACTIVITY

(57)摘要

本發明係提供一種名為芽孢桿菌分離株 F727 之芽孢桿菌品種，其可產生具有滅殺有害物活性之代謝物。本發明亦提供取自芽孢桿菌分離株 F727 之生物活性組成物及代謝物，可用於控制有害物。本發明並提供使用該品種及其代謝物以控制有害物之方法。

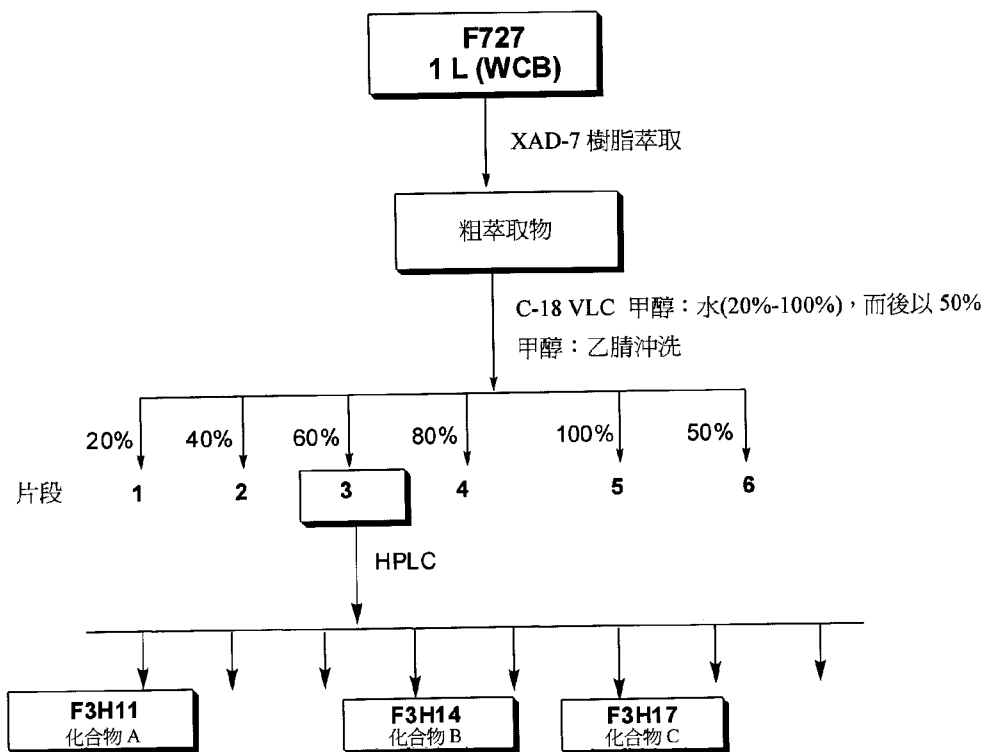


圖 1



(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 201428097 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：102128992

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 08 月 13 日

(51)Int. Cl.：

C12N1/20 (2006.01)

A01N63/02 (2006.01)

C12R1/07 (2006.01)

(30)優先權：2013/03/15 美國

13/835,677

2012/08/14 美國

61/683,174

(71)申請人：魅潤生物創新公司 (美國) MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. (US)

美國

(72)發明人：艾索卡 拉特納卡 ASOLKAR, RATNAKAR (IN)；哥多華 克蘿絲 安娜 露西亞 CORDOVA-KREYLOS, ANA LUCIA (MX)；麥科特 克里斯托弗 MCCORT, CHRISTOPHER (US)；威爾克 黛博拉 WILK, DEBORA (US)；托德 卡莉 TODD, CARLY (US)；蘇海 SU, HAI (CA)；魅潤 帕梅拉 MARRONE, PAMELA (US)

(74)代理人：林邦棟

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：20 共 98 頁

(54)名稱

具有抗真菌及抗細菌功效與促生活性之芽孢桿菌品種

BACILLUS SP. STRAIN WITH ANTIFUNGAL, ANTIBACTERIAL AND GROWTH PROMOTION ACTIVITY

(57)摘要

本發明係提供一種名為芽孢桿菌分離株 F727 之芽孢桿菌品種，其可產生具有滅殺有害物活性之代謝物。本發明亦提供取自芽孢桿菌分離株 F727 之生物活性組成物及代謝物，可用於控制有害物。本發明並提供使用該品種及其代謝物以控制有害物之方法。

發明摘要

※ 申請案號：102128992

※ 申請日：102- 8 13

※IPC 分類：C12N 1/20 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

具有抗真菌及抗細菌功效與促生活性之芽孢桿菌品種/*Bacillus* sp. Strain
with Antifungal, Antibacterial and Growth Promotion Activity

【中文】

本發明係提供一種名為芽孢桿菌分離株F727之芽孢桿菌品種，其可產生具有滅殺有害物活性之代謝物。本發明亦提供取自芽孢桿菌分離株F727之生物活性組成物及代謝物，可用於控制有害物。本發明並提供使用該品種及其代謝物以控制有害物之方法。

【英文】

Disclosed herein is a *Bacillus* strain, *Bacillus* sp. isolate F727, that produces metabolites with pesticidal activities. Also provided are bioactive compositions and metabolites derived from cultures of *Bacillus* sp. isolate F727 capable of controlling pests; as well as methods of use of the strain and its metabolites for controlling pests.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

具有抗真菌及抗細菌功效與促生活性之芽孢桿菌品種/*Bacillus* sp. Strain with Antifungal, Antibacterial and Growth Promotion Activity

【技術領域】

【0001】 本發明係關於生物性農藥與有害物控制；更詳而言之，係關於微生物農藥及用以製造此種微生物農藥之微生物品種。

【先前技術】

【0002】 由微生物、植物或其他有機體所產生之物質稱為天然產物。不同微生物天然產物之間存在有極大之化學多樣性，且天然產物已有悠久之藥用歷史。天然產物主要用於人類治療，五成以上之人類用藥取自天然產物，但僅有11%農藥係取自天然來源。然而，天然產物農藥於傳統及有機耕作農場均可做為防治有害物之重要工具。微生物（細菌、放射菌及真菌）之次級代謝物所產出之新穎化學化合物可用單獨使用或搭配已知化合物使用，而有效控制昆蟲類害蟲並以減少抗藥性增高風險。多種為人熟知之微生物天然產物均為效果優良之農藥（Thompson等人，2000年；Arena等人，1995年；Krieg等人，1983年）。

【0003】 微生物農藥之發展始自純種培養物微生物之分離。而後將分離株利用體內試驗、體外試驗或溫室及田間小量試製實驗進行分離株之效率與光譜篩選。同時，對該微生物產出之活性化合物進行分離及辨識。為求微生物農藥之商業化，該微生物須經工業規模發酵之經濟方式生成，並與生物相容之核准添加物配製成劑，以提升效率並提升使用易度。

【0004】 隨著有害物對化學農藥之抗藥性日漸增加，可用農藥種類也越來越少。此外，非天然來源農藥亦可能對環境產生危害。據此，吾人實需一種植物病原體對其尚無抗性且對環境影響程度最低之新穎天然來源農藥。

【發明內容】

【0005】 本發明提供一種具有滅殺有害物活性之微生物品種，芽孢桿菌分離株F727。此品種產生之生物活性代謝物可有效控制有害物並促進植物生長。本發明亦提供使用芽孢桿菌分離株727及其代謝物以控制有害物並促進植物生長之方法。在一特定實施例中，該芽孢桿菌可具有NRRL B-50768之至少一項鑑別特性。

【0006】 此外，該芽孢桿菌之16S rRNA基因序列與SEQ ID NO: 3中所列保留序列具有至少99% 同一性，且更具體為99.5% 同一性，並包含與SEQ ID NO:1所列序列具有至少99% 同一性且特別是99.5% 同一性之正向序列，以及與SEQ ID NO:2所列序列具有至少99% 同一性且特別是99.5% 同一性之反向序列。

【0007】 本發明進一步提供一實質純種培養物或全細胞液，其包含該品種，或取自該品種之細胞片段、萃取物、表層浮質及／或物質，或取自該品種之化合物或其萃取物。

【0008】 本發明進一步提供一種用以調控植物中有害物侵擾之方法，其係包括對該植物及／或其種子及／或用以種植該植物之基質施以一用量之該芽孢桿菌分離株F727（及／或取自該品種之培養物、細胞片段、萃取物、表層浮質及／或物質或化合物或其萃取物），該用量可有效調控該

有害物侵擾。在特定實施例中，該有害物為植物真菌，例如，盤梗黴菌(*Bremia*)、葡萄孢菌(*Botrytis*)、核盤菌(*Sclerotinia*)、白粉菌(*Sphaerotheca*)、絲核病菌(*Rhizoctonia*)、炭疽菌(*Colletotrichum*)、镰胞菌(*Fusarium*)、蠟蚧輪枝菌(*Verticillium*)、疫菌(*Phytophthora*)或雙孔孢菌(*Bipolaris*)。在其他實施例中，該有害物為細菌，例如，歐文氏菌(*Erwinia*)、假單胞菌(*Pseudomonas*)、黃單胞菌(*Xanthomonas*)、斑點病菌(*Acidovorax*)或棒狀桿菌(*Clavibacter*)。

【0009】 本發明亦提供促進植物生長及／或種子發芽之方法，其中該方法包含對植物及／或其種子及／或用以種植該植物之基質施以一用量之芽孢桿菌分離株F727（及／或一培養物、細胞片段、萃取物、表層浮質及／或物質或取自該品種之化合物或萃取物），所述用量可有效促進植物生長及／或種子發芽。

【0010】 在特定實施例中，該芽孢桿菌產生之化合物係選自由以下項目所構成之群組：

【0011】 (a) 化合物A，其

【0012】 (i) 可取自芽孢桿菌，且特別是芽孢桿菌分離株F727；

【0013】 (ii) 具有殺有害物活性；

【0014】 (iii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1020-1060，且更具體為1044；

【0015】 (iv) ^1H NMR值為 δ 7.15, 6.72, 4.81, 4.70, 4.65, 4.40, 4.35, 4.25, 4.15, 3.85, 3.65, 3.50, 3.22, 2.85, 2.80, 2.65, 2.45, 2.35, 2.30, 2.20, 1.95, 1.55, 1.31, 1.20及0.85；

【0016】 (v) 利用一以水與乙腈(CH_3CN)調製之梯度溶劑系統（0-20

分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈)，設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-12分鐘，更具體為約8分鐘，且又更具體為約8.31分鐘；

【0017】 (vi) 隨選性包含47個碳原子、72個氫原子、12個氮原子，以及15個氧原子；以及

【0018】 (vii) 隨選性為一包含穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）之胜肽；

【0019】 (b) 化合物B，其

【0020】 (i) 具有殺有害物活性；

【0021】 (ii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1030-1080，且更具體為1058；

【0022】 (iii) 利用一以水與乙腈(CH₃CN)調製之梯度溶劑系統（0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈)，設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-14分鐘，更具體為約8分鐘，且又更具體為約8.67分鐘；

【0023】 (iv) 隨選性包含48個碳原子、74個氫原子、12個氮原子，以及15個氧原子；以及

【0024】 (v) 隨選性為一包含穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）之胜肽；以及

【0025】 (c) 化合物C，其

【0026】 (i) 具有殺有害物活性；

【0027】 (ii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1050-1120，且更具體為1072；

【0028】 (iii) 利用一以水與乙腈(CH_3CN)調製之梯度溶劑系統(0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈)，設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-14分鐘，更具體為約9分鐘，且又更具體為約9.19分鐘；

【0029】 (iv) 隨選性包含49個碳原子、76個氫原子、12個氮原子，以及15個氧原子；以及

【0030】 (v) 隨選性為一包含穀胺醯胺(1單位)、脯胺酸(1單位)、絲胺酸(1單位)、酪胺酸(1單位)及天冬醯胺酸(3單位)之胜肽。

【0031】 本發明亦提供一種芽孢桿菌品種，其具有以下特性：

【0032】 (a) 至少以下一者：

【0033】 (1) 一核苷酸序列，其具有至少與SEQ ID NO:3所列16SrRNA序列99.5%之同一性；

【0034】 (2) 一核苷酸序列，其具有至少與SEQ ID NO:10所列*recA*序列95%之同一性；以及

【0035】 (3) 一核苷酸序列，其具有至少與SEQ ID NO:13所列*phoR*序列90%之同一性；

【0036】 (b) 產生一或多種化合物，其

【0037】 (i) 具有殺有害物活性；

【0038】 (ii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1020 -1120，以及

【0039】 (iii) 利用一以水與乙腈(CH₃CN)調製之梯度溶劑系統(0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈)，設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-15分鐘，以及

【0040】 (iv) 隨選性為胜肽；

【0041】 (c) 抗卡那黴素(Kanamycin)、氯黴素(Chloramphenicol)、氨比西林(ampicillin)、青黴素(penicillin)、頭孢呋肟(cefuroxime)、達比黴素(piperacillin)、四環素(tetracycline)；以及

【0042】 (d) 具有鹼性磷酸酵素、酯酵素、酸性磷酸酵素及萘酚-AS-BI-磷酸水解酶活性。

【0043】 本發明亦提供一種組合，其包含該芽孢桿菌分離株F727，一取自該品種之實質純種培養物、細胞片段、萃取物、表層浮質及物質、代謝物或化合物或其萃取物，以及至少以下一者：(a)一第二物質，其可為化學性或生物性農藥，以及 (b) 載體、稀釋液、界面活性劑、輔藥中之至少一者。該組合可為一組成物且可塗佈於種子上。

【0044】 本發明進一步提供一種用以調控植物中有害物侵擾之方法，包括對該植物及／或其種子及／或用以種植該植物之基質施以一用量之該組合，使其有效調控該有害物侵擾。在一特定實施例中，該有害物為

植物真菌，如，盤梗黴菌(*Bremia*)、葡萄孢菌(*Botrytis*)、核盤菌(*Sclerotinia*)、白粉菌(*Sphaerotheca*)、絲核病菌(*Rhizoctonia*)、炭疽菌(*Colletotrichum*)、鐮胞菌(*Fusarium*)、蠟蚧輪枝菌(*Verticillium*)、疫菌(*Phytophthora*)或雙孔孢菌(*Bipolaris*)。在其他實施例中，該有害物為細菌，如歐文氏菌(*Erwinia*)、假單胞菌(*Pseudomonas*)、黃單胞菌(*Xanthomonas*)、斑點病菌(*Acidovorax*)或棒狀桿菌(*Clavibacter*)

【0045】 本發明進一步提供一組成物配製為殺有害物組成物之用途，可隨選結合一或多種第二物質，其中該組成物係選自由以下項目所構成之群組：以下一或多者：

【0046】 (a)一實質純種芽孢桿菌分離株F727培養物，

【0047】 (b) 芽孢桿菌分離株F727培養物之細胞片段，

【0048】 (c) 取自芽孢桿菌分離株F727培養物之表層浮質，

【0049】 (d) 取自芽孢桿菌分離株F727培養物之濾液，

【0050】 (e) (a)、(b)、(c)或(d)之萃取物，

【0051】 (f) 產自芽孢桿菌分離株F727培養物之代謝物，

【0052】 (g) 化合物A，

【0053】 (h) 化合物B，以及

【0054】 (i) 化合物C；以及

【0055】 該第二物質係選自由以下項目所構成之群組：

【0056】 (a) 一農藥，

【0057】 (b) 一植物生長促進劑，

【0058】 (c) 一載體，

【0059】 (d) 一輔藥，

【0060】 (e) 一界面活性劑，

【0061】 (f) 一肥料，以及

【0062】 (g) 一抗植物致病劑。

【圖式簡單說明】

【0063】

圖1 概要說明自培養液取得本發明化合物之純化辦法。

圖2 為化合物A之ESI-LCMS色彩層析譜。

圖3 為化合物A之(+) ESIMS。

圖4 為化合物B之ESI-LCMS色彩層析譜。

圖5 為化合物B之 (+) ESIMS。

圖6 為化合物C之ESI-LCMS色彩層析譜。

圖7 為化合物C之(+) ESIMS。

圖8 描繪VLC片段3（圖中之F727F3）及HPLC-純化化合物 A（圖中之F727F3H11）、化合物 B（圖中之F727F3H14）及化合物 C（圖中之F727F3H17）對抗以下四種真菌病原體之生物活性：*Botrytis cinerea*（圖中之Botrytis）、*Sclerotinia homeocarpa*（圖中之Sclerotina）、*Rhizoctonia solani*（圖中之Rhizoctonia）以及 *Bipolaris maydis*（圖中之Bipolaris）。

圖9 顯示F727表層浮質對番茄中番茄灰黴病菌(*Botrytis cinerea*)之作用。植物接種圖中所示濃度之*B. cinerea* 孢子，而後以芽孢桿菌 F727發酵物之表層浮質（左起第二條）或Switch[®]（左起第三條）治療處理。對照組包括未接種植物（最左者）以及用兩種不同濃度真菌接種但未以農藥處理之植物

(左起第四及第五條)。

圖10 顯示F727表層浮質對萵苣露菌病之作用。植物接受芽孢桿菌分離株F727表層浮質 (F727)處理、Ridomil處理，或未處理(UTC)。

圖11 比較F727表層浮質與環醯菌胺(Fenhexamid)對番茄上 *Botrytis*之作用。對感染*B. cinerea*之植物噴灑F727表層浮質一次 (F727表層浮質) 或兩次 (F727表層浮質 x 2)，或水或環醯菌胺 (Elevate[®])，而後檢驗疾病嚴重度。

圖12 比較F727表層浮質與環醯菌胺對椒上 *Botrytis*之作用。對植物噴灑芽孢桿菌分離株F727發酵物之表層浮質 (F727)、水(UTC)或環醯菌胺 (Elevate[®])。使接受噴灑後之植物感染*B. cinerea*，生長，於13天後檢驗疾病嚴重度。

圖13 顯示感染白粉病之黃瓜及以不同F727 製備物處理之疾病控制效果。於三種不同培養基中培養F727細胞：SPY、SMP及TSB，如圖所示。從上述各生長條件取得全細胞液、細胞（懸浮於10 mM之MgSO₄）以及表層浮質。水（圖中之「去離子水」）為陰性對照組。亦包含SMP培養基、SPY 培養基、TSB 培養基及10 mM MgSO₄ 之空白對照組。

圖14 顯示受番茄灰黴病菌感染之番茄植物及以不同F727 製備物處理之疾病控制效果。於三種不同培養基中培養F727細胞：SPY、SMP及TSB，如圖所示。從上述各生長條件取得全細胞液、細胞（懸浮於10 mM之MgSO₄）以及表層浮質。水（圖中之「去離子水」）為陰性對照組。亦包含SMP培養基、SPY 培養基、TSB 培養基及10 mM MgSO₄ 之空白對照組。

圖15 顯示受白粉病感染之黃瓜植物疾病控制情形。以真菌孢子接種前先對

植物噴灑水（圖中之「去離子水」，陰性對照組）、分離株F727發酵物之全細胞液(MBI-110 WCB)或一種市售農藥(Double Nickel[®] (Certis, *Bacillus amyloliquefaciens* strain D747)、Sonata[®] (*Bacillus subtilis*)、Vacciplant[®]、Companion[®]、Serenade[®] (*Bacillus pumilus*) 或 Regalia[®] (*Reynoutria sachalinensis*)，或Regalia[®] (*Reynoutria sachalinensis*)與F727 WCB之組合。

圖16 顯示受蕃茄晚疫病菌感染之番茄植物疾病控制情形。接種蕃茄晚疫病菌之前，先對植物噴灑水（圖中之「去離子水」，陰性對照組）、Regalia[®]、Double Nickel[®] (Certis, *Bacillus amyloliquefaciens* strain D747)或分離株F727發酵物之全細胞液(MBI-110 WCB)。

圖17 顯示一體外檢驗中F727發酵物表層浮對白絹病菌菌絲生長之控制效果。亦顯示水（去離子水）、未過濾F727表層浮質（未過濾F727）、過濾後F727表層浮質（過濾後 F727）及Pristine[®]之作用。對每種測試材料及對照組均測試兩種用量：在每一對資料條中，最左側為 25 μ l之使用結果，最右側為50 μ l之使用結果。

圖18 顯示F727 WCB 土壤澆淋對感染露菌病萵苣之效果。UTC：未處理對照組之萵苣植物接受約 5×10^4 露菌孢子感染；F727 澆淋：萵苣植物接受約 5×10^4 露菌孢子感染一小時前先經F727 WCB土壤澆淋處理。疾病嚴重度以患病組織覆蓋葉片／子葉之百分比表示。

圖19 顯示化合物 A 之ESIMS/MS結果。

圖20 為化合物 A之概要結構圖。

【實施方式】

【0064】 雖然至此所述之組成物與方法可為各種修改及替代形式，在

此將就範例實施例詳加說明。然應知本發明並不限於在此揭露之特定形式，反之，本發明意欲包含所有落於本發明精神與範疇中之修改、均等方案及替代方案，而本發明精神與範疇係如所附申請專利範圍所定義者。

【0065】 除非上下文另有說明，否則於應知提供數值之處，均包含介於該範圍上下限之間小至下限單位十分之一之每一中介值，以及其他任何於該範圍內之聲明值或中介值。較小範圍亦包括在內。除非另有排除，否則此等較小範圍之上下限亦應包括於其中。

【0066】 除非另有定義，所有在此使用之技術及科學術語之定義均與本發明所屬技術領域中具有一般知識者所知者相同。雖然在此就較佳方法及材料進行描述，但任何與本說明書所稱者類似或相等之方法及材料亦可用於本發明之實施或測試。

【0067】 除非上下文另有明言，否則本說明書及申請專利範圍中所用單數之「一」及「該」包括複數之含義。

【0068】 如在此定義，「取自」意指直接分離自或取自一特定來源或與分離自或取自特定來源之物質或有機體具有相同特性者。若該「來源」為有機體，「取自」意指其係分離自或取自該有機體本身或分離自或取自用以培養或種植該有機體之媒介。

【0069】 如在此定義，「全細胞培養物」或「全細胞培養液」意指包含細胞與培養基兩者之液態培養物。若將細菌種植於培養皿中，可於水或其他液體中收穫液態全培養物，以提供全細胞培養物。

【0070】 如在此定義，「表層浮質」意指細胞成長於成長於培養液或從洋菜皿中收穫於另一液體中之細胞且經 離心、過濾、沉澱，或其他本技

藝中已知方式處理後剩餘之液體。

【0071】 如在此定義，「濾液」意指已通過薄膜之液態全培養物。

【0072】 如在此定義，「萃取物」意指以溶劑（水、清潔劑、緩衝液）自細胞去除且以離心、過濾或其他方法自細胞分離之液態物質。

【0073】 如在此定義，「代謝物」意指微生物或取自微生物之表層浮質、濾液或萃取物發酵所生之化合物、物質或副產物，其中所述微生物為具殺有害物性且特別是殺細菌或殺真菌活性者。如在此定義，「分離化合物」實質上不含其他化合物或物質，如至少約20%純度，較佳者為至少約40%純度，更佳者為約60%純度，又更佳者為約80%純度，最佳者為約90%純度，且又最佳者為約95%純度，如以分析方測定者，所述分析法包括但不限於色析法、電泳法。在本文中，「代謝物」與「化合物」兩詞可交替使用。

【0074】 如在此定義，「載體」為可與活性成份混合或配製成劑以便活性成分對於植物或其他待處理物之施用，或便於其存放、輸送及／或搬運之惰性有機或無機材料。

【0075】 如在此定義，「調控」，意指改變有害物侵擾量或有害物侵擾率。

【0076】 如在此定義，「有害物侵擾」係指有害物以造成有害效應之數量存在，所述有害效應包括疾病或於宿主群之中感染或於生長系統中出現雜草。

【0077】 如在此定義，「農藥」為一取自生物產物或化學物質之物質，其可增加固定性或抑制植物有害物生長率，且包括但不限於殺線蟲劑、除殺昆蟲劑、植物殺真菌劑、植物殺細菌劑及植物殺病毒劑。

【0078】 芽孢桿菌 F727之鑑別與特性描述

【0079】 經由結合16S rRNA序列測定、脂肪酸分析、MALDI-TOF蛋白質分析與數種生物化學檢驗之特性描述（見下文實例1-4）之多重方法確定芽孢桿菌分離株F727為芽孢桿菌之新穎品種。

【0080】 對芽孢桿菌 F727發酵產生之代謝物進行分離與特性描述。見下文實例5、25及26。其中部份代謝物經體內與體外試驗證明具有對抗真菌病原體 及細菌病原體之活性。見下文實例6-17、20、22、23及27-29。亦觀察芽孢桿菌 F727及其代謝物在數種植物上之生長促進功效。見下文實例18及19，以及21、24。

【0081】 因此芽孢桿菌 F727及／或其代謝物可做為農業上控制真菌或細菌引起之疾病之天然產物；並可用於促進植物生長。

【0082】 製造方法

【0083】 如上所述，化合物或代謝物係取自或可取自具有一或多種芽孢桿菌 F727品種鑑別特性之有機體。此方法包含種植此等有機體並將本發明之化合物及／或組成物自此等有機體之培養物中分離。

【0084】 具體而言，係利用此技藝中習之方法於營養培養基中培養該有機體。有機體之培養可採用搖瓶培養、於實驗室或工業發酵器中以適當培養基在允許細胞生長之條件下所進行之小規模或大規模發酵（包括但不限於連續、批次、饋料批次或固態發酵）。種植可利用本技藝中已知程序於適當之營養培養基上進行，包含碳與源與氮源及無機鹽。適用之培養基可由商業管道購得或根據公開之組成自行製備。

【0085】 培養後，芽孢桿菌（如，芽孢桿菌F727）之表層浮質、濾

液及／或萃取物即可用於配製滅殺有害物組成物。

【0086】 或者，培養後，可從培養液中萃取、增進成分或純化出該化合物及／或代謝物。

【0087】 該萃取物可經層析法區分為片段。接著可利用此技藝中已知方法檢驗層析片段對真菌（如*Botrytis*、*Sclerotinia*、*Rhizoctonia*及*Bipolaris*）之毒性。可利用相同或不同層析法重複劃分。

【0088】 在一實施例中，產自F727菌種之組成物包含一或多種化合物，其 (i)具有殺有害物活性；(ii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為1020 -1120；(iii) 利用一以水與乙腈(CH₃CN)調製之梯度溶劑系統（0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈），設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC) 滯留時間為約6-15分鐘；以及 (iv) 可取自一種芽孢桿菌品種。該化合物在一實施例中為胜肽。

【0089】 在一特定實施例中，該化合物 A (i) 可取自一芽孢桿菌品種；(ii) 對有害物具有毒性；(iii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1020-1060，且更具體為1044；(iv) ¹H NMR值為 δ 7.15, 6.72, 4.81, 4.70, 4.65, 4.40, 4.35, 4.25, 4.15, 3.85, 3.65, 3.50, 3.22, 2.85, 2.80, 2.65, 2.45, 2.35, 2.30, 2.20, 1.95, 1.55, 1.31, 1.20及0.85；以及 (v) 利用一以水與乙腈(CH₃CN)調製之梯度溶劑系統（0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈），設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5μ

C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-12分鐘，更具體為約8分鐘，且又更具體為約8.31分鐘。此外， ^1H NMR、 ^{13}C NMR與MS分析中，化合物A之訊號包含47個碳、72個氫、12個氮及15個氧。 ^1H NMR譜特性屬於典型胜肽。化合物 A之 ^1H NMR、 ^{13}C NMR與MS/MS詳細分析以及胺基酸分析顯示其中存在有穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）。

【0090】 在另一特定實施例中，F727產生之化合物為化合物 B，其 (i) 具有殺有害物活性；(ii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1030-1080，且更具體為1058；以及 (iii) 利用一以水與乙腈(CH_3CN)調製之梯度溶劑系統(0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈)，設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-14分鐘，更具體為約8分鐘，且又更具體為約8.67分鐘。 ^1H 及 ^{13}C NMR資料，連同MS資料，顯示其包含 48個碳、74個氫、12個氮及15個氧。 ^1H NMR譜 特性屬於典型胜肽。化合物 B之 ^1H NMR、 ^{13}C NMR與MS/MS詳細分析以及胺基酸分析顯示其中存在有穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）。

【0091】 在又一特定實施例中，F727產生之化合物為化合物 C，其 (i) 具有殺有害物活性；(ii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1050-1120，且更具體為1072；以及 (iii) 利用一以水與乙腈(CH_3CN)調製之梯度溶劑系統(0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈)，設定為0.5 mL/min 流速及210

nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC) 滯留時間為約6-14分鐘，更具體為約9分鐘，且又更具體為約9.19分鐘。¹H 及 ¹³C NMR資料，連同MS資料，顯示其包含 49個碳、76個氫、12個氮及 15個氧。¹H NMR譜特性屬於典型胜肽。化合物 C之 ¹H NMR、¹³C NMR與 MS/MS詳細分析以及胺基酸分析顯示其中存在有穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）。

【0092】 組成物

【0093】 組成物可包含芽孢桿菌菌株之全細胞培養物、全培養液、液態培養物或懸浮液，特別是取自具有至少一或多種芽孢桿菌分離株F727鑑別特性之芽孢桿菌菌株，以及取自該芽孢桿菌之表層浮質、濾液或萃取物。該組成物亦可包含取自芽孢桿菌分離株F727之一或多種代謝物或分離化合物，其特別具有殺細菌性、殺真菌性及／或植物促生活性。

【0094】 上述組成物可以任何方法配製成劑。非限制性劑型範例包括，但不限於，乳化濃縮劑(EC)、可濕性粉末(WP)、可溶性液體 (SL)、浮質、超低量濃縮溶液(ULV)、可溶性粉末(SP)、微膠囊體、水分散細粒、流體(FL)、微乳膠(ME)、奈米乳膠(NE)等等。於在此所述之任何劑型中，活性成份之比例為約0.01%至99.99%。

【0095】 該組成物可為液體、膠體或固體型態。固態組成物之製備法為將固態載體懸浮於活性成份溶液中，再以溫和條件乾燥該懸浮液，如室溫蒸發或於65°C或以下之真空蒸發。

【0096】 組成物可包含以凝膠包覆之活性成份。此種凝膠包覆材料之製備法為將成膠劑（如明膠、纖維素，或木質素）混合巨大芽孢桿菌之活

體培養物或死菌懸浮液，或巨大芽孢桿菌培養物或懸浮液之無細胞濾液或細胞部分，或噴灑或凍乾培養物、細胞，或細胞部分或在本發明方法所用殺有害物化合物之溶液中；以及使該劑形成膠狀。

【0097】 該組成物可另包含表面活性劑，其目的為乳化、分散、潤濕、延展、整合、分解控制、活性成份穩定化，及改善流動性或防鏽。於一特定實施例中，該表面活性劑為一非植物毒性非離子表面活性劑，其較佳者為屬於EPA List 4B者。於另一特定實施例中，該非離子表面活性劑為聚山梨醇酐酯月桂酸酯(20)。該表面活性劑之濃度可為總製劑之約0.1-35%；較佳者為約5-25%。分散乳化劑之選擇，如非離子、陰離子、兩性及陽離子分散乳化劑，其用量取決於組成物之性質及所需促進本發明組成物分散之能力。

【0098】 上述組成物可與另一微生物及／或農藥（如殺線蟲劑、殺細菌劑、殺真菌劑、殺疥蟲劑、殺昆蟲劑）結合。該微生物可包括，但不限於，取自*Bacillus* sp.（如、*Bacillus firmus*、*Bacillus thuringiensis*、*Bacillus pumilus*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus subtilis*）、*Paecilomyces* sp. (*P. lilacinus*)、*Pasteuria* sp. (*P. penetrans*)、*Pseudomonas* sp.、*Brevibacillus* sp.、*Lecanicillium* sp.、*Ampelomyces* sp.、*Pseudozyma* sp.、*Streptomyces* sp (*S. bikiniensis*、*S. costaricanus*、*S. avermitilis*)、*Burkholderia* sp.、*Trichoderma* sp.、*Gliocladium* sp.、*avermectin*、*Myrothecium* sp.、*Paecilomyces* spp.、*Sphingobacterium* sp.、*Arthrobotrys* sp.、*Chlorosplrnium*、*Neobulgaria*、*Daldinia*、*Aspergillus*、*Chaetomium*、*Lysobacter* spp、*Lachnum papyraceum*、*Verticillium suchlasporium*、*Arthrobotrys oligospora*、*Verticillium*

chlamydosporium、*Hirsutella rhossiliensis*、*Pochonia chlamydosporia*、*Pleurotus ostreatus*、*Omphalotus olearius*、*Lampteromyces japonicas*、*Brevudimonas sp.*、*Muscodor sp.*。

【0099】 該藥劑可為具殺線蟲、殺真菌、殺細菌及／或殺昆蟲活性之天然油或油產物（如石臘油、茶樹油、檸檬草油、丁香油、肉桂油、柑橘油，包括但不限於苦橙、柳橙、檸檬；迷迭香油、除蟲菊、多香果、佛手柑、藍膠尤加利、甘菊、香茅、普通茉莉、普通杜松、普通薰衣草、普通沒藥、中國薄荷、小蒼蘭、銀灰菊、牛膝草、聖羅勒、香樹、茉莉、薰衣草、金盞花、薄荷、胡椒薄荷、金盞菊、綠薄荷、伊蘭伊蘭樹、皂素）。

【00100】 此外，該農藥可為一單點抗真菌劑，其可包括但不限於：苯并咪唑、去甲基抑制劑(DMI)（如咪唑、嘧啶、三唑）、嗎啉、羥基嘧啶、苯胺基嘧啶、磷硫醇鹽、醌外部抑制劑、喹啉、二甲醯亞胺、羧胺、苯基醯胺、苯胺基嘧啶、苯基吡咯、芳香烴、桂皮酸、羥基苯胺、抗生素、多氧菌素、醯基胺、鄰苯二甲醯亞胺、苯環（二甲苯基丙胺酸）、選自咪唑、嘧啶、三唑之去甲基抑制劑（如bitertanol、myclobutanil、penconazole、propiconazole、triadimefon、bromuconazole、cyproconazole、diniconazole、fenbuconazole、hexaconazole、tebuconazole、tetraconazole）、邁克尼，及醌外部抑制劑（如嗜球果傘素）。該嗜球果傘素可包括但不限於亞托敏(azoxystrobin)、克收欣(kresoxim-methyl)或三氟敏(trifloxystrobin)。在又一特定實施例中，該抗真菌劑為一醌，如快諾芬(5, 7-二氯-4-喹啉基 4-氟苯基醚)。該抗真菌劑亦可取自虎杖萃取物。

【00101】 該殺真菌劑亦可為多點非無機化學殺真菌劑，選自以下項目

構成之群組：氰脒、啞啞啞、磷醯胺、磷酸酯、亞磷酸酯、二硫代胺基甲酸酯、氰烷基硫代、苯基吡啶-胺、氰基-乙醯胺。

【00102】 如上所述，該組成物可其進一步包含一殺線蟲劑。此殺線蟲劑可包括但不限於化學物，如有機磷酸酯、胺基甲酸鹽，及燻蒸劑，以及微生物產品，如阿佛菌素、漆斑菌、芽孢桿菌、巴斯德菌、擬青黴菌，以及有機產物 如皂素及植物油。

【00103】 該組成物可利用此技藝已知方法施用。具體而言，此等組成物可施用於植物周圍或植物部分。本文中所稱植物包含所有植物及植物族群，如為人所需要及不需要之野生植物或作物植物（包括天然產生之作物植物）。作物植物可為經習知植物育種與優化方法或生物科技及基因工程方法或上述方法之組合所取得之植物，包括基因轉殖植物，且包括受到或不受植物育種權保護之植物培育品種。植物部分包含植物位於地上及地下之所有部分及器官，如芽、葉、花及根，其範例包括葉、針、梗、莖、花、果體、水果、種子、根部、塊莖及地下莖。該植物部分亦包括，但不限於，收穫材料，及植物生長繁衍材料，例如切枝、塊莖、地下莖、分枝及種子。

【00104】 以上述組成物處理植物與植物部分時，可直接處理或使組成物於其周圍、棲地或儲存空間內作用，方法例如為浸泡、噴灑、蒸發、噴霧、噴濺、塗抹或注射。

【00105】 該組成物亦可透過本技藝中已知之方法施用於土壤。包括但不限於(a)滴注灌溉或施化灌溉、(b)土壤混合、(c)土壤灌藥、(d)種子處理及施料；以及(e)裸根沾浸。

【00106】 種子處理

【00107】 種子處理包括以本發明組成物，隨選配合其他生物活性劑、
拮抗劑或協同劑，於播種前施用於種子表面。殺有害物毒素、蛋白質及／
或本發明之化合物可以乾粉、粉漿或噴劑方式在種植前施用於種子。

【00108】 本發明之組成物可採以下任一模式配製成種子處理劑：乾
粉、水漿粉、溶液、可流動濃縮物或乳膠、乳膠、微膠囊、凝膠、或水可
分散顆粒。

【00109】 若為乾粉形態，活性成分以類似可濕性粉末之方式配製，但
以如礦物油等黏著劑取代潤濕劑。例如，取一公斤純化滑石粉（消毒12小
時）、15 g碳酸鈣及10 g羧甲基纖維素在無菌條件下按照Nandakumar等人
（2001年）所述之方式混合。活性成分之混合比為1:2.5（懸浮液對混合乾
料），將產品陰乾，使含水量降低至 20-35%。

【00110】 若欲將本發明組成物用於種子時，可於種子種植前利用一或
多種種子披衣劑於種子上構成被覆層。此等種子披衣劑包括，但不限於，
乙烯乙二醇、聚乙二醇、甲殼素、羧基甲基甲殼素、泥煤苔、樹脂及蠟。
該組成物亦可利用此技藝已知方式結合例如化學殺真菌劑或化學殺細菌劑
以單點、多點或其他行為模式施用於種子。

【00111】 在其他實施例中，本發明之組成物可經種子吸收或以粉狀接
種體之方式施用於種子。

【00112】 所述可為習知種子，或為基因改造種子，如Liberty Link
(Bayer CropScience)、Roundup Ready種子(Monsanto)，或其他抗除草劑種
子，及／或經調整而具有昆蟲抗性之種子，或經基因「累加」而成為具有
除草劑抗性及昆蟲抗性基因之種子。

【00113】 植物生長促進

【00114】 植物與細菌於根際之交互作用為決定土壤肥沃與植物健康之重要因素。有益於植物生長之腐生性細菌又稱為植物促生性根棲細菌(PGPR)。一般而言，植物生長促進因子之作用方式可分為三種：合成植物生長調控因子、促進土壤養分吸收，及預防植物疾病。因此，PGPR之效用可直接性或間接性。間接植物生長促進可包括對植物致病菌之抵抗性，方式包括，例如，產生攜鐵蛋白、合成抗生素，以及產生HCN 及／或細胞壁降解酵素。直接植物生長促進效果之達成方式為調節植物激素（幫助植物及根部發展，並保護植物不受惡劣環境傷害），以及溶解礦物磷酸鹽和其他營養素。

【00115】 本發明之組成物，特別是，芽孢桿菌分離株F727及／或取自芽孢桿菌分離株F727培養物之表層浮質、濾液、萃取物、化合物、代謝物或細胞片段，可用於調控或更詳言之是促進植物生長，適用者如以下作物：如水果（如草莓）、蔬菜（如番茄、南瓜、椒、茄）、豆科植物，或穀類作物（如大豆、小麥、稻米、玉米）、樹、花、觀賞植物、灌木（如，棉、玫瑰）、草皮（如一年生黑麥草、百慕達草、野牛草、細弱剪股穎、小糠草、小金錢草、硬羊茅、肯塔基藍草、克育草、多年生黑麥草、紅牛毛草、粗莖苗系草、海雀稗、聖奧古斯丁草、高狐草、韓國草等等）、球莖植物（如，洋蔥、大蒜）或藤（如，葡萄藤）。該組成物亦可用於調控植物之種子發芽。

【00116】 本發明之組成物，或配製產品，可單獨使用或與一或多種下述其他成分結合使用，如生長促進劑及／或抗植物致病劑，於槽中混合或以預設順序之編程（依序輪用）在生長季節中施用。當與上述產物結合使

用時，濃度應低於產品標籤建議之濃度，在一特定實施例中，二或多種產品（其中一種為本發明之組成物）結合之功效高於其個別成分之功效加總。因此，此等二（或多）種產物間之協同效應可加強整體效果，且可降低植物病原體品種產生農藥抗性之風險。

【00117】該組成物可於移種時以根浸方式施用，具體而言可藉由在水果或蔬菜移栽至土壤之前，先將其之根部略為浸泡該組成物（約0.25至約1.5%，且更具體而言為約0.5%至約1.0%體積比），藉此利用該組成物處理該水果或蔬菜。

【00118】或者，該組成物可透過滴加或其他灌溉系統施用。具體而言，可將該組成物注入一滴加灌溉系統。於一特定實施例中，該組成物之施用濃度為 1×10^8 CFU/ml，用量可為每英畝約11至約4 夸脫。

【00119】在又一實施例中，可將該組成物添加於犁溝中以達施用之目的。具體而言，可利用校準為2-6加侖／英畝之總輸出量之噴嘴於種植時進行該組成物之犁溝內噴灑。位於犁溝之噴嘴運作與種植機配合，使得可於種子落入犁溝之同時施用農藥。

【00120】利用已知方式將上述混合物與一固態或液態輔藥（視需要）製備成劑。例如，該混合物之製備可透過均質混合及／或將該成份與增量劑混合而成，所述增量劑例如為溶劑、固態載體，以及表面活性化合物（表面活性劑）（視需要）。該組成物亦可進一步包含如穩定劑、黏性調節劑、結合劑、輔藥以及肥料等成份或其他活性成份，以獲得特殊效應。

【00121】與植物促生劑結合

【00122】本發明之組成物可與其他生長促進劑結合使用，所述其他生

長促進劑如合成或有機肥料（如，粒狀或液態二銨磷酸鹽）、堆肥茶、海藻萃取物、植物生長荷爾蒙如IAA（吲哚乙酸）用於移植之生根荷爾蒙處理，可單獨使用或與植物生長調節劑結合使用，如IBA（吲哚丁酸）及NAA（萘乙酸），及生長促進微生物，例如，芽孢桿菌、假單胞菌、根瘤菌及木黴菌。

【00123】 抗植物致病劑

【00124】 本發明之組成物亦可結合其他抗植物致病劑使用，如植物萃取物、生物農藥、無機作物殺蟲撒佈劑（如銅）、界面活性劑（如鼠李糖酯；Gandhi 等人，2007年）或具有殺蟲性質之天然油，如石蠟油或茶樹油，或具有單點、多點或其他作用模式之化學殺真菌劑或殺細菌劑。如在此所定義，「抗植物致病劑」為可調控植物病原體生長之藥劑，所指病原體特別是會造成植物之土傳疾病者，或為可預防植物受一植物病原體感染之藥劑。所述植物病原體包括但不限於真菌、細菌、放射菌或病毒。

【00125】 如上所述，抗植物病原劑可為一單點抗真菌劑，其可包括但不限於去甲基抑制劑(DMI)（如咪唑、嘧啶、嘧啶、三唑）、嗎啉、羥基嘧啶、苯胺基嘧啶、磷硫醇鹽、醌外部抑制劑、喹啉、二甲醯亞胺、羧胺、苯基醯胺、苯胺基嘧啶、苯基吡咯、芳香烴、桂皮酸、羥基苯胺、抗生素、多氧菌素、醯基胺、鄰苯二甲醯亞胺、苯環（二甲苯基丙胺酸）。在一更特定實施例中，該抗真菌劑係一去甲基抑制劑，其細選自由以下項目所構成之群組：咪唑、嘧啶、嘧啶級三唑（如，bitertanol、myclobutanil、penconazole、propiconazole、triadimefon、bromuconazole、cyproconazole、diniconazole、fenbuconazole、hexaconazole、tebuconazole、tetraconazole）。在一最特定實施例中，該抗真菌劑為邁克尼。在又一特定實施例中，該抗真菌劑係一醌

外部抑制劑（如嗜球果傘素）。該嗜球果傘素可包括但不限於azoxystrobin、kresoxim-methoyl或trifloxystrobin。在又一特定實施例中，該抗真菌劑為一醌，如快諾芬（5, 7-二氯-4-喹啉基 4-氟苯基醚）。

【00126】 在又另一實施例中，該殺真菌劑為多點非無機化學殺真菌劑，選自以下項目構成之群組：氯腈、喹啉啉、磺醯胺、磷酸酯、亞磷酸酯、二硫代胺基甲酸酯、氯烷基硫代、苯基吡啶-胺、氰基-乙醯胺肪。

【00127】 在又另一實施例中，該抗植物病原劑可為鏈黴素、四環素、氧四環素、銅或春日黴素。

【00128】 實例

【00129】 實例1：芽孢桿菌分離株F727之分離與透過16S rRNA、*recA* 及 *phoR*序列之特性描述

【00130】 從採集自美國加州 Jonesville之土壤樣本中利用傳統平板稀釋法分離出芽孢桿菌品種 F727。經PCR放大與 16S rRNA、*recA* 及*phoR*通用細菌引子之基因定序判定此分離株為芽孢桿菌。Cerritos *et al.* (2008) *Int. J. Sys.Evol.Microbiol.***58**:919-923; Guo *et al.* (2012) *Can. J. Microbiol.***58**: 1295-1305.

【00131】 以無菌環從洋芋葡萄糖培養皿上刮下培養24小時之生長物，並將之再次懸浮於DNA 萃取緩衝液中。利用MoBio超潔淨微生物 DNA 萃取組萃取DNA。將5uL之等份DNA萃取物置於1% 瓊膠上以電泳法確認其質／量。

【00132】 rRNA序列

【00133】 16S rRNA基因放大之PCR反應設定為將2 μ L之該潔淨DNA

萃取物與25 μ L之GoTaq Green Mastermix、1.5 μ L正向引子(FD1 primer, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO:4), 及1.5 μ L反向引子(RD1 primer, 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' (SEQ ID NO:5))結合。以無菌之無核酸水將該反應量補足至50 μ L。將連鎖反應器設定為以下條件供進行PCR反應：10分鐘之95°C（初始變性），以45秒之94°C進行30次循環，45秒之55°C及2分鐘之72°C，而後為5分鐘之72°C（最終延伸）及最終保溫10°C。

【00134】 將5 μ L之等份PCR產物置於1% 瓊膠上確認其大小、量及質，而後將該產物帶與一質量階梯對照。

【00135】 以MoBio PCR 清理組去除該PCR產物中之多餘引子、核苷酸、酵素及型板。利用上述引子將清理後之PCR產物直接定序。

【00136】 用BioEdit軟體對齊正向及反向序列，得一1459 bp 保留序列。

【00137】 利用BLAST將F727菌株之16S rRNA 基因保留序列與細菌領域代表物可得序列比對。最接近之匹配為芽孢桿菌（庫藏編號GU250449.1），具99% 相似性。公開資料庫中無任何單一16S序列顯示與品種F727之100% 相似性。

【00138】 此外，以EzTaxon-e server (eztaxon-e.ezbiocloud.net/；Kim等人，2012年）根據16S rRNA序列資料分析保留序列。最接近之匹配（示於表1）包括芽孢桿菌中屬數種之典型菌株，無法單靠16S rRNA序列區分。

【00139】 表1

名次	名稱	品種	作者	登錄號	配對相似度 (%)	差異／總核苷酸	完整性 (%)
1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	BGSC 3A28(T)	Rooney 等人 2009	EU138467	99.66	4/1168	79.3
2	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	DSM 8802(T)	Delaporte and Sasson 1967	AM747812	99.65	5/1442	100
3	<i>Bacillus mojavensis</i>	RO-H-1 (T)	Roberts 等人 1994	JH600280	99.58	6/1442	100
4	<i>Bacillus vallismortis</i>	DV1-F-3(T)	Roberts 等人 1996	JH600273	99.51	7/1442	100
5	<i>Bacillus tequilensis</i>	10b(T)	Gatson 等人 2006	HQ223107	99.51	7/1427	98.5
6	<i>Bacillus siamensis</i>	KCTC 13613(T)	Sumpavapol 等人 2010	AJVF01000043	99.45	8/1442	100
7	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	NCIB 3610(T)	(Ehrenberg 1835) Cohn 1872	ABQL01000001	99.45	8/1442	100
8	<i>Bacillus</i> sp. subsp. <i>plantarum</i>	FZB42(T)	Borriss 等人 2011	CP000560	99.38	9/1442	100
9	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	NRRL B-23049(T)	Nakamura 等人 1999	CP002905	99.38	9/1442	100
10	<i>Bacillus</i>	JCM	Nakamu	AB0211	99.38	9/1442	100

	atrophaeus	9070(T)	ra 1989 Borris (ex Fukumo to 1943) Priest 等人 1987 Madhai yan 等	81 FN5976 44	99.31	10/1442	100
11	Bacillus sp. subsp. amyloliquefacie ns	DSM 7(T)					
12	<i>Bacillus methylophilus</i>	CBMB 205(T)	人 2010 (Weigm ann 1898) Chester 1901 Palmisa no 等	EU1948 97	99.09	13/1434	98.3
13	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580(T)	人 2001 Shivaji 等人	AE0173 33	98.06	28/1441	100
14	<i>Bacillus sonorensis</i>	NRRL B-2315 4(T)	人 2001 Shivaji 等人	AF3021 18	97.7	32/1389	95.7
15	<i>Bacillus aerius</i>	24K(T)	2006 Shivaji 等人	AJ8318 43	97.36	38/1442	100
16	<i>Bacillus aerophilus</i>	28K(T)	2006 Shivaji 等人	AJ8318 44	97.15	41/1441	100
17	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b (T)	2006 Shivaji 等人	AJ8318 42	97.15	41/1441	100
18	<i>Bacillus stratosphericus</i>	41KF2a (T)	2006 Satomi 等人	AJ8318 41	97.15	41/1441	100
19	<i>Bacillus safensis</i>	FO-036 b(T)	2006	AF2348 54	97	43/1434	97.5

【00140】 *recA*序列s

【00141】 *recA*基因放大之PCR反應設定為將2 μ L之該潔淨DNA萃取物與25 μ L之 GoTaq Green Mastermix、1.5 μ L 正向引子 (*recAf*, 5'-GATCGTCARGCAGSCYTWGAT -3', SEQ ID NO:6)、1.5 μ L 反向引子 (*recAr*, 5'-TTWCCRACCATAACSCCRAC -3', SEQ ID NO:7)結合。以無菌之無核酸水將該反應量補足至50 μ L。將連鎖反應器設定為以下條件供進行PCR反應：5分鐘之95°C（初始變性），以30秒之95°C進行30次循環，30秒之45°C及1分鐘之72°C，而後為5分鐘之72°C（最終延伸）及最終保溫4°C。

【00142】 將5 μ L之等份PCR產物置於1% 瓊膠上以電泳法確認其大小、量及質，而後將該產物帶與一質量階梯對照。

【00143】 以MoBio PCR 清理組去除該PCR產物中之多餘引子、核苷酸、酵素及型板。利用上述引子將清理後之PCR產物直接定序。

【00144】 利用BioEdit軟體對齊正向與反向序列，產生505 bp 保留序列。

【00145】 利用BLAST比對F727 (SEQ ID NO:10) *recA*之基因保留序列與代表性之細菌序列。最符合者之匹配為液化澱粉芽孢桿菌完整基因組（庫藏編號CP002927.1），具有92%相似性。

【00146】 *phoR*序列s

【00147】 *phoR*基因放大之PCR反應設定為將2 μ L之該潔淨DNA萃取物與25 μ L之 GoTaq Green Mastermix、1.5 μ L 正向引子 (*phoR-f*: 5'-TTYARYTCATGRGAVACATT -3', SEQ ID NO:11)、1.5 μ L 反向引子(*phoR-r*: 5'-GGNTAYAAANARGAGGAGCC -3', SEQ ID NO:12)結合。以無菌之無

核酸水將該反應量補足至50 μ L. 將連鎖反應器設定為以下條件供進行PCR反應：5分鐘之95°C（初始變性），以45秒之95°C進行35次循環，45秒之48°C及1分鐘之 72°C，而後為10分鐘之72°C（最終延伸）及最終保溫4°C。

【00148】 以電泳法將5 μ L之等份PCR產物置於1% 瓊膠上以電泳法確認其大小、量及質，而後將該產物帶與一質量階梯對照。

【00149】 以MoBio PCR 清理組去除該PCR產物中之多餘引子、核苷酸、酵素及型板。利用上述引子將清理後之PCR產物直接定序。

【00150】 利用上述之反向引子取得998核苷酸 *phoR*序列。

【00151】 利用BLAST與*phoR*反向序列比對。最符合者之匹配為液化澱粉芽孢桿菌完整基因組，具有83%相似性。

【00152】 **實例2：分離株F727之脂肪酸組成**

【00153】 於MIDI Labs, Inc (Newark, DE) 根據商業標準確認分離株F727之脂肪酸特性資料。結果 示於表2。將分離株F727脂肪酸特性資料與RTSBA6 6.10脂肪酸資料庫比對，顯示分離株F727與枯草芽孢桿菌之相似性指數為0.885。

【00154】 **表2**

脂肪酸	%	脂肪酸	%
13:0 iso	0.44	16:0 iso	2.57
13:0 anteiso	0.32	16:1w11c	2.53
14:0 iso	1.09	16:0	2.99
14:0	0.45	17:1w10c	2.92
15:0 iso	26.19	Sum 4	0.82
15:0 anteiso	37.58	17:0 iso	12.59
16:1 w7c OH	0.56	17:0 anteiso	8.71
		18:0	0.23

【00155】 實例3： 以MALDI-TOF蛋白質特性資料進行之分離株 F727特性描述

【00156】 於 MIDI Labs, Inc. (Newark, DE) 確認分離株 F727 之 MALDI-TOF 質譜蛋白質指紋。分離株 F727 之 MALDI-TOF 蛋白質特性資料與質譜資料庫中之其他微生物不同。雖與 *Bacillus vallismortis*、*Bacillus mojaviensis* 及 *Bacillus subtilis* 之蛋白質特性資料有些許相似性，但相似性分數均不足以表示基因匹配。

【00157】 實例4：芽孢桿菌分離株F727之生物化學特性描述

【00158】 革蘭氏染色

【00159】 細胞壁主要是由肽糖組成，因此革蘭氏染色法便是利用細胞壁之物理特性區分細菌。革蘭氏陽性細菌之肽糖層較厚，染色結果會呈紫／藍色；而革蘭氏陰性細菌細胞壁之肽糖層較薄，呈現紅色／粉紅染色。分離株 F727 經革蘭氏染色後之顯微鏡檢驗顯示紫色細胞，意味芽孢桿菌分離株 F727 為革蘭氏陽性細菌。

【00160】 尿素酶活性

【00161】 尿素酶測試係用於偵測尿素酶之酵素活性，此種酵素可催化尿素轉換為氨與重碳酸鹽。尿素培養液包含尿素與pH指示劑酚紅。酚紅在酸性環境中轉為黃色，在鹼性環境中呈現粉紅色。若尿素酶具有有效素活性，培養液中之尿素 會被降解而產生氨，培養基則轉為 粉紅，表示陽性檢測結果。

【00162】 以分離株F727接種後，尿素培養液顏色由紅轉黃，表示尿素酶活性測試結果為陰性。因此，芽孢桿菌分離株F727創造酸性環境，並無尿素酶活性存在。

【00163】 過氧化氫酶活性

【00164】 過氧化氫酶測試係用於偵測過氧化氫酶之酵素活性。過氧化氫酶可將過氧化氫分解為氧與水。具有過氧化氫酶活性之有機體 在以過氧化氫處理時會產生氣泡。芽孢桿菌分離株F727培養物接觸試劑數秒內就開始起泡，表示此有機體具有過氧化氫酶活性。

【00165】 氧化酶活性

【00166】 氧化酶測試係用於偵測 細胞色素c之氧化酶活性。於呼吸鏈中含有細胞色素 c之細菌為氧化酶陽性，會將試劑轉為紫色。反之，氧化酶陰性之細菌不會使試劑氧化，因此試劑仍保持無色。芽孢桿菌分離株F727將試劑轉為紫色，證明其具有氧化酶活性。

【00167】 TSI瓊脂

【00168】 三糖鐵(TSI)瓊脂係用於判定微生物使葡萄糖、乳糖及／或蔗糖發酵之能力，以及腸內細菌產生硫化氫之能力。培養基含有 pH指示劑

酚紅及硫酸亞鐵，可與硫化氫反應而產生黑色沉澱物。測試分離株F727時，斜面仍為紅色，而尾端由紅轉黃，且未觀測到黑色。上述結果顯示分離株F727並不會生成硫化氫，且僅會使葡萄糖發酵，而不會使乳糖或蔗糖發酵。

【00169】 抗生素易感性

【00170】 於Muller-Hinton培養基上利用抗生素試片測試芽孢桿菌分離株F727之抗生素易感性。將一圈F727再懸浮於1 mL之無菌去離子水中，並將100 μ L之此懸浮液刮入 Mueller-Hinton瓊脂培養皿。待吸入瓊脂後，將預先裝好抗生素之試片放置於培養皿上，並將培養皿以25 $^{\circ}$ C 培養48小時。結果示於表3。

表 3：芽孢桿菌 F727 對各種抗生素之易感性

	濃度 (ug)	易感性*
四環素	30	+++
卡那黴素	30	+++
紅黴素	15	+++
鏈黴素	10	++
青黴素	10	+++
氨比西林	10	+++
氧四環素	30	+++
氯黴素	30	+++
賽普洛	5	+++
慶大黴素	10	+++
達比黴素	100	+++
頭孢呋辛酯	30	+++
亞胺硫黴素	10	+++
磺胺甲基噁唑-三甲氧 苄氨嘧啶	23.75/ 25	+++

【00171】 * +++表示高度易感（無生長）；++表示中度易感（減緩生長）；-表示無易感性

【00172】 API ZYM試紙

【00173】 API ZYM試紙 (BioMerriex)可供測試微生物之各種酵素活性。按照製造商指示進行檢測，結果歸納於表4。

表 4

編號	檢驗酵素	基質	pH	解釋		結果
				陽性	陰性	
1	對照組		8.5	無色或若樣本本身有強烈顏色即為樣本顏色		-
2	鹼性磷酸酵素	2-萘基磷酸鹽	6.5	紫	無色或極淡黃色	++
3	酯酵素 (C 4)	2-萘基酪酸鹽	7.5	紫		++
4	酯酵素解脂酶 (C 8)	2-萘基辛酸鹽	7.5	紫		+
5	解脂酶 (C 14)	2-萘基肉豆蔻酸鹽	7.5	紫		-
6	亮胺酸胺基肽酶	L-亮胺醯基-2-萘基醯胺	7.5	橘		+
7	纈胺酸胺基肽酶	L-纈胺醯基-2-萘基醯胺	7.5	橘		+
8	胱胺酸胺基肽酶	L-胱胺醯基-2-萘基醯胺	7.5	橘		-
9	胰蛋白酵素	N-苯甲醯基-DL-精胺酸-2-萘基醯胺	8.5	橘		-
10	α -胰凝酪酶	N-戊二基-苯丙胺酸-2-萘基醯胺	7.5	橘		-
11	酸性磷酸酵素	2-萘基磷酸鹽	5.4	紫		+++

12	萘酚-AS-BI-磷酸 水解酶	萘酚-AS-BI-磷酸鹽	5.4	藍	+++
13	α -半乳糖苷酶	6-Br-2-萘基- α D-半乳 糖苷	5.4	紫	-
14	β -半乳糖苷酶	2-萘基- β D-半乳糖苷	5.4	紫	-
15	β -葡萄糖醛酸酶	萘酚-AS-BI- β D-葡萄 糖醛酸	5.4	藍	-
16	α -葡萄糖苷酶	2-萘基- α D-葡萄糖苷	5.4	紫	-
17	β -葡萄糖苷酶	6-Br-2-萘基- β D-葡萄 糖苷	5.4	紫	-
18	N-乙醯基- β -乙醯 葡萄糖胺酶	1-萘基-N-乙醯基 - β D-葡萄糖胺苷	5.4	棕	-
19	α -甘露糖苷酶	6-Br-2-萘基- α D-甘露 糖苷	5.4	紫	-
20	α -岩藻糖苷酶	2-萘基- α L-岩藻糖苷	5.4	紫	-

【00174】 API 20 NE試紙

【00175】 API[®]20 NE試紙之20支微管中含有脫水基質。於習知測試件上接種芽孢桿菌分離株F727懸浮液以重新構成培養基。發生代謝後微管便會改變顏色。於同化作用測試件上接種最少量之培養基與芽孢桿菌分離株。若細菌能夠利用基質，則F727會有所成長。根據製造商讀數表分析反應，並將結果歸納於表5。

表 5

陽性： +

陰性： -

微弱： ±

測試	有效成份	反應／酵素	結果		
			陰性	陽性	總結
NO ₃	硝酸鉀	將硝酸鹽還原成 亞硝酸鹽	NIT 1 + NIT 2，5 分鐘後讀 取		+
			無色	粉紅-Red	
		將硝酸鹽還原成 氮	ZN，5 分鐘後讀取		-
			粉紅	無色	
TRP	L-色胺酸	吡哚產生（色胺 酸）	JAMES，立即讀取		-
			無色 淡綠／ 黃	粉紅	
GLU	D-葡萄糖	發酵（葡萄糖）	藍到綠	黃	-
ADH	L-精胺酸	精胺酸二水解酶	黃	橘／粉紅／ 紅	-
URE	尿素	尿素酶	黃	橘／粉紅／ 紅	-
ESC	七葉靈檸檬 酸鐵	水解（β-葡萄糖苷 酶）（七葉靈）	黃	灰／棕／黑	+
GEL	明膠 （牛來源）	水解（蛋白酶）（明 膠）	無染料擴散	黑色染料擴 散	+

PNG	4-對硝基苯 -βD-半乳糖 苷	B-半乳糖苷酶(對 -對硝基苯-βD-半 乳糖苷)	無色	黃	-
[GLU]	D-葡萄糖	葡萄糖同化作用	透明	不透明	+
[ARA]	L-樹膠醛糖	樹膠醛糖同化作 用	透明	不透明	-
[MNE]	D-甘露糖	甘露糖同化作用	透明	不透明	-
[MAN ↓]	D-甘露醇	甘露醇同化作用	透明	不透明	+
[NAG]	N-乙醯基-葡 萄糖胺	n-乙醯基-葡萄糖 胺同化作用	透明	不透明	+
[MAL]	D-麥芽糖	麥芽糖	透明	不透明	+
[GNT]	葡萄糖酸鉀	葡萄糖酸鉀同化作 用	透明	不透明	-
[CAP]	癸酸	癸酸同化作用	透明	不透明	-
[ADI]	己二酸	己二酸同化作用	透明	不透明	-
[MLT]	蘋果酸	蘋果酸鹽同化作 用	透明	不透明	+
[CIT]	檸檬酸鈉	檸檬酸鈉同化作 用	透明	不透明	±
[PAC]	苯乙酸	苯乙酸同化作用	透明	不透明	-

【00176】 實例5：化合物 A、B及C之分離與特性描述

【00177】 純化程序

【00178】 利用以下步驟（概述於圖1）對萃取自芽孢桿菌分離株F727細胞培養物之化合物進行純化。

【00179】 用安伯來特XAD-7樹脂（Asolkar 等人，2006年）從芽孢桿菌分離株F727之1-L 發酵物中萃取培養液，方法為將細胞懸浮液在室溫下以155 rpm之轉速搖動兩小時。以紗布濾得樹脂與細胞團，並用去離子水洗去鹽。而後將樹脂和細胞團連同紗布浸泡於丙酮中2小時，接著濾去丙酮，並在真空下利用旋轉蒸發器進行乾燥，藉此取得粗萃取物。

【00180】 以逆相C18 真空液相層析法（VLC, H₂O/CH₃OH；梯度80:20至0:100%）粗萃取物劃分為 6個片段。將此等片段以旋轉蒸發器濃縮至乾燥，並透過瓊脂盤檢驗確認結果乾燥剩餘物之生物活性。見下文實例16。檢驗結果顯示C-18 VLC片段3具有殺真菌活性。

【00181】 將活性片段3以逆相HPLC（Spectra System P4000, Thermo Scientific）處理，取得純化合物，而後將之交付上述生物檢驗以定位／鑑別該活性化合物。

【00182】 於HPLC C-18柱（Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30）上以水：乙腈（含0.01% TFA）梯度溶劑系統（0-10分鐘； 70%水 CH₃CN，10-20分鐘；70-45% 水 CH₃CN，20-40分鐘；45 - 30 %水CH₃CN，40-60分鐘； 30-0% CH₃CN，60-65分鐘；100 % CH₃CN，65-70分鐘；0 – 30% 水CH₃CN）以8 mL/min流速及210 nm紫外線偵測等條件將活性片段3進一步純化。取得三種 純化化合物：

【00183】 化合物 A (F727F3H11)之停留時間為35.95分鐘，

【00184】 化合物 B (F727F3H14) 之停留時間為37.26分鐘，以及

【00185】 化合物 C (F727F3H17) 之停留時間為38.11分鐘。

【00186】 質譜法

【00187】 在Thermo Finnigan LCQ DECA XP^{Plus} 電噴灑(ESI)儀器之 LCQ DECA XP^{Plus} 質譜儀 (美國加州聖瓊斯Thermo Electron Corp.) 上利用全掃描模式中之陽性及陰性離子化模式(m/z 100-1500 Da)進行活性峰值之質譜分析。Thermo高效液相層析(HPLC)儀器配備有 Finnigan Surveyor PDA 加偵測器、自動採樣器、MS泵及4.6 mm x 100 mm之 Luna C18 5 μ m柱 (Phenomenex)。溶劑系統包含水 (溶劑A) 與乙腈 (溶劑B)。流動相開始於 10% 溶劑 B，於20分鐘之間線性增加至100%溶劑 B，而後保持4分鐘，最後在3分鐘之間回到10%溶劑 B，並維持3分鐘。流速為0.5 mL/min。注射量為10 μ L，將樣本在自動採樣器內保持於室溫。

【00188】 用LC-MS透過LC 及逆相層析來分析該化合物。本發明化合物之質譜法分析係採以下條件進行：噴霧氣及輔助氣之氮流速分別固定為 30及15 arb。進行電噴灑離子化，採用之噴灑電壓為 5000 V且毛細電壓為 35.0 V。毛細溫度設定為400°C。以Xcalibur軟體分析資料。

【00189】 根據負離子化模式中之1043.84 (M - H)分子離子峰 (圖2)，判定化合物 A (F727F3H11)之分子量經判定為1044。此判定結果為正模式 ESIMS之離子化圖形所支持，圖形顯示分子離子峰位於1045.48 (M + H) 且擬分子離子峰於 1067.55 (M + Na) (圖3)。

【00190】 根據負離子化模式中之1057.83 (M - H)分子離子峰 (圖4)，判定化合物 B (F727F3H14)之分子量經判定為1058。此判定結果為正模式 ESIMS之離子化圖形所支持，圖形顯示分子離子峰位於1059.56 (M + H) 且

擬分子離子峰於 1081.63 (M + Na) (圖5)。

【00191】 根據負離子化模式中之1071.85 (M - H)分子離子峰 (圖6)，判定化合物 C (F727F3H17)之分子量經判定為1072。此判定結果為正模式 ESIMS之離子化圖形所支持，圖形顯示分子離子峰位於1073.57 (M + H) 且擬分子離子峰於 1095.62 (M + Na) (圖7)。

【00192】 層析片段與純化合物之抗真菌測試其他檢驗方法

【00193】 於中等尺寸培養皿之各四分之一部分放入一片濾紙盤(共四片)。每片濾紙盤均距離培養皿中央 2 cm。將15 μ L之層析柱片段或純化化合物 (20 mg/mL) 倒在兩個相對紙盤的表面。將乙醇倒在另兩個紙盤做為對照組。紙盤上倒好料後，將小真菌塊 (約1 x 1 cm)放在培養皿中央。使用 *Bipolaris maydis*、*Botrytis cinerea* s、*Sclerotinia homeocarpa* 及 *Rhizoctonia solani*為真菌病原體。將培養皿 於25°C培養 48小時，之後測量各紙盤周圍之抑制區域。VLC片段3與化合物A、B及C之結果示於圖8；顯示三種化合物皆具有顯著之殺真菌活性。

【00194】 化合物 A、B及C之胺基酸分析

【00195】 以液相水解 (6N HCL, 1% 酚, 110°C, 24小時, 真空) 方式水解化合物 A (F727F3H11, 0.05 mg)。冷卻後，使反應混合物乾燥，並將水解後之產物溶解於 Norleu稀釋緩衝液至1.0 mL量。取A 50 μ l之此樣本放上離子交換柱以進行分析。

【00196】 為取得標準與進行校正，使用Na型Hitachi 8800 (Sigma, A-9906)上水解蛋白用之胺基酸標準溶液來決定反應因子，藉此校正Hitachi 8800分析儀對所有胺基酸之測量。每次注射均包含正亮胺酸為內部標準，

以便修正樣本體積與層析變因變動下之結果。系統中使用Pickering鈉緩衝液、Pierce測序級HCl（水解）、Transgenomic 離子交換柱及加州大學戴維斯分校分子結構處(MSF)之優化方法。就樣本中之個別胺基酸進行報告。化合物 A 中之胺基酸為穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）。

【00197】 化合物 B及 C之胺基酸組份亦用相同方式分析。發現化合物 B及C具有與化合物 A相同之胺基酸且比例相同。

【00198】 實例6：芽孢桿菌分離株F727對番茄植物灰黴病菌之效果

【00199】 以 F727 發酵物表層浮質處理番茄植物 (*Solanum lycopersicum*) var. Roma。對每株植物噴灑約3 ml之無細胞發酵表層浮質。讓植物乾燥後再接種2 ml之*Botrytis cinerea*孢子懸浮液，其濃度為每毫升 6.67×10^7 孢子。對照組植物則噴灑去離子水，兩組陰性對照組植物僅噴灑孢子（濃度為 1×10^7 spores/ml及 6.67×10^7 spores/ml），而一組陽性對照組植物噴灑 SWITCH[®] 65.2 WG（Cypronidil 與 Fludioxonil，Bayer Crop Sciences, Inc. 銷售），比例為14oz/100gal/acre。每種處理均製做一式三份。將植物放入生長室中之透明塑膠箱，於照明恆溫控制環境下生長。處理後8天進行疾病評等。評估植物疾病嚴重度之方式為目視評估 染病葉片面積，取得疾病等級。見，例如，WC James（1971年）之「A Manual of Assessment Keys in Plant Diseases」 American Phytopathological Society，ISBN 978-0-89054-081-7。結果示於圖9，可看出疾病嚴重度從65%（感染，未處理對照組）降低至40%（經F727表層浮質處理之感染植物）。

【00200】 其他實驗中測試F727 WCB之兩倍、四倍及十倍稀釋。利用

兩種發酵物之 WCB觀察三種稀釋版本之疾病嚴重度降低效果。

【00201】 實例7：芽孢桿菌F727 對萵苣露霉病之效果

【00202】 種植萵苣植物(*Lactuca sativa*) var. Celtuce，密度為每盆四株幼苗。對每盆噴灑2ml之 F727發酵表層浮質。讓植物乾燥後再接種2ml之 *Bremia lactuca*（露霉病）孢子懸浮液 (1×10^5 spores/ml)。每種處理一式五份。將處理過之植物培養於加蓋托盤中，生長室溫度設定為15°C，曝光週期12小時。處理後10天評估疾病嚴重度，如實例6所述。

【00203】 結果示於圖10。未處理對照組之平均疾病嚴重度為54.47%，F727處理過之植物僅有14.64%之疾病嚴重度。F727 處理過植物之疾病嚴重度相當於經化學控制 RIDOMIL® GOLD EC 處理之植物(4% w/w metalaxyl-M and 64% w/w mancozeb) (150 ppm a.i.) (Syngenta)，其嚴重度為11.67%。

【00204】 其他實驗中測試F727 WCB之兩倍、四倍及十倍稀釋。利用兩種發酵物之 WCB觀察三種稀釋版本之疾病嚴重度降低效果。

【00205】 實例8：芽孢桿菌 F727與 ELEVATE之效果比較

【00206】 以3ml之 F727發酵表層浮質處理番茄植物(*Solanum lycopersicum*) var. Roma。讓植物乾燥後再接種約2ml之*Botrytis cinerea*孢子懸浮液 (2.8×10^7 spores/ml)。兩小時後或待第一次處理乾燥後，對一部分受感染植物再次噴灑F727。亦對接種植物進行水（陰性對照組）及ELEVATE® 50 WDG (Fenhexamid, Bayer Crop Science, Inc.)處理，後者為陽性對照組。

【00207】 每種處理一式四份。處理後九天以實例6所述方式評估疾病嚴重度。結果示於圖11。水對照組之疾病嚴重度為38.3%，而陽性對照組

(ELEVATE® 50 WDG, Fenhexamid, Bayer Crop Science, Inc.)則使疾病嚴重度降低至13.33%。以1x及 2x F727表層浮質處理之植物其疾病嚴重度分別為8.3%及 5%。

【00208】 實例9：F727表層浮質對椒上灰黴病感染之作用

【00209】 對椒植物(*Capsicum annuum*) var. Serrano噴灑約2ml之F727表層浮質後待乾。對植物接種2 ml之*Botrytis cinerea*孢子懸浮液 of (2.7×10^7 spores/ml)。植物之處理均為一式三份。處理後13天，評估疾病嚴重度，並將之與未處理對照組(噴水)及陽性對照組(依標籤率噴灑 Elevate® 50 WDG (Fenhexamid, Bayer Crop Science, Inc.)) 比較。

【00210】 結果示於圖12，顯示F727對感染灰黴病之植物之疾病控制可與Elevate®處理相比。

【00211】 實例10：三種培養基發酵物所產F727 全細胞液、表層浮質與細胞對黃瓜白粉病之效果評估

【00212】 於三種不同生長培養基(SPY, SMP and TSB)進行F727細胞之發酵。對兩週大黃瓜植物(*Cucumis sativus*) var. SMR58噴灑約3 ml之各種發酵F727全細胞液、F727表層浮質或F727細胞。將細胞聚集後再懸浮於10 mM 硫酸鎂以便噴灑。每種處理均準備相同之四份。待植物乾燥兩小時後再噴灑約2 ml之白粉病孢子懸浮液。此懸浮液係自染病植物製得，濃度為 3.0×10^5 spores/mL。之後將植物培養於生長室，待發病，再以實例6所述方式評估疾病嚴重度。

【00213】 結果之疾病控制百分比示於圖13。三種培養基產生之全細胞、全細胞液及細胞表層浮質在黃瓜上均展現抗真菌活性。

【00214】 實例11：三種培養基發酵物所產F727 全細胞液、表層浮質與細胞對番茄灰黴病之效果評估

【00215】 對兩週大番茄植物(*Solanum lycopersicum*) var. Stupice噴灑約2 ml之F727全細胞液、F727表層浮質及 F727細胞，每種類型均以三種不同生長培養基(SPY、SMP及TSB)所培養出之發酵物製作。將細胞聚集後再懸浮於10 mM 硫酸鎂以便噴灑。每種處理均準備相同之三份。待植物乾燥一小時，然後放置於潮濕條件下使其氣孔開啓。從以2%之Sabouraud 麥芽糖培養液培養十天之瓊脂培養皿取料製作*Botrytis cinerea*孢子懸浮液，濃度為約 1.0×10^7 spores/mL。對每株植物噴灑1 ml之上述懸浮液。將植物培養於生長室中，設定曝光週期為12小時，直到發病，再以實例6所述方式評估疾病嚴重度。

【00216】 結果之疾病控制百分比示於圖14。三種培養基產生之全細胞、全細胞液及細胞表層浮質在番茄上均展現抗真菌活性。

【00217】 實例12：F727 全細胞液、商業芽孢桿菌型產品與 F727 全細胞液混合 Regalia®對黃瓜白粉病之效果評估

【00218】 對兩週大黃瓜植物(*Cucumis sativus*) var. SMR58之第一片真葉噴灑約3 mL之：Regalia® 5% (*Renoutria sachalinensis*, Marrone Bio Innovation, Inc., Davis, CA) 比例1:2000、Regalia® 5%比例1:200、F727 全細胞液、F727 全細胞液 + Regalia® 5%比例1:2000、Serenade® (Bayer Crop Science, Inc.) 比例1:200、Sonata® (Bayer Crop Science, Inc.)比例 1:200，Vacciplant® (Laboratoires Goëmar S.A.) 比例40 µL/50 mL、Companion® (Growth Products, Ltd.) 比例1:200，以及Double Nickel 55® (Certis USA,

L.L.C.) 比例0.06 g/50 mL。每種處理均為一式四份。待植物乾燥兩小時，而後對每株植物約噴灑2 ml之白粉病孢子懸浮液（濃度為 3.0×10^5 spores/mL）。將植物放置於生長室培養，直到發病。

【00219】圖15之結果顯示芽孢桿菌分離株F727發酵物之全細胞液（圖中標示為 MBI-110 WCB）較許多現有殺真菌劑更能有效對抗白粉病。搭配及未搭配F727表層浮質之Regalia[®]結果示於表6。柯比(Colby)協同係數指出F727 全細胞液與1:2000比例之Regalia[®] 5%可產生協同作用。

【00220】表6

處理	平均嚴重度	%控制	柯比預期值	柯比協同係數
F727 WCB	92.5	2.6	-	-
Regalia 1:2000 (v/v)	30	68.4	-	-
Regalia 1:2000 (v/v) in F727 WCB	8	91.6	69.3	1.32

【00221】實例13：F727 全細胞液、Regalia[®] 與 Double Nickel 55[®] 對蕃茄晚疫病之效果評估

【00222】在番茄植物(*Solanum lycopersicum*) var. Stupice之二真葉階段時噴灑2 ml之F727 全細胞液、Regalia[®] 比例1:200 (Marrone Bio Innovations, Inc.) 及 Double Nickel 55[®] 比例0.06 g/50mL (Certis USA, L.L.C.)。待植物乾燥後再以*Phytophthora infestans* 孢子溶液噴灑覆蓋。此溶液係從受感染之番茄葉片製得，濃度為 10^4 spores/mL。將植物培養於20°C

之生長室，輔以人工光線照明。處理後3天再以實例6所述方式評估疾病嚴重度。

【00223】圖16之結果顯示芽孢桿菌分離株F727發酵物全細胞液（圖中標示為MBI-110 WCB）對番茄之晚疫病菌感染提供良好之防護功效。

【00224】實例14：白絹病菌之F727控制體外評估

【00225】在液態培養基中進行分離株F727發酵，以離心方式取出表層浮質。半數表層浮質經0.2 μm 之濾紙過濾。將 *Sclerotium rolfsii* 之單菌核放置於 10 cm 培養皿中央，每一培養皿中並放入四片0.5 cm 直徑之紙盤，均距真菌2 cm，且彼此亦為等距。將F727表層浮質、經過濾之F727表層浮質 及濃度0.5 mL/L之Pristine[®] (BASF)以 12.5 μl 之等份加至紙盤，使兩張相對紙盤含總計25 μl 之料，另兩張相對紙盤則為50 μl 。每種處理準備兩個培養皿。將培養皿以25°C培養三天。

【00226】各測試物質之抑制百分比之判定方式是測量各培養皿中菌絲從菌核到生長菌落最遠邊緣之距離，以此判斷生長狀況。圖17之結果顯示F727表層浮質不論過濾與否，在培養皿實驗中均能有效 抑制白絹病菌生長。但未過濾表層浮質均較經過濾者有效，且其有效性可與商業標準相比。

【00227】實例15：大豆立枯絲核菌 之F727控制評估

【00228】對無菌大麥穀粒接種 *Rhizoctonia solani*後培養1-2 週。使穀粒乾燥，以一比一之比例摻混沙粒以製成 *R. solani* 接種體。將此接種體與土壤充分混合，並將每500 ml混合土裝為一盆，澆入100 mL之水並於生長室中培養24小時。製備100%、50%及25%等三種強度之分離株F727全細胞液。各取40 mL澆淋於土壤，並於每盆中植入九枚大豆種子。每一處理準備

三份，每份三盆。將植物在生長室中培養 14天。而後評估發芽、植物高度、鮮芽重及鮮根重。

【00229】 測量地上幼枝（表7）、數量（表8）、平均芽重（表9）及平均芽高（表10）。結果顯示F727 全細胞液可使受*R. solani*感染之大豆植物增加芽數、芽重及芽高。

【00230】 表7

處理	N	地上幼枝 (三次平均)	StDev	Fisher 分類
1- 非接種對照組；以水處理	3	24.7	1.16	A
2- 非接種對照組；100% F727 全細胞液	3	25.0	1.00	A
3- 1:1600 接種率；100% F727 全細胞液	3	11.0	3.61	B
4- 1:1600 接種率；50% F727 全細胞液	3	11.7	2.52	B
5- 1:1600 接種率；25% F727 全細胞液	3	8.0	3.61	B
6- 1:1600 接種率；水對照組	3	12.0	1.00	B
		ANOVA p <0.0005		LSD $\alpha=0.05$

【00231】 表8

處理	N	數量 (三次平均)	StDev	Fisher 分類
1-非接種對照組；以水處理	3	24.7	1.16	A
2-非接種對照組；100% F727 WCB	3	25.0	1.00	A
3- 1:1600 接種率；100% F727 全細胞液	3	18.0	2.65	B
4- 1:1600 接種率；50% F727 全細胞液	3	18.3	1.16	B
5- 1:1600 接種率；25% F727 全細胞液	3	14.7	3.21	B
6- 1:1600 接種率；水對照組	3	15.3	1.16	B
		ANOVA p <0.0005		LSD $\alpha=0.05$

【00232】表9

處理	N	平均芽重 (g) (三次平均)	StDev	Fisher 分類
1-非接種對照組；以水處理	3	22.4	0.87	A
2-非接種對照組；100% F727 WCB	3	24.8	2.09	A
3- 1:1600 接種率；100% F727 WCB	3	11.2	3.23	B
4- 1:1600 接種率；50% F727 WCB	3	12.0	1.71	B
5- 1:1600 接種率；25% F727 WCB	3	8.9	2.88	B
6- 1:1600 接種率；水對照組	3	10.5	1.21	B
		ANOVA p <0.0005		LSD $\alpha=0.05$

【00233】 表10

處理	N	芽高 (cm) (三次平均)	StDev	Fisher 分類
1-非接種對照組；以水處理	74	13.1	3.27	A
2-非接種對照組；100% F727 WCB	75	14.0	3.132	A
3- 1:1600 接種率；100% F727 WCB	54	7.9	3.641	B
4- 1:1600 接種率；50% F727 WCB	55	7.3	5.052	B C
5- 1:1600 接種率；25% F727 WCB	44	6.1	5.52	C
6- 1:1600 接種率；水對照組	46	6.0	5.144	C
		ANOVA p <0.0005		LSD $\alpha=0.05$

【00234】 實例16：F727對細菌植物病原體控制之體外評估

【00235】 於1 ml之無菌水中接種於洋芋葡萄糖瓊脂 (PDA) 培養皿中培養出之以下細菌植物病原體 *Erwinia amylovora*、*Pseudomonas syringae*、*Bacillus cereus*、*Erwinia carotovora*、*Xanthomonas campestris*、*Xanthomonas arboricola* 或 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*。將細菌調製為懸浮液，並將100 μ L之病原體懸浮液刮入 PDA瓊脂培養皿，靜置10-15分鐘待其吸收。將無菌濾紙板放在瓊脂上，並倒入20 μ L之F727 VLC片段（10 mg/mL於甲醇中）或VLC片段之組合。層析片段係從芽孢桿菌分離株F727於V8 培養基之發酵物取得，如以上實例5所述。

【00236】 將培養皿培養 24-48小時，而後檢查濾紙盤周圍之抑制區域，藉此判斷病原體對F727片段之易感性。結果示於表11。

【00237】 表11：細菌植物病原體對F727片段之易感性

F727 樣本	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Xanthomonas arboricola</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
1. F727-F1	-	+	-	-	-	+	+
2. F727-F2	++	-	-	-	+	-	++
3. F727-F3	++	+	-	-	+	+	+
4. F727-F4	++	+	-	+	-	-	-
5. F727-F5	+	-	+++	+++	-	+	+++
6. F727-F6	+	-	+	-	-	-	+
7. F727-F2+F3	-	-	-	+	-	+	++
8. F727-F3+F5	-	-	+	++	-	-	+++
9. F727-F2+F6	-	-	-	-	-	-	+
10. F727-F4+F5	+	-	++	+++	-	-	+++
11. F727-F4+F6	-	-	++	-	-	-	-
12. F727-F5+F6	-	-	+++	+	-	-	++

【00238】符號：+++ 高度易感，++ 易感，- 具抗性

【00239】片段3展現最大數量之細菌品種抑制作用。故而將此片段再以上述實例5之方式進一步劃分。此外，片段5對*Bacillus cereus*、*Erwinia carotovora*及*Clavibacter*展現抗細菌活性。

【00240】實例17：不同培養基所產F727表層浮質與粗萃取物對真菌病原體發芽控制能力之體外評估

【00241】使分離株F727於12種不同液態培養基中發酵。於劑量反應孢子發芽實驗中測試表層浮質及粗萃取物樣本。將100 μ L之表層浮質或粗萃取物樣本結合200 μ L之1.5x 洋芋葡萄糖瓊脂 (PDA)放入48孔盤，待其固化。依照表12所示濃度製備真菌植物病原體孢子懸浮液，並將50 μ L之孢子懸浮液放置於PDA／處理混合物之上。將培養皿在25°C中培養3-5天，而後

目視評估真菌孢子發芽情況。

【00242】 結果示於表13。所有受測表層浮質均在最低測試濃度(3.13%)抑制所有病原體發芽。粗萃取物之活性依據用以培養F727細胞之培養基而異（粗萃取物之0.4% 稀釋為受測最低濃度）。這表示F727萃取物之活性會受到細胞成長時所用之培養基影響，因此，可利用培養基之不同調整出對於特定病原體之最佳活性。例如，可用M24培養基培養以*Fusarium* 為抑制目標之細胞。

【00243】 表12

病原體	所用孢子濃度
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	10^4 spores/mL
<i>Botrytis cinerea</i>	10^4 spore/mL
<i>Verticillium dahliae</i>	10^5 spores/mL
<i>Alternaria japonica</i>	10^4 spores/mL

【00244】 表13：來自不同培養基之F727 粗萃取物達成預防真菌孢子發芽效果所需之最小抑菌濃度

培養基	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. fragariae</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Alternaria japonica</i>
M1	0.40%	1.56%	0.40%	0.40%
M2	1.56%	3.13%	1.56%	0.78%
M3	0.40%	0.78%	0.40%	0.40%
M4	0.40%	0.78%	0.40%	0.40%
M5	1.56%	無抑制作用	3.13%	0.40%
M6	6.25%	無抑制作用	6.25%	3.13%
M7	25.00%	無抑制作用	12.50%	0.78%
M8	無抑制作用	無抑制作用	50.00%	無抑制作用
M11	0.40%	1.56%	0.40%	0.40%
M12	0.40%	3.13%	0.40%	0.40%
M23	0.40%	1.56%	0.40%	0.40%
M24	0.40%	0.40%	0.40%	0.40%

【00245】 實例18：F727植物生長特性之體外評估

【00246】 以體外實驗評估分離株F727之植物生長特性，包括溶解磷酸鹽之能力；產生ACC去胺酶、吲哚-3-乙酸(IAA)、攜鐵蛋白（CAS瓊脂）之能力；以及與甲醇生長為單一碳源（AMS瓊脂）之能力。於溴酚藍磷酸鹽瓊脂中評估磷酸鹽溶解性，ACC-去胺酶活性之評估則是採用以ACC為單一碳及氮源之瓊脂培養皿，攜鐵蛋白製造係利用CAS瓊脂進行評估，而甲基營養評估方式則是於礦物鹽瓊脂設定甲醇為唯一碳源。如表14所示，分離株F727於所有植物生長促進特性均呈正向結果。

【00247】 表14

	磷酸鹽溶解	ACC-去胺 酶	IAA	CAS 瓊脂	AMS 瓊脂
F727	+++	+++	+	++	++

【00248】 符號： +++：極強正向反應、++：正向反應、+：微弱正向反應

【00249】 實例19：F727處理後種子之活勢分析

【00250】 以1%漂白劑對玉米、大豆、小麥、稻米、高粱及番茄種子進行表面消毒六分鐘，而後用無菌水清洗五次。將種子浸沒於F727懸浮液（以10 mM硫酸鎂製備）中 24小時。使種子乾燥30分鐘，供實驗#1使用，乾燥過夜者供實驗#2使用。將種子放在濕紙巾上數天待其發芽，之後測量種子之總鮮重。

【00251】 結果示於表15，顯示芽孢桿菌分離株F727細胞可促進玉米、大豆、高粱及番茄之生長。

【00252】 表15

實驗#1			實驗#2		
總鮮重 (公克)			總鮮重 (公克)		
	對照組	F727		對照組	F727
玉米 [#]	14.06	13.81	玉米*	22.96	25.67
大豆	5.46	12.22	大豆	18.65	15.34
小麥	3.83	3.61	小麥	3.19	3.2
稻米	1.47	1.32	稻米	1.31	1.25
高粱	0.89	2	高粱	1.12	1.346
番茄	0.38	0.58	番茄	0.34	0.43

【00253】 # var. Kandy Korn

【00254】 * var. Trucker's Favorite Yellow、Boone County White及

Silver King.

【00255】 實例20：對黑麴菌之抗真菌活性

【00256】 進行沾浸實驗以評估芽孢桿菌分離株F727發酵物之全細胞液(WCB)對於收穫後水果*Aspergillus niger*之抑制效果。測試之WCB版本為無稀釋，以及用無菌水稀釋至5%、20%及50%濃度。

【00257】 將無菌青葡萄浸於各濃度之 WCB五秒，然後放置於保鮮箱中之架上。待水果乾燥後，對每一保鮮箱噴灑24次調整為 3×10^3 spore/ml 之黑麴菌接種體。添加100 ml之去離子水至各箱中果架下方以增加濕度，而後封起保鮮箱，置於室溫中培養。實驗共計兩個保鮮箱，各裝有每種處理 5 顆葡萄。以水處理為陰性對照組，市售產品 Switch為陽性對照組。

【00258】 觀察各葡萄上之菌絲覆蓋程度判定果粒之患病百分比。表16之結果顯示F727 WCB具有顯著之抗麴菌活性。

【00259】 表16. 以F727 WCB沾浸處理並生長12天後之葡萄黑麴菌疾病百分比

處理	平均 % 疾病	分類
水	71	A
5% WCB	77.5	A
20% WCB	34	B
50% WCB	20.5	BC
100% B. WCB	10	C
Switch @ 14 oz/gal	3.5	C

【00260】 實例21：於玉米上之生長 促進效果

【00261】 將玉米種子種植於盆栽混合土，所用盆體直徑為4英吋，栽種密度為每盆10顆種子。埋好種子後之盆栽於種植時及一週後分別澆淋F727全細胞液。將盆栽置於溫室中培養。每盆總計10株植物，每種處理各備9盆以供評估之用。

【00262】 生長兩週後測量總鮮重。對照組植物（澆水）之平均鮮重為 21.48 ± 4.02 g，而澆淋F727 WCB之植物其平均鮮重為 26.5 ± 3.55 g。經Minitab ANOVA Tukey判定，此等差異具有統計上之顯著性。實驗結果再次證明F727 WCB 具有促生功效。

【00263】 實例22：以F727全細胞液澆淋土壤控制萵苣之露菌病

【00264】 從種植於培養箱中之受感染植物上取下含孢子葉片，將之置於50 ml之去離子水中搖晃，以取得露菌病 (*Bremia lactucae*)孢子。之後將液體以100 μ m尼龍篩網過濾。用血球計點算過濾後液體中之孢子數量，將液

體以去離子水調整為 5×10^4 spores/ml濃度。

【00265】 於SPY 培養基中以25°C種植芽孢桿菌品種F727 24-72小時，以取得製備全細胞液 (WCB)之原料。

【00266】 將萵苣 (c.v. Celtuce)種植於2.5英吋之盆中，密度為每盆6株。植物所在之生長室設定為 16°C，12小時曝光週期。經10日之生長後，於土壤澆淋20 ml之F727 WCB。

【00267】 澆淋後一小時，將約1 ml之上述露菌病孢子懸浮液噴灑於各盆萵苣植物上。接種後之 48小時將盆栽放置於加蓋塑膠托盤上培養，之後改為以16°C 及12小時曝光週期之條件繼續培養8天。

【00268】 針對每片子葉觀察葉片表面染病比例以評估疾病嚴重度，並求得各盆植物之平均嚴重度。利用t-test方式比較處理（土壤澆淋）與未處理對照組 (UTC)植物之結果，示於表17及圖18。結果顯示以F727全細胞液澆淋之土壤中所種萵苣植物之露菌病嚴重度在統計上顯著降低 ($p=0.0036$)。

【00269】 表17：F727 WCB 土壤澆淋對萵苣露菌病感染之作用

【00270】 （兩份樣本 t-Test 假設變異相同）

	MBI-110	
	UTC	澆淋
平均疾病嚴重度 (%)	69.49306	32.125
變異	342.5953	345.2292
觀察	12	4
合併變異數	343.1597	
假設平均差異	0	
df	14	
t Stat	3.49392	
P(T<=t) 雙尾	0.003578	
t 臨界雙尾	2.144787	

【00271】 實例23：F727全細胞液 與液化澱粉芽孢桿菌 於控制黃瓜白粉病之協同作用

【00272】 以去離子水沖洗感染黃瓜葉片並用兩層紗布過濾沖洗液，藉此製得*Sphaerotheca fuliginea*接種體。

【00273】 對二真葉階段之黃瓜植物噴灑 2 ml之處理液（見以下），待其乾燥三小時，接著將2 ml之*Sphaerotheca fuliginea*接種體（濃度為 2.5×10^5 conidia/ml）刷在葉片上，完成對植物之接種。

【00274】 處理液如下（每種處理準備三份）：

【00275】 1. 水（陰性對照組）

【00276】 2. F727全細胞液（全強度）

【00277】 3. F727全細胞液（50% 強度）

【00278】 4. F727全細胞液（全強度）+ Double Nickel 55 (3 lbs./acre)

【00279】 5. F727全細胞液(50% 強度)+ Double Nickel 55 (3 lbs./acre)

【00280】 6. Double Nickel 55(3 lbs./acre)

【00281】 使F727於 SPY 培養基中生長 5天，用以製作全細胞液。

Double Nickel 55爲市售 液化澱粉芽孢桿菌製劑(Certis USA, Columbia, MD)，其具有廣泛之殺真菌活性，包括對抗白粉病之活性。

【00282】 接種後，將植物培養於約25°C之生長室十天，並透過目視評估疾病嚴重度，評估時係以葉片表面患病百分比爲依據。結果示於表18，利用Minitab 16統計軟體 (Minitab, State College, PA)分析，經計算柯比協同作用係數，評估可能具有協同作用。Colby (1967) "Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations." *Weeds*15:20-22.

【00283】 表18：F727全細胞液及與Double Nickel 55混合物於控制黃瓜白粉病之效果

處理	疾病嚴重度 (%)*	%控制 (E)	Ee [#]	E/Ee
水對照組	83.3±2.9 (A)	0.0		
MBI-110 100% WCB	77.5±8.7 (A)	7.0		
MBI-110 50% WCB	61.3±22.9 (A)	26.5		
MBI-110 100% WCB + DoubleNickel 55	25.0±0.0 (B)	70.0	0.12	5.6
MBI-110 50% WCB + DoubleNickel 55	33.6±25.0 (B)	59.5	0.32	1.8
DoubleNickel 55	78.8±13.2 (A)	5.5		

【00284】 *呈現之疾病嚴重度資料爲平均值及標準誤差。未帶有相同

字母之平均值為經Fisher之LSD 測試判斷為顯著不同者($p < 0.05$)。

【00285】[#] Ee 為根據柯比公式之預期效應 (Colby, 1967年) :
 $E_e = A + B - AB/100$, 其中A及B為個別產品之效率; 若組合之效率 (%控制, E) 高於Ee ($E/E_e > 1.0$), 即表示協同作用存在。

【00286】 表18結果顯示F727全細胞液與Double Nickel在控制白粉病上展現強大之協同效應, 全強度及半強度全細胞液之柯比協同係數分別為5.6及1.8。

【00287】 實例24：F727全細胞液滑石粉製劑促進植物生長

【00288】 滑石粉製劑之製備方式是混合乾載體 made of 滑石粉(1 kg)、羧甲基纖維素(10 g)、碳酸鈣 (15 g)及F727 全細胞液, 而後以 1:1 (w/v) 之比例調製乾載體混合料: WCB。將混合物靜置過夜使其乾燥, 而後磨細成粉。此製劑可以兩種方式施用。第一種方法是在種植時施用於土壤, 置於種子(田間玉米)下方, 此為犁溝間施用。於第二種方法中, 將滑石粉製劑溶解於水, 並用以滲調種子一夜後再行種植。以水為對照組。讓植物在溫室中生長兩週, 而後秤重。

【00289】 此等分析之結果示於表19及20。犁溝間施用使平均鮮重增加16% (表19), 而滲調使平均鮮重增加15% (表20)。因此, F727 WCB具有生長促進活性。

【00290】 表19：F727 WCB滑石粉製劑之犁溝間施用

	平均鮮重 (g)	SD	%
對照組	25.8	2.63	100
F727	30.18	1.03	116.98

【00291】 表20：用 F727 WCB滑石粉製劑進行種子滲調

	每株植物鮮重(g)	%
對照組	0.65	100
F727	0.75	115

【00292】 實例25：F727全細胞液劃分

【00293】 於一公升適合發酵培養基(SPM、SPY、TSB、V8)中以25°C 種植F727菌株48-72小時。用安伯來特XAD-7萃取一公升全細胞液，方法為將細胞懸浮液在室溫下以155 rpm之轉速搖動兩小時。以紗布濾得樹脂與細胞團，並用去離子水洗去鹽。而後將樹脂和細胞團連同紗布浸泡於丙酮中2小時，接著濾去丙酮，並在真空下利用旋轉蒸發器進行乾燥，藉此取得粗萃取物。

【00294】 以逆相C18 真空液相層析法將粗萃取物劃分為片段。在前述之劃分辦法中（實例5及圖1），發現片段 3（40-60%甲醇）及4（60-80% 甲醇）具有殺有害物活性。為最大化單一片段之活性量，修改逆相 C-18 VLC 程序，如表21所示，以提供 50-80%甲醇之版本（片段4）。之後透過如實例 5所述之C-18 HPLC辦法將化合物 A、B及C從片段4純化。

【00295】 表21：F727 安伯來特萃取物之VLC片段

片段：	洗提於：
1	20% 甲醇
2	40% 甲醇
3	50% 甲醇
4	80% 甲醇

5	100% 甲醇
6	50% 甲醇：乙腈

【00296】 實例26：經MS/MS 分析判定之化合物 A結構

【00297】 以電子噴灑離子化質譜法／質譜法 (ESIMS/MS)分析片段4之1044 MW化合物（化合物 A），藉以取得其構成胺基酸之序列。結果示於圖19。基於此等結果，判定化合物 A具有如圖20所示之環狀胜肽結構。

【00298】 實例27：化合物與VLC片段之殺細菌活性

【00299】 將*Erwinia carotovora*、*Pseudomonas syringae*、*Xanthomonas arboricola*、*Acidovorax avenae subsp. citrulli* 及 *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* were plated on 洋芋葡萄糖瓊脂。累積充份之生物量後，於每種病原體培養皿中各取出一圈病原體，使其懸浮於無菌水中。將每種懸浮液100 uL刮入洋芋葡萄糖瓊脂培養皿，並放置10-15分鐘使其吸收入培養皿中。

【00300】 實例25之VLC片段 4及 5，以及實例25中取自VLC片段4之化合物 A (MW=1044)、B (MW=1058)及C (MW=1072) 以5mg/mL之濃度製成甲醇樣本，並用水製做各樣本五組之兩倍依序稀釋版本（0.15625 mg/mL 與 5 mg/mL間之濃度，以兩倍濃度增額）。將無菌濾紙盤放置於瓊脂培養皿中，並於濾紙盤上放置20 uL之各樣本。將培養皿於 25°C培養3天，而後觀察濾紙盤周圍生長區域之抑制現象，藉以得知病原體對樣本之易感性。若觀測得抑制作用，則判定展現抑菌活性之最低樣本濃度。結果示於表21。片段4及 5對*Erwinia caratovora* 及*Clavibacter michagensis*具有抑菌活性，而化合物 A及B可抑制*Acidovorax avenae*之生長。

【00301】 表21：最小濃度樣本抑制病原體生長

病原體	化合物 A	化合物 B	化合物 C	片段 4	片段 5
<i>Erwinia carotovora</i>	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用	1.25 mg/mL	1.25 mg/mL
<i>Pseudomonas syringae</i>	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用
<i>Xanthomonas arboricola</i>	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用
<i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i>	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用	2.5 mg/mL	0.15625 mg/mL
<i>Acidovorax avenae subsp. citrulli</i>	5 mg/mL	5 mg/mL	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用

【00302】 實例28：化合物與VLC片段之殺真菌活性

【00303】 將實例25中VLC片段4及5，以及實例25中取自VLC片段4之化合物 A (MW=1044)、B (MW=1058)和 C (MW=1072) 以5mg/mL之濃度製成甲醇樣本。在48孔盤中製備各樣本之不同稀釋版本。各受測樣本最高濃度為500 $\mu\text{g/mL}$ (原始濃度之10%)，之後將樣本連續以兩倍水之增額量稀釋至3.9062 $\mu\text{g/mL}$ 之濃度。將100 μL 之稀釋後樣本加入各孔，接著加入200 μL 之1.5X 洋芋葡萄糖瓊脂 (PDA)，並使混合物靜置固化10-15分鐘。

【00304】 將 *Colletotrichum cereale*、*Fusarium oxysporum*、*Botrytis*

*cinerea*及*Verticillium dahliae*放置於PDA並在室溫中培養直到菌絲生長覆蓋整個培養皿為止。在各盤中加入無菌水，並用無菌抹刀取出菌絲和孢子。過濾漿狀物以將菌絲與孢子分開。用血球計數算孢子數量，並用水稀釋以調整至 $10^3 - 10^4$ spores/ml之濃度。

【00305】 *Phytophthora capsici*放置於PARP瓊脂並使其於室溫中成長，直到可觀察到菌絲生長為止。在盤中加入無菌水，並用抹刀取出孢子。使培養皿在Convicon室中以16°C培養1-2小時，直到孢子囊釋放出游走芽孢為止。之後將孢子收集於管中，以血球計計數，並加水調整孢子懸浮液之濃度至 10^3 - 10^4 spores/ml。

【00306】 將各病原體50 μ L之孢子溶液接種至各樣本孔中。以25°C 之溫度將培養皿培養4-5天，之後觀察各孔中之孢子發芽抑制現象，以得知病原體對樣本之易感性。若觀測得抑制作用，則判定展現抑菌活性之最低樣本濃度。結果示於表22。

【00307】 表22：可抑制孢子發芽之樣本最低濃度

病原體	化合物 A	化合物 B	化合物 C	片段 4	片段 5
<i>Botrytis cinerea</i>	500 μg/mL	250 μg/mL	62.5 μg/mL	125 μg/mL	無抑制作 用
<i>Phytophthora capsici</i>	無抑制作 用	無抑制作 用	無抑制作 用	無抑制作 用	無抑制作 用
<i>Fusarium oxysporum</i>	500 μg/mL	500 μg/mL	500 μg/mL	500 μg/mL	無抑制作 用
<i>Verticillium dahliae</i>	500 μg/mL	125 μg/mL	125 μg/mL	125 μg/mL	無抑制作 用
<i>Colletotrichum cereale</i>	125 μg/mL	62.5 μg/mL	31.25 μg/mL	62.5 μg/mL	無抑制作 用

【00308】化合物 A、B 及 C 與片段 4 可抑制除番椒疫病菌 (*Phytophthora capsici*) 以外所有受測真菌病原體之孢子發芽。化合物 C 及片段 4 展現最高之抑菌活性。

【00309】在此說明與請求保護之發明並不受在此所述特定觀點之限制，該等觀點僅為說明本發明之用。任何均等觀點均應屬於本發明之範疇。除此處所述者外，本發明之其他各種修改均為熟悉此技藝人士參照上述說明而可輕易知悉。此等修改亦屬所附申請專利範圍之範疇。若有牴觸，應以本說明書揭露之定義為準。

【00310】本說明書中所提及之各參考文獻其整體於此合併參照。

【符號說明】

【00311】

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

以下生物材料已依據布達佩斯條約寄存於美國農業研究菌種保藏中心 (NRRL)，該中心地址為1815 N. University Street, Peoria, Illinois 61604, USA，且其寄存號碼如下：

寄存物	編號	寄存日期
芽孢桿菌品種F727	NRRL B-50768	2012年8月1日

【序列表】(請換頁單獨記載)

F727 FD1 16S序列：

TATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGG
GATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGC
ATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACC
CGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTC
GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCTGAATA
GGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGAGT
GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACT
GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGGTTTCCG
CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC
GGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCNAGAACCTTACCAN
GTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGG
GCAGAGTGACNNNGGNGCATGGNNGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT

GTTGGGTAAGTCCCGCACNAGCGCAACCCNTTGATCTTANTTGCCAG
CATTCANTTGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNACTGCCNNNACNANCCGNNNAA
GGNNNGGGNATNACGTNNANNNATNCNNGCCCNNNNNTGACNNNNNN
CACNCCNNNNNNNNNNNNANNGNNNNNNNAANNANNGGGNCNNNNNGN
NNNNNAAANNNCNNNNCNCNNNNNGNGNN (SEQ ID NO:1)

F727 RD1 16S序列：

TCATCTGTCCCACCTTCGGCGGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCG
ACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAA
GGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCG
ATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAAGTGA
ACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTT
CTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGGCATGATGA
TTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACACCGGCAGTCACCTT
AGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCG
TTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCA
TGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGA
TTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAA
TTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTG
AGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTTAATGCGT
TAGCTGCAGCACTAAGGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCAT
CGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCC
ACGCTTTCGCTCCCTCAGCGTCAGTTACAGACCCAGAGAGTCGCCTTC
GCCCCACTGGTGTTCTCCTCCACATCCTCTACGCATTTACCCGGCTACA

ACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCCAGTTTCC
AATGACCCCTCCCCGGTTGAGCCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAA
GAAACCCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTCCGGACACGCTTG
GCCACCTACGTATTACCGCGCTTGCTTGGCACGTTAGTAGCCGTGGCT
TTTCTGGTTAGTTAACCGTCAGTGCCGCCTATTCGGAACGGTACTTGTT
CTTCCCTACACAGAGCTTTACGATCGAACTCATCACCTCCACGCGCG
TGCTCGTCAGAACTTTCGTCATGCGAAGATCCTACTGCTGCCTCCGTA
GGGTTGGCGTTTCTCTCAGTCCAGTGGCCATACGTCAGTAGCTACCCA
TCGTGCCTAGTGAGCGTTACCTCACCCACCTAGGC (SEQ ID NO:2)

F727 保留16S序列：

TATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGG
GATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGC
ATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACC
CGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAAGGCAACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTC
GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCTGAATA
GGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCCAAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGGTTTCTTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCCCGGGCTCAACCGGGGAGGGGTCATTGGAAACTGGGGAAAC

TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTTGTAGCCGGGTGAA
 ATGCGTAGAGGATGTGGAGGAACACCAGTGGGGCGAAGGCGACTCTC
 TGGGTCTGTAACTGACGCTGAGGGAGCGAAAGCGTGGGGGAGCGAA
 CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAACGATGAGTGCTAA
 GTGTTAGGGGGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAAGC
 ACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTG
 ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA
 CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGAT
 AGGACGTCCCCTTCGGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTG
 TCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
 CCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
 CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGG
 GCAGCGAAACCGCGAGGTAAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGT
 TCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT
 AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
 CACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAG
 GTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGA (SEQ ID
 NO:3)

F727正向recA序列:

AACATTCGGCAAGGTTCCATCATGAAACTCGGGGAAAAGACGGATAC
 AAGAATTTCAACAGTTCCGAGCGGTTCCTTGCACTTGATAACCGCTCT
 CGGAATAGGCGGATACCCGCGCGGACGGATTATTGAAGTATACGGACC

TGAAAGCTCAGGTAAAACGACTGTAGCGCTTCATGCGATTGCTGAAG
TTCAGGAGAAAGGCGGACAAGCCGCATTTATTGATGCTGAGCATGCC
CTTGACCCTGTTTACGCGCAAAAGCTCGGTGTAAATATTGAGGAGCTG
CTGCTTTCTCAGCCTGATACGGGAGAGCAGGCGCTTGAGATTGCCGA
AGCGCTGGTACGAAGCGGAGCCGTCGATATCGTAGTTGTCGACTCTGT
TGCGGCGCTTGTCCTCGAAAGCTGAAATCGAAGGAGACATGGGGGATT
CCCACGTCGGTTTGCAGGCCCGTTTGATGTCTCAAGCGCTCCGTAAGC
TTTCCGGTGCCATCAATAAATCTAAAACAATCGCAATCTTTATTAACCA
AATTCGTGAAAAAGTCGGCGTTAGGGTCGGAAAAAA (SEQ ID NO:8)

F727 反向recA序列:

GTATAAGATTGCGATTGTTTTAGATTTATTGATGGCACCGGAAAGCTTA
CGGAGCGCTTGAGACATCAAACGGGGCCTGCAAACCGACGTGGGAATC
CCCCATGTCTCCTTCGATTTTCAGCTTTCGGGACAAGCGCCGCAACAGA
GTCGACAACCTACGATATCGACGGCTCCGCTTCGTACCAGCGCTTCGGC
AATCTCAAGCGCCTGCTCTCCCGTATCAGGCTGAGAAAGCAGCAGCT
CCTCAATATTTACACCGAGCTTTTGCGCGTAAACAGGGTCAAGGGCAT
GCTCAGCATCAATAAATGCGGCTTGTCCTCGCCTTTCTCCTGAACTTCAG
CAATCGCATGAAGCGCTACAGTCGTTTTACCTGAGCTTTCAGGTCCGT
ATACTTCAATAATCCGTCCGCGCGGGTATCCGCCTATTCCGAGAGCGGT
ATCAAGTGCAAGGGAACCGCTCGGAACTGTTGAAATTCTTGTATCCGT
CTTTTCCCCGAGTTTCATGATGGAACCTTTGCCGAATTGTTTTTCTATT
TGCTTAAGAGCCATATCWAAGRCTGWAWTRAMRATCAA (SEQ ID
NO:9)

F727保留recA序列:

AAGGTTCCATCATGAAACTCGGGGAAAAGACGGATACAAGAATTTCA
 ACAGTTCCGAGCGGTTCCCTTGCACTTGATACCGCTCTCGGAATAGGC
 GGATACCCGCGCGGACGGATTATTGAAGTATACGGACCTGAAAGCTCA
 GGTA AACGACTGTAGCGCTTCATGCGATTGCTGAAGTTCAGGAGAA
 AGGCGGACAAGCCGCATTTATTGATGCTGAGCATGCCCTTGACCCTGT
 TTACGCGCAAAAGCTCGGTGTAAATATTGAGGAGCTGCTGCTTTCTCA
 GCCTGATACGGGAGAGCAGGCGCTTGAGATTGCCGAAGCGCTGGTAC
 GAAGCGGAGCCGTCGATATCGTAGTTGTCGACTCTGTTGCGGCGCTTG
 TCCCGAAAGCTGAAATCGAAGGAGACATGGGGGATTCCCACGTCGGT
 TTGCAGGCCCGTTTGATGTCTCAAGCGCTCCGTAAGCTTTCCGGTGCC
 ATCAATAAATCTAAAACAATCGCAATCTT (SEQ ID NO:10)

F727 Reverse phoR序列:

TCGTTGTCTGTATCATATTGGTTTTTCAGTGTTCTCGGCCTTTTCTTGCAG
 CAGCTCATTTCTTCATCCGCCAAGGAAAGAACGGAGGGACAGCTTGA
 AAAGGAAGCCGCATACATAGCCGGACTCCTTGACGCCGGCCAAGTAA
 ACAATAAAAGAAACGAAACGGTCATTAAAGATGCCAGCCGTACATTA
 GATATCGACGTGTCCGTATTAAATGAAAAAGGCCGCGGTTTATATCACT
 CAGGCAGACGCGCTGATGACTCGGCTATAAAGGAATTCGTCTCCCGTA
 ATAAAAATGCGGCGGCGATTTCAGAACGGAGAGAAAGTATGGCATGGA
 ACGGCCCTTAAAAACGCCGCCGGCCAAACGGCGGGGATATGTGCTCGT
 TTCCTCGCGGATCGATAAAGGTTTCGAATATAACAGGGGAAATGTGGGG

CATGCTGGCTGCAAGCCTTTGTACTGCTTTTATTATTATCGTTTTCTTCT
ATACGAATATGACCTCCCGTTACAAAAGGTCAATCGACTCCGCGACAA
AAGTGGCCACTGAGCTGTCTAAGGGGAACTATGACGCCCCGCTCCTAC
GGCGGGTACGCAAGACGCTCAGACCGTCTCGGGCGCGCTATGAACAG
CCTCGCTGTGGATTTGATGGAAATGACGAGAACGCAGGATATGCAGC
GCGACCGCCTGCTGACCGTCATCGAAAATATCGGATCAGGTTTGATT
TAATAGACGGGAGAGGCTTTATTAATCTCGTGAACAGGTCGTATACGA
AGCAGTTCCATACAAATCCTGAACGTCTGCTTCGGCGTCTCTACCATG
ACGCATTTGAGCATGAGGAAATCATTCGGCTGGTCGAAGACATCTTTA
TGACAGAAACGAAGAAACGCCAGCTGCTCACGCTTCCCATCAAAATC
GAACGGCGCTATTTTGAGGTTGACGGCGTCCCGATTATGGGCCCTGAC
GATGAATGGAAAAGGCATTGTTCTCGTGTTTCATGATATGAC(SEQ ID
NO:13)

申請專利範圍

1.一種芽孢桿菌 (*Bacillus*)品種之實質純種培養物，其係具有以下特性：

(A)至少以下一者：

(1)一核苷酸序列，其具有至少與SEQ ID NO:3所列16SrRNA序列99.5%之同一性；

(2)一核苷酸序列，其具有至少與SEQ ID NO:10所列*recA*序列95%之同一性；以及

(3)一核苷酸序列，其具有至少與SEQ ID NO:13所列*phoR* 序列90%之同一性；

(B)殺有害物活性；

(C)抗卡那黴素 (Kanamycin)、氯黴素 (Chloramphenicol)、氨比西林 (ampicillin)、青黴素 (penicillin)、頭孢呋肟 (cefuroxime)、達比黴素 (piperacillin)、四環素(tetracycline)；

(D)具有鹼性磷酸酵素、酯酵素、酸性磷酸酵素、萘酚-AS-BI-磷酸水解酶活性；以及

(E)對脊椎動物無致病性。

2.如申請專利範圍第1項所述之培養物，其中該品種具有至少一種芽孢桿菌品種F727 (NRRL Accession No.B-50772)之鑑別特性。

3.一種取自申請專利範圍第1項所述之培養物之濾液、表層浮質、萃取物、細胞片段或全細胞液。

4.一種化合物，其係選自由以下項目所構成之群組：

(a)一化合物 A，其

(i)可取自芽孢桿菌分離株F727；

(ii)具有殺有害物活性；

(iii)經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1020-1060，且更具體為1044；

(iv)¹H NMR值為 δ 7.15, 6.72, 4.81, 4.70, 4.65, 4.40, 4.35, 4.25, 4.15, 3.85, 3.65, 3.50, 3.22, 2.85, 2.80, 2.65, 2.45, 2.35, 2.30, 2.20, 1.95, 1.55, 1.31, 1.20及 0.85；

(v)利用一以水與乙腈(CH₃CN)調製之梯度溶劑系統(0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈)，設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-12分鐘，更具體為約8分鐘，且又更具體為約8.31分鐘；

(vi)隨選性包含47個碳原子、72個氫原子、12個氮原子，以及15個氧原子；以及

(vii)隨選性為一包含穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）之胜肽；

(b)一化合物 **B**，其

(i)具有殺有害物活性；

(ii)經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1030-1080，且更具體為1058；

(iii)利用一以水與乙腈(CH₃CN)調製之梯度溶劑系統（0-20分鐘90 - 0 %水乙

腓；20-24分鐘100%乙腓；24-27分鐘0 - 90 %水乙腓；27-30分鐘90%水乙腓），設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-14分鐘，更具體為約8分鐘，且又更具體為約8.67分鐘；

(iv)隨選性包含48個碳原子、74個氫原子、12個氮原子，以及15個氧原子；以及

(v)隨選性為一包含穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）之胜肽；以及

(c)一化合物C，其

(i)具有殺有害物活性；

(ii)經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1050-1120，且更具體為1072；

(iii)利用一以水與乙腓(CH_3CN)調製之梯度溶劑系統（0-20分鐘90 - 0 %水乙腓；20-24分鐘100%乙腓；24-27分鐘0 - 90 %水乙腓；27-30分鐘90%水乙腓），設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-14分鐘，更具體為約9分鐘，且又更具體為約9.19分鐘；

(iv)隨選性包含49個碳原子、76個氫原子、12個氮原子，以及15個氧原子；以及

(v)隨選性為一包含穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）之胜肽。

5.一種組成物，其係包含：

(a)一第一物質，係選自由以下項目所構成之群組：

(i)如申請專利範圍第1項所述之培養物；

(ii)如申請專利範圍第1項所述之培養物之細胞片段；

(iii)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之表層浮質；

(iv)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之濾液；

(v) (i)、(ii)、(iii)及(iv)中任一者之萃取物；

(vi)產自如申請專利範圍第1項所述之培養物之代謝物；

(vii)化合物A；

(viii)化合物B；

(ix)化合物C；以及

(b)隨選性結合以下至少一者：

(i)一第二物質，其中該第二物質係化學性或生物性農藥、一植物生長促進劑、一抗植物致病劑及一肥料中之一或多者；以及

(ii)一載體、稀釋液、界面活性劑或輔藥中之至少一者。

6.如申請專利範圍第5項所述之組成物，其中該第二物質係一化學性或生物性農藥。

7.如申請專利範圍第5項所述之組成物，其中該組合係一組成物。

8.一種用以調控一植物中有害物侵擾之方法，其係包含對該植物及／或其種子及／或用以種植該植物之基質施加一用量之組成物，該組成物係選自由以下項目所構成之群組：

(a)如申請專利範圍第1項所述之培養物；

(b)如申請專利範圍第1項所述之培養物之細胞片段；

(c)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之表層浮質；

(d)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之濾液；

(e) (a)、(b)、(c)及(d)中任一者之萃取物；

(f)產自如申請專利範圍第1項所述之培養物之代謝物；

(g)化合物A；

(h)化合物B；以及

(i)化合物C；

其中該用量係可有效調控該有害物侵擾。

9.如申請專利範圍第8項所述之方法，其中該有害物係一真菌或一細菌。

10.如申請專利範圍第9項所述之方法，其中該真菌係選自由以下項目所構成之群組：麴菌(*Aspergillus*)、鏈格菌(*Alternaria*)、盤梗黴菌(*Bremia*)、白粉菌(*Sphaerotheca*)、炭疽菌(*Colletotrichum*)、鐮胞菌(*Fusarium*)、蠟蚧輪枝菌(*Verticillium*)、葡萄孢菌(*Botrytis*)、核盤菌(*Sclerotinia*)、白絹菌(*Sclerotium*)、絲核病菌(*Rhizoctonia*)及雙孔孢菌(*Bipolaris*)。

11.如申請專利範圍第10項所述之方法，其中該組成物抑制孢子發芽。

12.如申請專利範圍第9項所述之方法，其中該細菌係選自由以下項目所構成之群組：芽孢桿菌(*Bacillus*)、歐文氏菌(*Erwinia*)、斑點病菌(*Acidovorax*)及棒狀桿菌(*Clavibacter*)。

13.如申請專利範圍第8項所述之方法，其中該有害物為疫菌(*Phytophthora*)。

14.如申請專利範圍第9項所述之方法，其中該組成物進一步包含一農藥。

15.如申請專利範圍第14項所述之方法，其中該有害物為一真菌且該農藥係選自由以下項目所構成之群組：虎杖(*Reynoutria sachalinensis*) 萃取物、

Regalia[®] 及Double Nickel 55[™]。

16.一種用以調控一植物生長及／或一種子發芽之方法，該方法包含使該植物、其生長基質，及／或該植物之一種子接觸一用量之組成物，該組成物係選自由以下項目所構成之群組：

- (a)如申請專利範圍第1項所述之培養物；
- (b)如申請專利範圍第1項所述之培養物之細胞片段；
- (c)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之表層浮質；
- (d)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之濾液；
- (e) (a)、(b)、(c)及(d)中任一者之萃取物；
- (f)產自如申請專利範圍第1項所述之培養物之代謝物；
- (g)化合物A；
- (h)化合物B；以及
- (i)化合物 C；

其中該用量係可有效調控該該植物之生長及／或該種子之發芽。

17.如申請專利範圍第16項所述之方法，其中該組成物進一步包含一生長促進劑、一界面活性劑、一載體、一輔藥，及／或一肥料。

18.如申請專利範圍第16項所述之方法，其中該組成物係一滑石粉製劑。

19.一種組成物用於配製一殺有害物及／或植物生長促進組成物之用途，其中該組成物係選自由以下項目所構成群組中之一或多者：

- (a)如申請專利範圍第1項所述之培養物；
- (b)如申請專利範圍第1項所述之培養物之細胞片段；
- (c)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之表層浮質；

(d)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之濾液；

(e) (a)、(b)、(c)及(d)中任一者之萃取物；

(f)產自如申請專利範圍第1項所述之培養物之代謝物；

(g)化合物A；

(h)化合物B；以及

(i)化合物 C。

20.如申請專利範圍第19項所述之用途，其中該殺有害物或植物生長促進組成物進一步包含一第二物質，該第二物質係選自以下項目構成群組中之一或多者：

(a)一農藥；

(b)一植物生長促進劑；

(c)一載體；

(d)一輔藥；

(e)一界面活性劑；

(f)一肥料；以及

(g)一抗植物致病劑。

21.如申請專利範圍第20項所述之用途，其中該農藥係選自由以下項目所構成之群組：一殺細菌劑、一殺真菌劑及一殺線蟲劑。

22.如申請專利範圍第21項所述之用途，其中該農藥係選自由以下項目所構成之群組：虎杖萃取物及Regalia[®]。

圖式

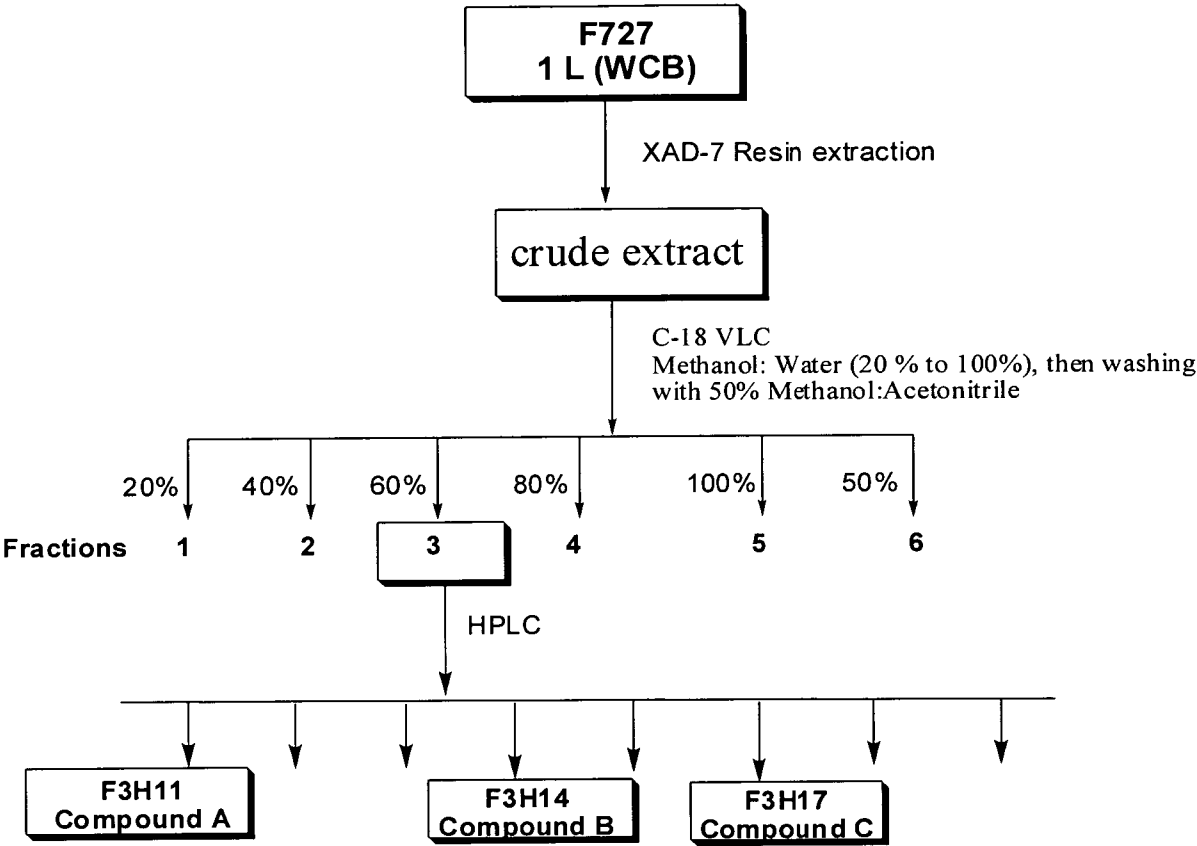


圖 1



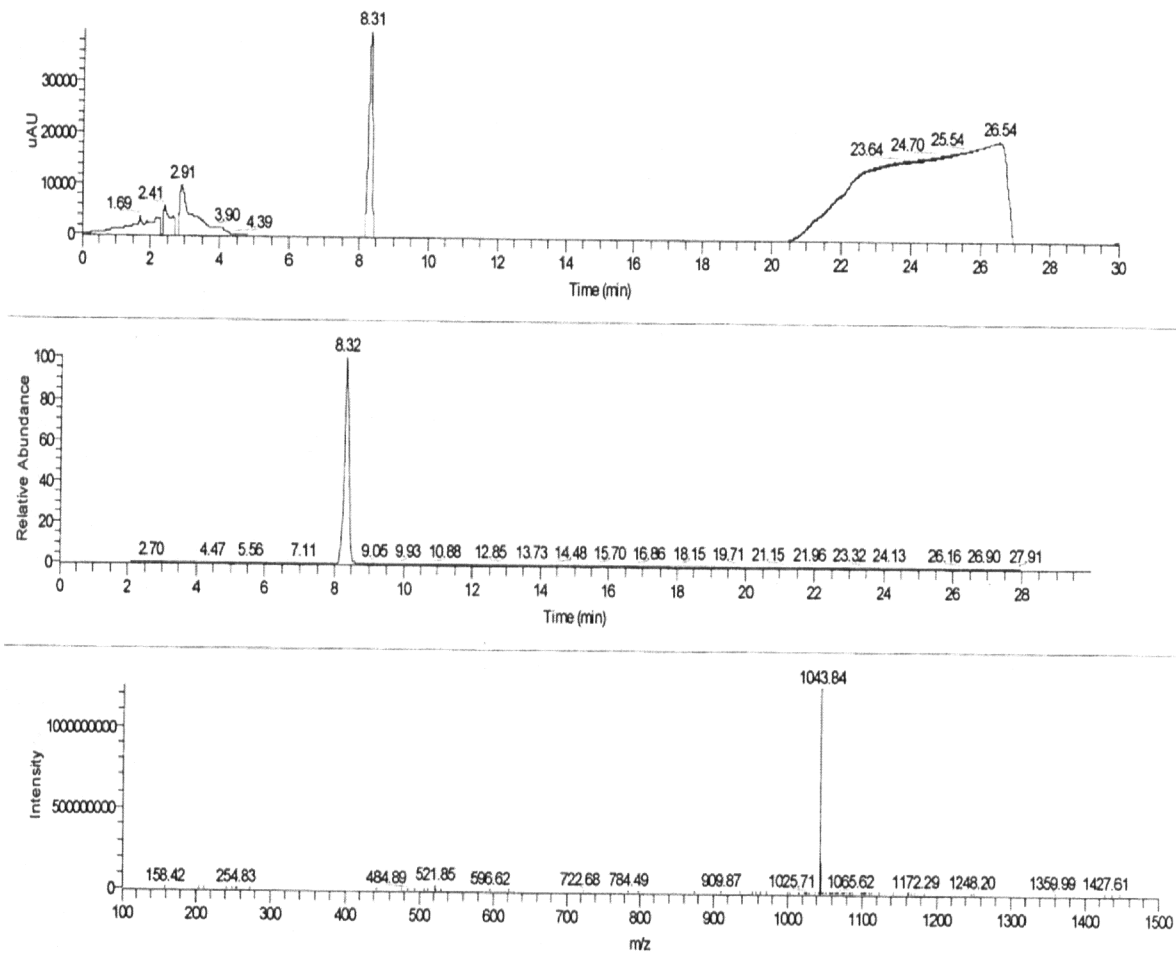


圖 2

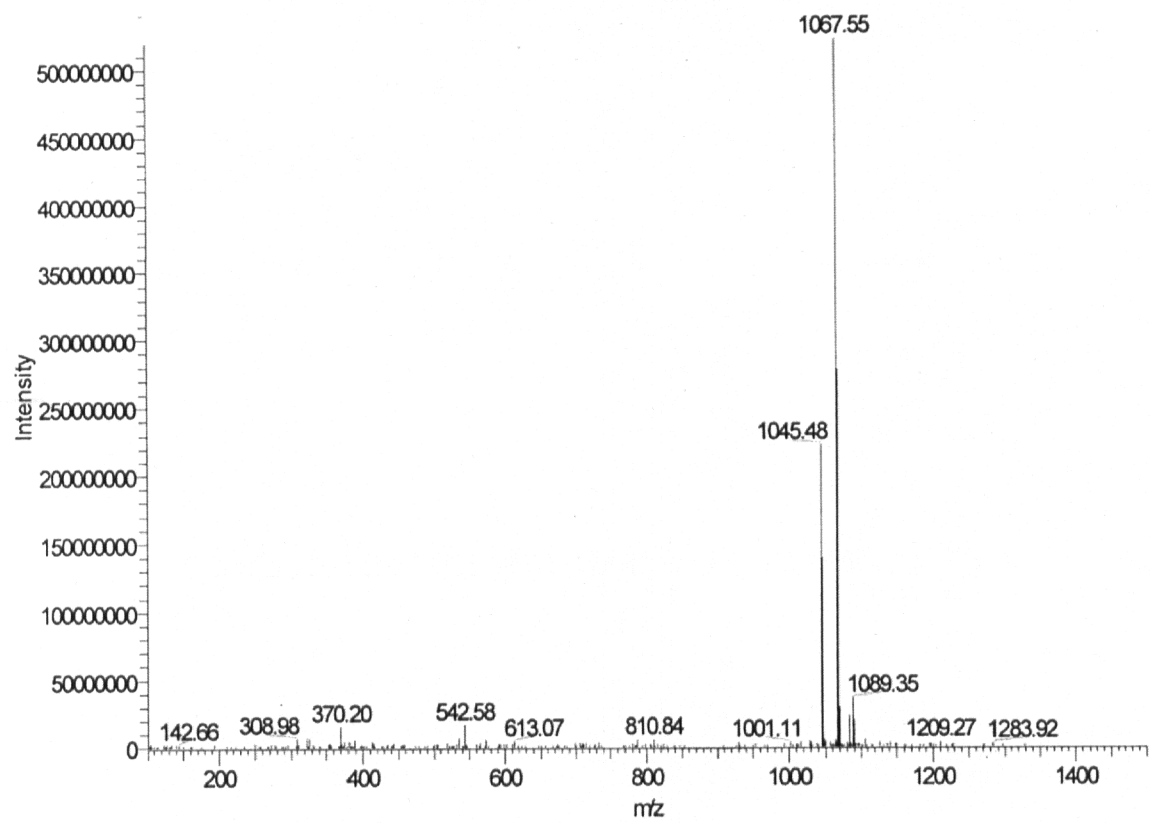


圖 3

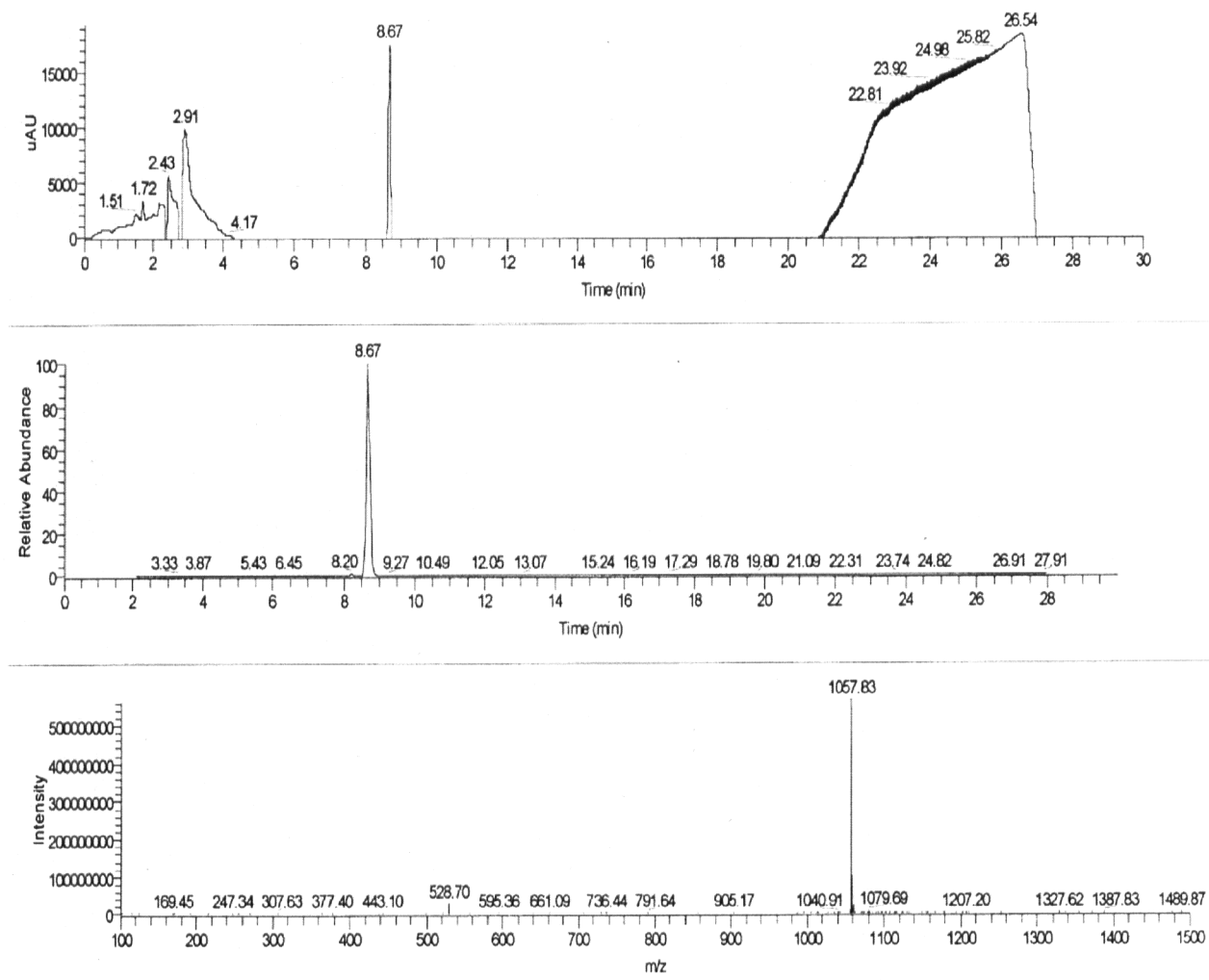


圖 4

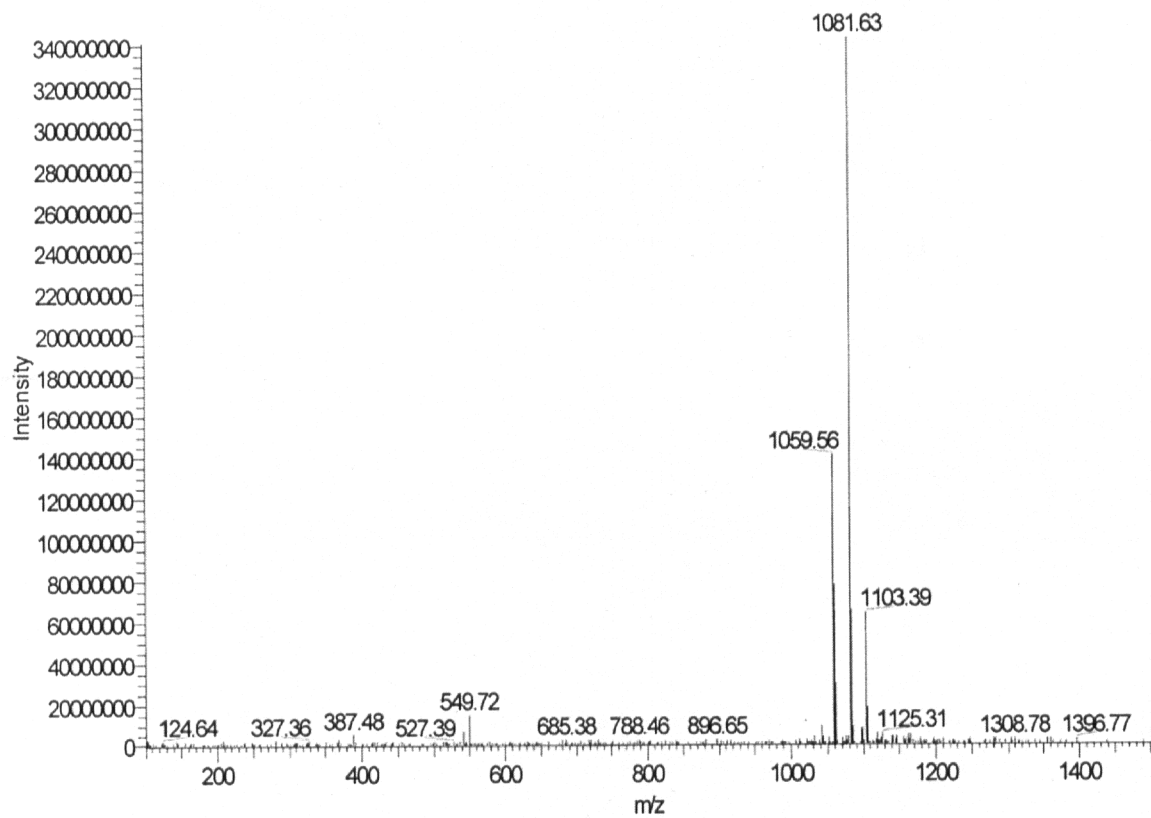


圖 5

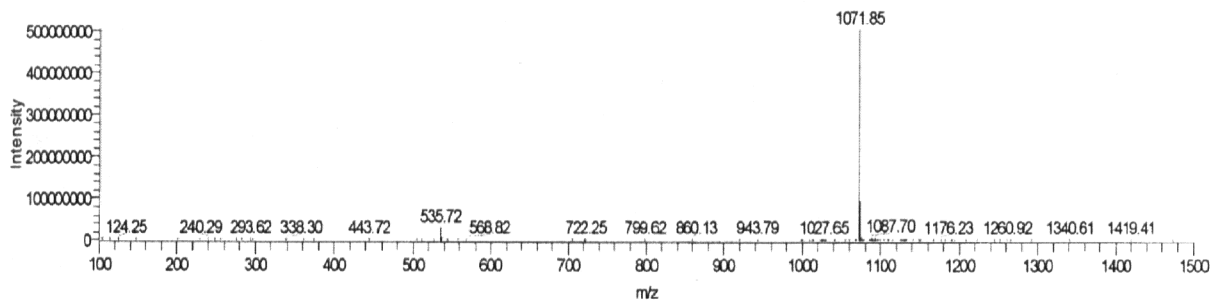
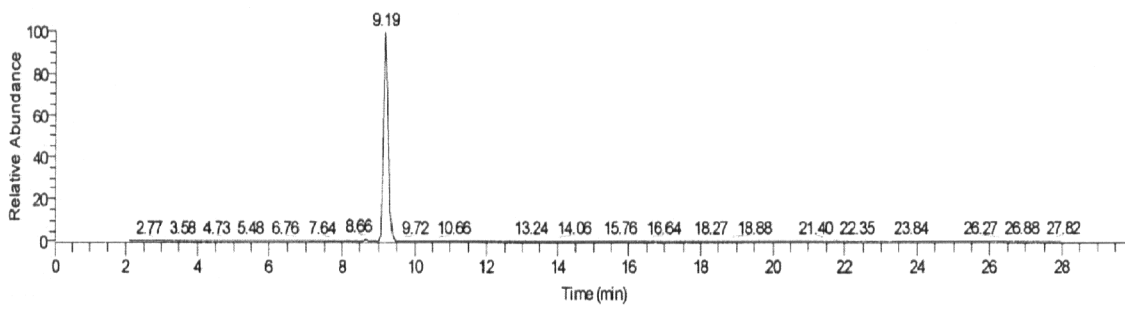
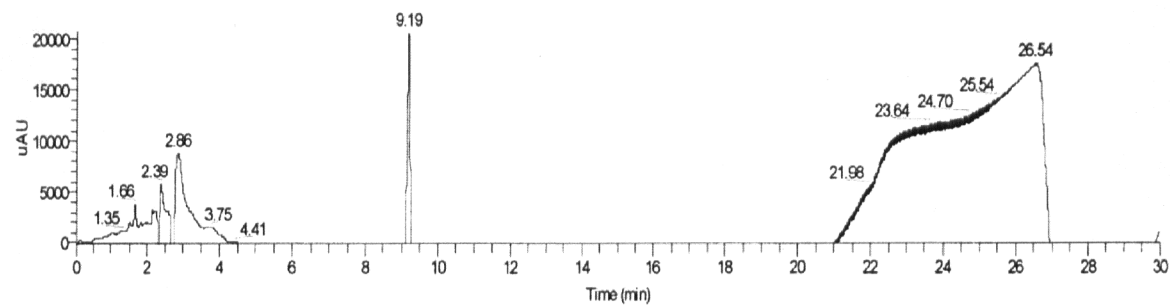


圖 6

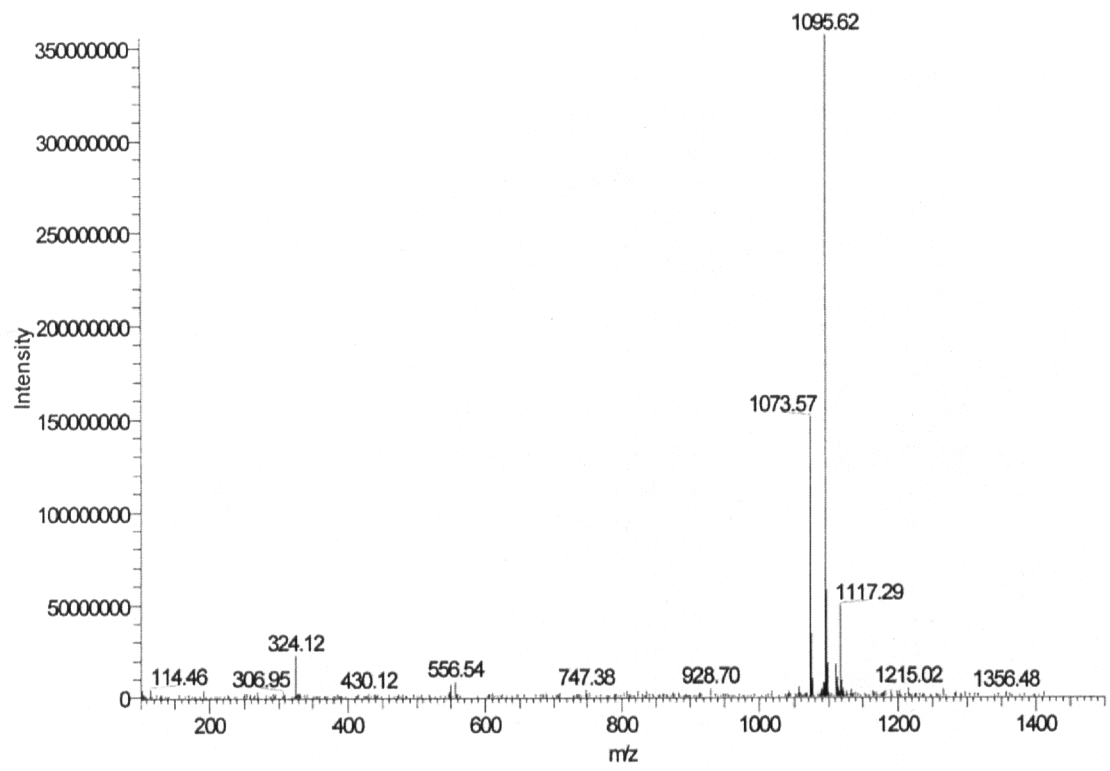


圖 7

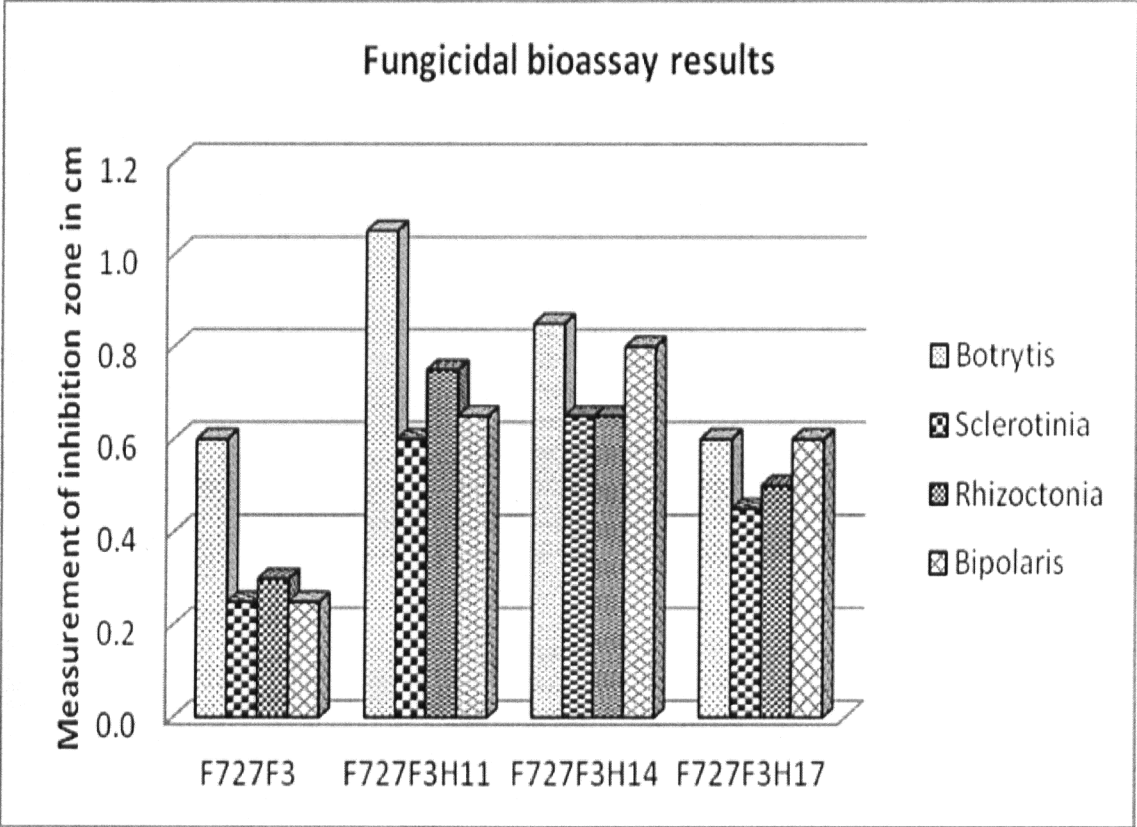


圖 8

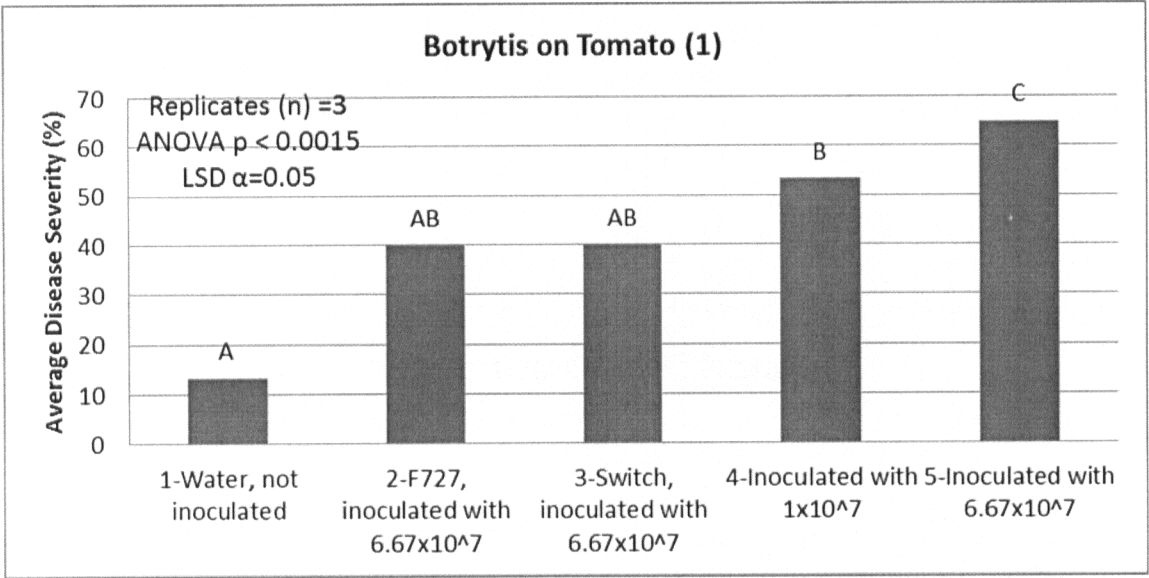


圖 9

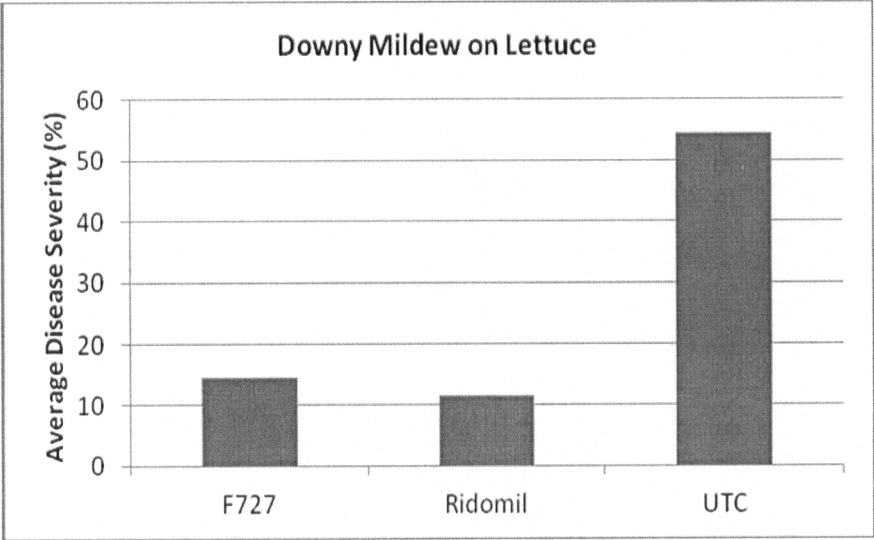


圖 10

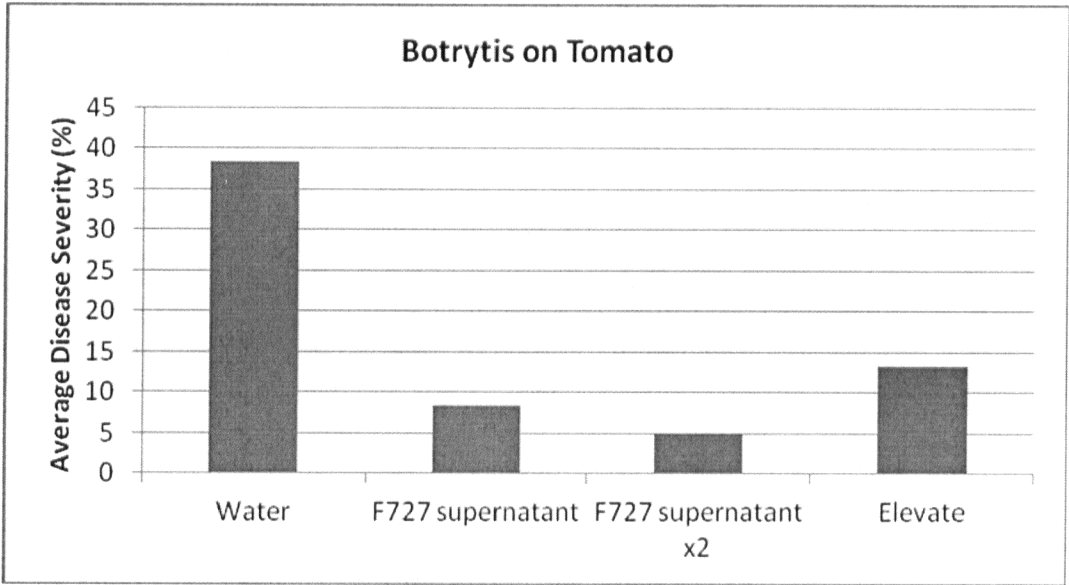


圖 11

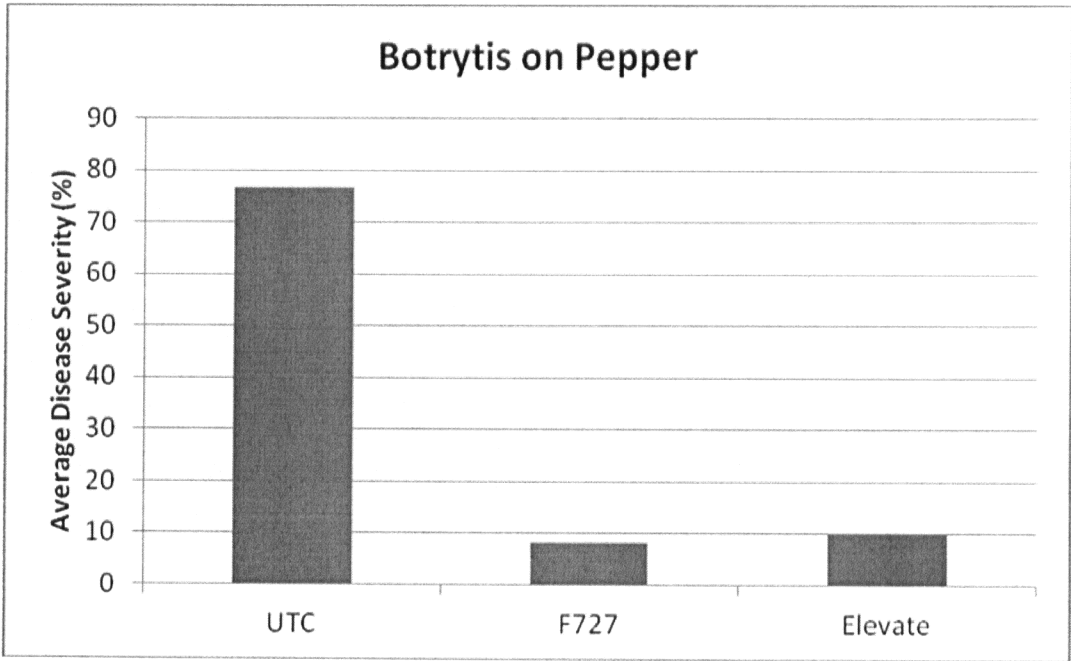


圖 12

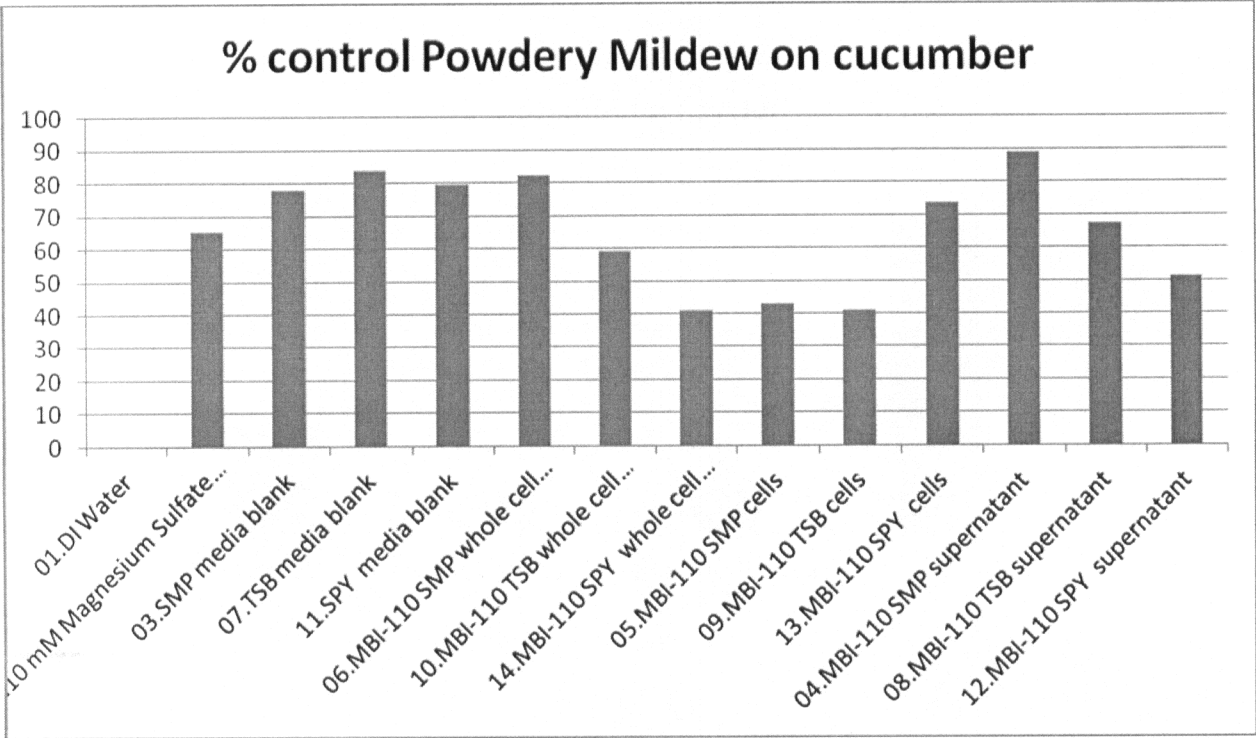


圖 13

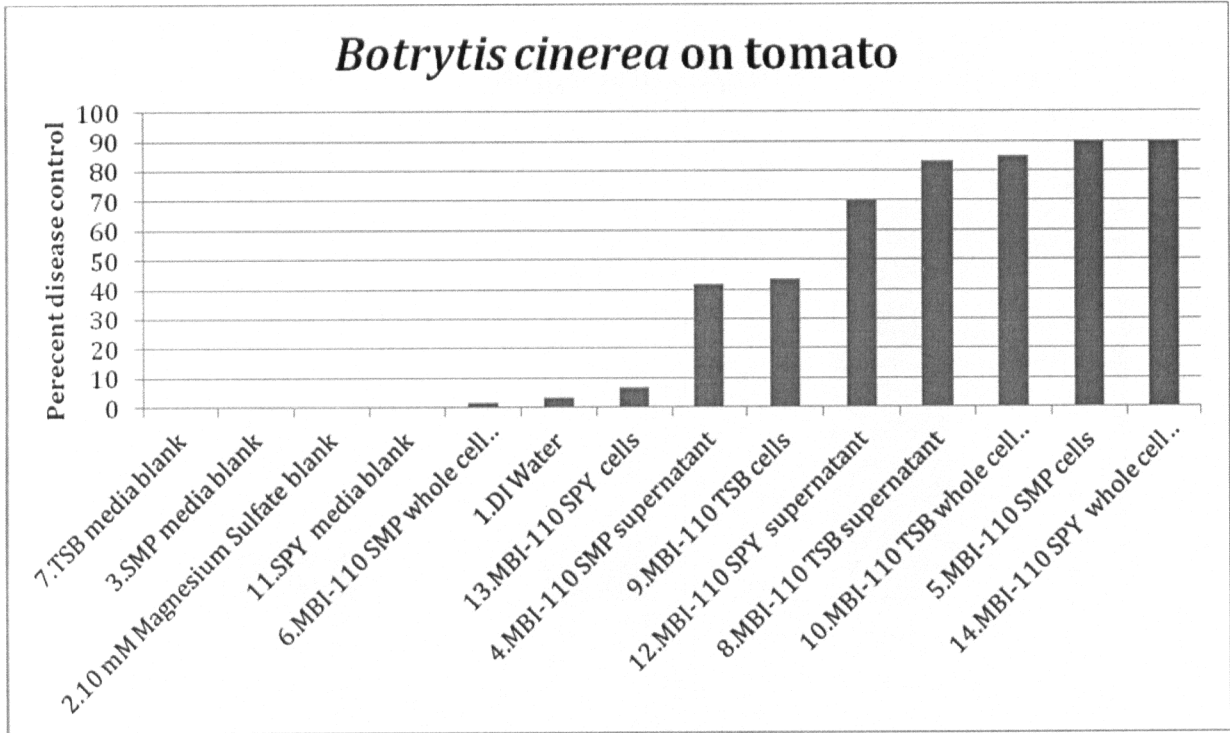


圖 14

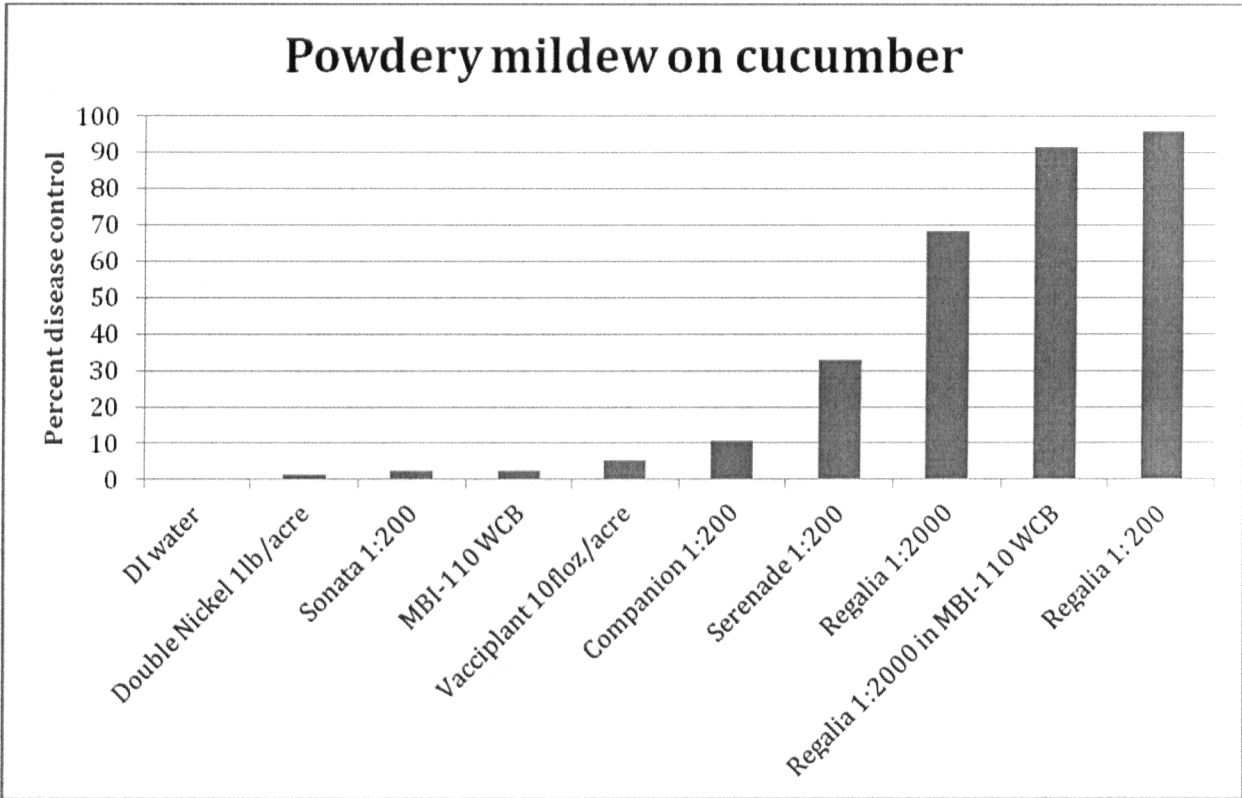


圖 15

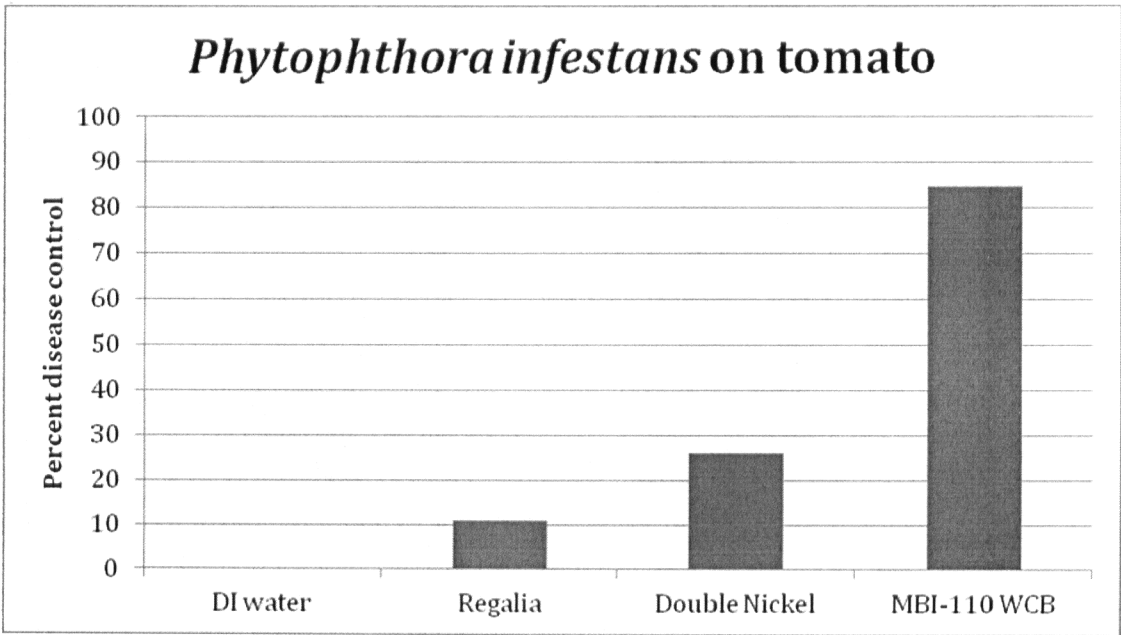


圖 16

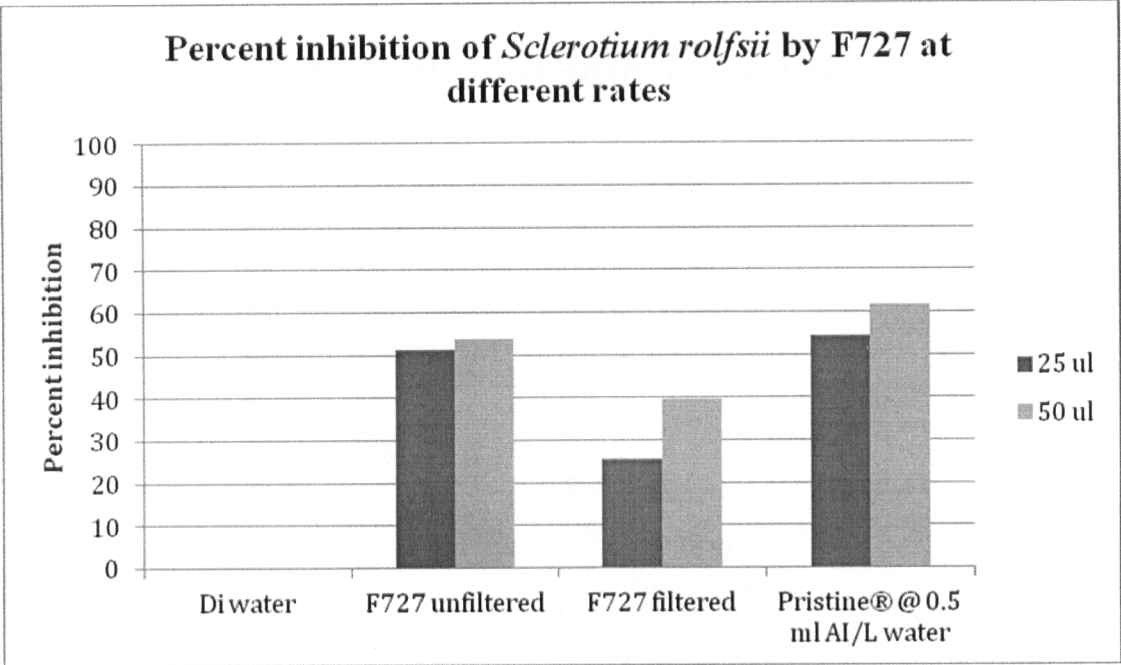


圖 17

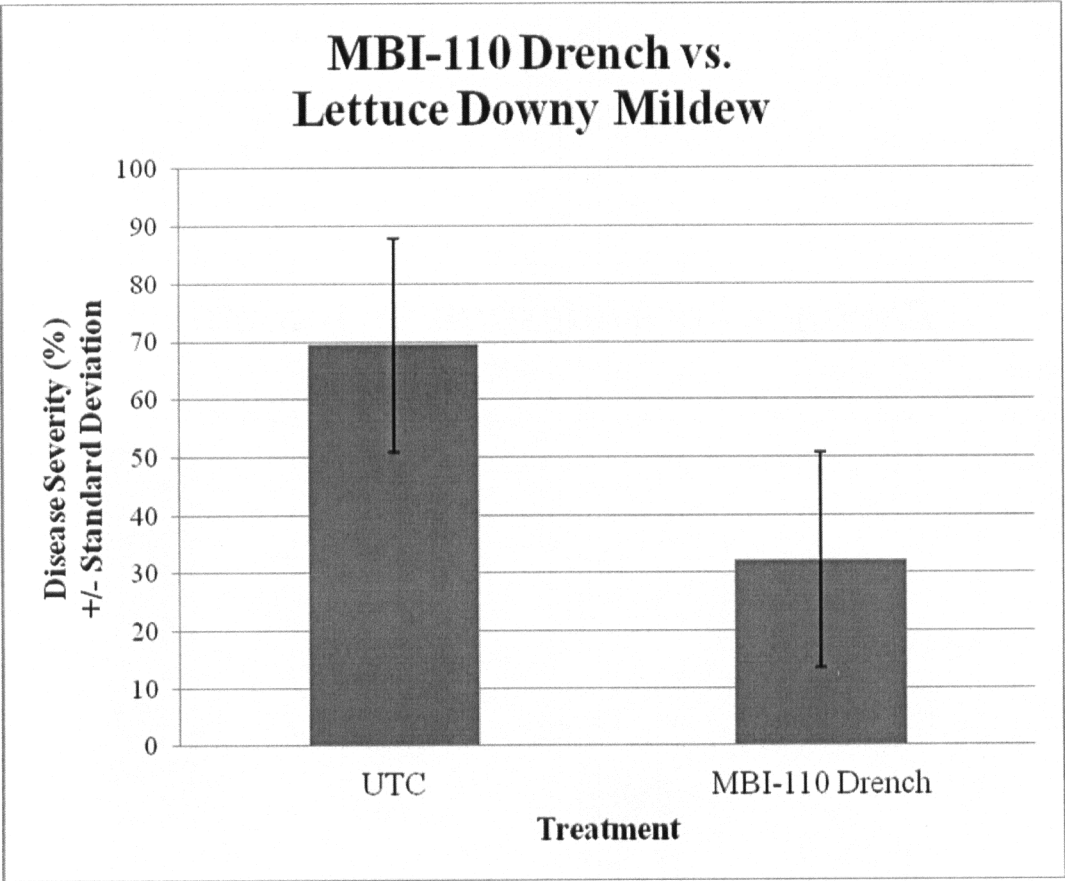


圖 18

F4H11 (MW 1044) MS/MS analysis

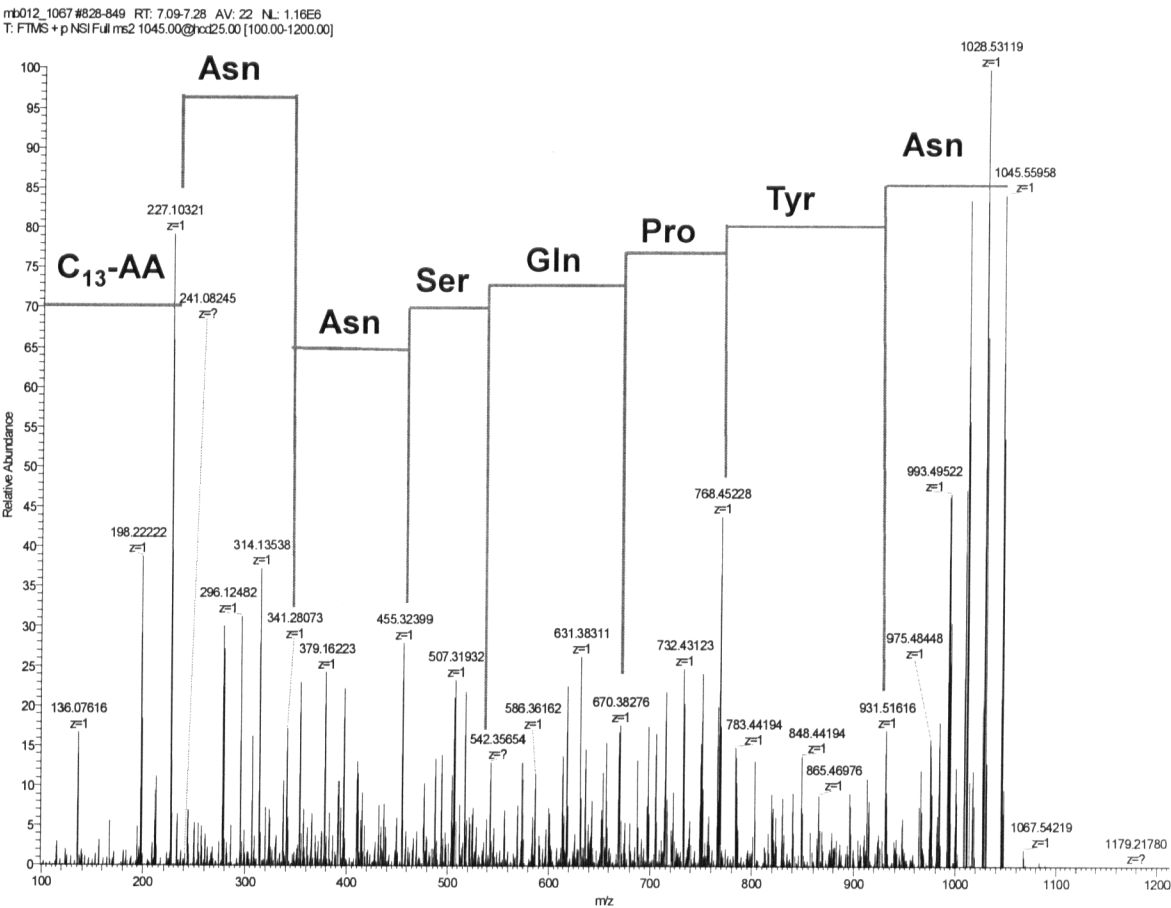


圖 19

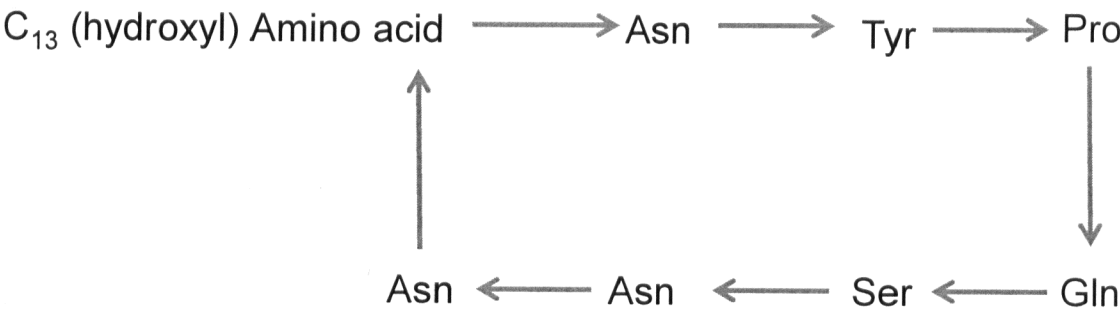


圖 20

發明摘要

※ 申請案號：102128992

※ 申請日：

※IPC 分類：

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

具有抗真菌及抗細菌功效與促生活性之芽孢桿菌品種/*Bacillus* sp. Strain
with Antifungal, Antibacterial and Growth Promotion Activity

【中文】

本發明係提供一種名為芽孢桿菌分離株F727之芽孢桿菌品種，其可產生具有滅殺有害物活性之代謝物。本發明亦提供取自芽孢桿菌分離株F727之生物活性組成物及代謝物，可用於控制有害物。本發明並提供使用該品種及其代謝物以控制有害物之方法。

【英文】

Disclosed herein is a *Bacillus* strain, *Bacillus* sp. isolate F727, that produces metabolites with pesticidal activities. Also provided are bioactive compositions and metabolites derived from cultures of *Bacillus* sp. isolate F727 capable of controlling pests; as well as methods of use of the strain and its metabolites for controlling pests.

發明摘要

※ 申請案號：102128992

※ 申請日：

※IPC 分類：

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

具有抗真菌及抗細菌功效與促生活性之芽孢桿菌品種/*Bacillus* sp. Strain
with Antifungal, Antibacterial and Growth Promotion Activity

【中文】

本發明係提供一種名為芽孢桿菌分離株F727之芽孢桿菌品種，其可產生具有滅殺有害物活性之代謝物。本發明亦提供取自芽孢桿菌分離株F727之生物活性組成物及代謝物，可用於控制有害物。本發明並提供使用該品種及其代謝物以控制有害物之方法。

【英文】

Disclosed herein is a *Bacillus* strain, *Bacillus* sp. isolate F727, that produces metabolites with pesticidal activities. Also provided are bioactive compositions and metabolites derived from cultures of *Bacillus* sp. isolate F727 capable of controlling pests; as well as methods of use of the strain and its metabolites for controlling pests.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

具有抗真菌及抗細菌功效與促生活性之芽孢桿菌品種/*Bacillus* sp. Strain with Antifungal, Antibacterial and Growth Promotion Activity

【技術領域】

【0001】本發明係關於生物性農藥與有害物控制；更詳而言之，係關於微生物農藥及用以製造此種微生物農藥之微生物品種。

【先前技術】

【0002】由微生物、植物或其他有機體所產生之物質稱為天然產物。不同微生物天然產物之間存在有極大之化學多樣性，且天然產物已有悠久之藥用歷史。天然產物主要用於人類治療，五成以上之人類用藥取自天然產物，但僅有11%農藥係取自天然來源。然而，天然產物農藥於傳統及有機耕作農場均可做為防治有害物之重要工具。微生物（細菌、放射菌及真菌）之次級代謝物所產出之新穎化學化合物可用單獨使用或搭配已知化合物使用，而有效控制昆蟲類害蟲並以減少抗藥性增高風險。多種為人熟知之微生物天然產物均為效果優良之農藥（Thompson等人，2000年；Arena等人，1995年；Krieg等人，1983年）。

【0003】微生物農藥之發展始自純種培養物微生物之分離。而後將分離株利用體內試驗、體外試驗或溫室及田間小量試製實驗進行分離株之效率與光譜篩選。同時，對該微生物產出之活性化合物進行分離及辨識。為求微生物農藥之商業化，該微生物須經工業規模發酵之經濟方式生成，並與生物相容之核准添加物配製成劑，以提升效率並提升使用易度。

【0004】隨著有害物對化學農藥之抗藥性日漸增加，可用農藥種類也越來越少。此外，非天然來源農藥亦可能對環境產生危害。據此，吾人實需一種植物病原體對其尚無抗性且對環境影響程度最低之新穎天然來源農藥。

【發明內容】

【0005】本發明提供一種具有滅殺有害物活性之微生物品種，芽孢桿菌分離株F727。此品種產生之生物活性代謝物可有效控制有害物並促進植物生長。本發明亦提供使用芽孢桿菌分離株727及其代謝物以控制有害物並促進植物生長之方法。在一特定實施例中，該芽孢桿菌可具有NRRL B-50768之至少一項鑑別特性。

【0006】此外，該芽孢桿菌之16S rRNA基因序列與SEQ ID NO: 3中所列保留序列具有至少99% 同一性，且更具體為99.5% 同一性，並包含與SEQ ID NO:1所列序列具有至少99% 同一性且特別是99.5% 同一性之正向序列，以及與SEQ ID NO:2所列序列具有至少99% 同一性且特別是99.5% 同一性之反向序列。

【0007】本發明進一步提供一實質純種培養物或全細胞液，其包含該品種，或取自該品種之細胞片段、萃取物、表層浮質及／或物質，或取自該品種之化合物或其萃取物。

【0008】本發明進一步提供一種用以調控植物中有害物侵擾之方法，其係包括對該植物及／或其種子及／或用以種植該植物之基質施以一用量之該芽孢桿菌分離株F727（及／或取自該品種之培養物、細胞片段、萃取物、表層浮質及／或物質或化合物或其萃取物），該用量可有效調控該有害

物侵擾。在特定實施例中，該有害物為植物真菌，例如，盤梗黴菌(*Bremia*)、葡萄孢菌(*Botrytis*)、核盤菌(*Sclerotinia*)、白粉菌(*Sphaerotheca*)、絲核病菌(*Rhizoctonia*)、炭疽菌(*Colletotrichum*)、鐮胞菌(*Fusarium*)、蠟蚧輪枝菌(*Verticillium*)、疫菌(*Phytophthora*)或雙孔孢菌(*Bipolaris*)。在其他實施例中，該有害物為細菌，例如，歐文氏菌(*Erwinia*)、假單胞菌(*Pseudomonas*)、黃單胞菌(*Xanthomonas*)、斑點病菌(*Acidovorax*)或棒狀桿菌(*Clavibacter*)。

○ 【0009】本發明亦提供促進植物生長及／或種子發芽之方法，其中該方法包含對植物及／或其種子及／或用以種植該植物之基質施以一用量之芽孢桿菌分離株F727（及／或一培養物、細胞片段、萃取物、表層浮質及／或物質或去自該品種之化合物或萃取物），所述用量可有效促進植物生長及／或種子發芽。

【0010】在特定實施例中，該芽孢桿菌產生之化合物係選自由以下項目所構成之群組：

○ 【0011】 (a) 化合物A，其

○ 【0012】 (i) 可取自芽孢桿菌，且特別是芽孢桿菌分離株F727；

【0013】 (ii) 具有殺有害物活性；

【0014】 (iii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1020-1060，且更具體為1044；

【0015】 (iv) ^1H NMR值為 δ 7.15, 6.72, 4.81, 4.70, 4.65, 4.40, 4.35, 4.25, 4.15, 3.85, 3.65, 3.50, 3.22, 2.85, 2.80, 2.65, 2.45, 2.35, 2.30, 2.20, 1.95, 1.55, 1.31, 1.20及0.85；

【0016】 (v) 利用一以水與乙腈(CH_3CN)調製之梯度溶劑系統（0-20

分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈)，設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-12分鐘，更具體為約8分鐘，且又更具體為約8.31分鐘；

【0017】 (vi) 隨選性包含47個碳原子、72個氫原子、12個氮原子，以及15個氧原子；以及

【0018】 (vii) 隨選性為一包含穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）之胜肽；

【0019】 (b) 化合物B，其

【0020】 (i) 具有殺有害物活性；

【0021】 (ii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1030-1080，且更具體為1058；

【0022】 (iii) 利用一以水與乙腈(CH₃CN)調製之梯度溶劑系統（0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈)，設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-14分鐘，更具體為約8分鐘，且又更具體為約8.67分鐘；

【0023】 (iv) 隨選性包含48個碳原子、74個氫原子、12個氮原子，以及15個氧原子；以及

【0024】 (v) 隨選性為一包含穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）之胜肽；以及

【0025】 (c) 化合物C，其

【0026】 (i) 具有殺有害物活性；

【0027】 (ii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1050-1120，且更具體為1072；

【0028】 (iii) 利用一以水與乙腈(CH₃CN)調製之梯度溶劑系統 (0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈)，設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-14分鐘，更具體為約9分鐘，且又更具體為約9.19分鐘；

【0029】 (iv) 隨選性包含49個碳原子、76個氫原子、12個氮原子，以及15個氧原子；以及

【0030】 (v) 隨選性為一包含穀胺醯胺 (1單位)、脯胺酸 (1單位)、絲胺酸 (1單位)、酪胺酸 (1單位) 及天冬醯胺酸 (3單位) 之胜肽。

【0031】 本發明亦提供一種芽孢桿菌品種，其具有以下特性：

【0032】 (a) 至少以下一者：

【0033】 (1) 一核苷酸序列，其具有至少與SEQ ID NO:3所列16SrRNA序列99.5%之同一性；

【0034】 (2) 一核苷酸序列，其具有至少與SEQ ID NO:10所列*recA*序列95%之同一性；以及

【0035】 (3) 一核苷酸序列，其具有至少與SEQ ID NO:13所列*phoR* 序列90%之同一性；

【0036】 (b) 產生一或多種化合物，其

【0037】 (i) 具有殺有害物活性；

【0038】 (ii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1020-1120，以及

【0039】 (iii) 利用一以水與乙腈(CH_3CN)調製之梯度溶劑系統 (0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈)，設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-15分鐘，以及

【0040】 (iv) 隨選性為胜肽；

【0041】 (c) 抗卡那黴素(Kanamycin)、氯黴素(Chloramphenicol)、氨比西林(ampicillin)、青黴素(penicillin)、頭孢呋肟(cefuroxime)、達比黴素(piperacillin)、四環素(tetracycline)；以及

【0042】 (d) 具有鹼性磷酸酵素、酯酵素、酸性磷酸酵素及萘酚-AS-BI-磷酸水解酶活性。

【0043】 本發明亦提供一種組合，其包含該芽孢桿菌分離株F727，一取自該品種之實質純種培養物、細胞片段、萃取物、表層浮質及物質、代謝物或化合物或其萃取物，以及至少以下一者：(a)一第二物質，其可為化學性或生物性農藥，以及 (b) 載體、稀釋液、界面活性劑、輔藥中之至少一者。該組合可為一組成物且可塗佈於種子上。

【0044】 本發明進一步提供一種用以調控植物中有害物侵擾之方法，包括對該植物及／或其種子及／或用以種植該植物之基質施以一用量之該組合，使其有效調控該有害物侵擾。在一特定實施例中，該有害物為植物

真菌，如，盤梗黴菌(*Bremia*)、葡萄孢菌(*Botrytis*)、核盤菌(*Sclerotinia*)、白粉菌(*Sphaerotheca*)、絲核病菌(*Rhizoctonia*)、炭疽菌(*Colletotrichum*)、鐮孢菌(*Fusarium*)、蠟蚧輪枝菌(*Verticillium*)、疫菌(*Phytophthora*)或雙孔孢菌(*Bipolaris*)。在其他實施例中，該有害物為細菌，如歐文氏菌(*Erwinia*)、假單胞菌(*Pseudomonas*)、黃單胞菌(*Xanthomonas*)、斑點病菌(*Acidovorax*)或棒狀桿菌(*Clavibacter*)

【0045】本發明進一步提供一組成物配製為殺有害物組成物之用途，

○ 可隨選結合一或多種第二物質，其中該組成物係選自由以下項目所構成之群組：以下一或多者：

【0046】 (a)一實質純種芽孢桿菌分離株F727培養物，

【0047】 (b) 芽孢桿菌分離株F727培養物之細胞片段，

【0048】 (c) 取自芽孢桿菌分離株F727培養物之表層浮質，

【0049】 (d) 取自芽孢桿菌分離株F727培養物之濾液，

【0050】 (e) (a)、(b)、(c)或(d)之萃取物，

○ 【0051】 (f) 產自芽孢桿菌分離株F727培養物之代謝物，

【0052】 (g) 化合物A，

【0053】 (h) 化合物B，以及

【0054】 (i) 化合物C；以及

【0055】該第二物質係選自由以下項目所構成之群組：

【0056】 (a) 一農藥，

【0057】 (b) 一植物生長促進劑，

【0058】 (c) 一載體，

【0059】 (d) 一輔藥，

【0060】 (e) 一界面活性劑，

【0061】 (f) 一肥料，以及

【0062】 (g) 一抗植物致病劑。

【圖式簡單說明】

【0063】

圖1 概要說明自培養液取得本發明化合物之純化辦法。

圖2 為化合物A之ESI-LCMS色彩層析譜。

圖3 為化合物A之(+) ESIMS。

圖4 為化合物B之ESI-LCMS色彩層析譜。

圖5 為化合物B之 (+) ESIMS。

圖6 為化合物C之ESI-LCMS色彩層析譜。

圖7 為化合物C之(+) ESIMS。

圖8 描繪VLC片段3（圖中之F727F3）及HPLC-純化化合物 A（圖中之F727F3H11）、化合物 B（圖中之F727F3H14）及化合物 C（圖中之F727F3H17）對抗以下四種真菌病原體之生物活性：*Botrytis cinerea*（圖中之Botrytis）、*Sclerotinia homeocarpa*（圖中之Sclerotina）、*Rhizoctonia solani*（圖中之Rhizoctonia）以及 *Bipolaris maydis*（圖中之Bipolaris）。

圖9 顯示F727表層浮質對番茄中番茄灰黴病菌(*Botrytis cinerea*)之作用。植物接種圖中所示濃度之*B. cinerea* 孢子，而後以芽孢桿菌 F727發酵物之表層浮質（左起第二條）或Switch[®]（左起第三條）治療處理。對照組包括未接种植物（最左者）以及用兩種不同濃度真菌接種但未以農藥處理之植物

(左起第四及第五條)。

圖10 顯示F727表層浮質對莧苣露菌病之作用。植物接受芽孢桿菌分離株F727表層浮質 (F727)處理、Ridomil處理，或未處理(UTC)。

圖11 比較F727表層浮質與環醯菌胺(Fenhexamid)對番茄上 *Botrytis*之作用。對感染*B. cinerea*之植物噴灑F727表層浮質一次 (F727表層浮質) 或兩次 (F727表層浮質 x 2)，或水或環醯菌胺 (Elevate[®])，而後檢驗疾病嚴重度。

圖12 比較F727表層浮質與環醯菌胺對椒上 *Botrytis*之作用。對植物噴灑芽孢桿菌分離株F727發酵物之表層浮質 (F727)、水(UTC)或環醯菌胺 (Elevate[®])。使接受噴灑後之植物感染*B. cinerea*，生長，於13天後檢驗疾病嚴重度。

圖13 顯示感染白粉病之黃瓜及以不同F727 製備物處理之疾病控制效果。於三種不同培養基中培養F727細胞：SPY、SMP及TSB，如圖所示。從上述各生長條件取得全細胞液、細胞（懸浮於10 mM之MgSO₄）以及表層浮質。水（圖中之「去離子水」）為陰性對照組。亦包含SMP培養基、SPY 培養基、TSB 培養基及10 mM MgSO₄ 之空白對照組。

圖14 顯示受番茄灰黴病菌感染之番茄植物及以不同F727 製備物處理之疾病控制效果。於三種不同培養基中培養F727細胞：SPY、SMP及TSB，如圖所示。從上述各生長條件取得全細胞液、細胞（懸浮於10 mM之MgSO₄）以及表層浮質。水（圖中之「去離子水」）為陰性對照組。亦包含SMP培養基、SPY 培養基、TSB 培養基及10 mM MgSO₄ 之空白對照組。

圖15 顯示受白粉病感染之黃瓜植物疾病控制情形。以真菌孢子接種前先對

植物噴灑水（圖中之「去離子水」，陰性對照組）、分離株F727發酵物之全細胞液(MBI-110 WCB)或一種市售農藥(Double Nickel[®] (Certis, *Bacillus amyloliquefaciens* strain D747)、Sonata[®] (*Bacillus subtilis*)、Vacciplant[®]、Companion[®]、Serenade[®] (*Bacillus pumilus*) 或 Regalia[®] (*Reynoutria sachalinensis*)，或Regalia[®] (*Reynoutria sachalinensis*)與F727 WCB之組合。

圖16 顯示受蕃茄晚疫病菌感染之番茄植物疾病控制情形。接種蕃茄晚疫病菌之前，先對植物噴灑水（圖中之「去離子水」，陰性對照組）、Regalia[®]、Double Nickel[®] (Certis, *Bacillus amyloliquefaciens* strain D747)或分離株F727發酵物之全細胞液(MBI-110 WCB)。

圖17 顯示一體外檢驗中F727發酵物表層浮對白絹病菌菌絲生長之控制效果。亦顯示水（去離子水）、未過濾F727表層浮質（未過濾F727）、過濾後F727表層浮質（過濾後 F727）及Pristine[®]之作用。對每種測試材料及對照組均測試兩種用量：在每一對資料條中，最左側為 25 μ l之使用結果，最右側為50 μ l之使用結果。

圖18 顯示F727 WCB 土壤澆淋對感染露菌病萵苣之效果。UTC：未處理對照組之萵苣植物接受約 5×10^4 露菌孢子感染；F727 澆淋：萵苣植物接受約 5×10^4 露菌孢子感染一小時前先經F727 WCB土壤澆淋處理。疾病嚴重度以患病組織覆蓋葉片／子葉之百分比表示。

圖19 顯示化合物 A 之ESIMS/MS結果。

圖20 為化合物 A之概要結構圖。

【實施方式】

【0064】雖然至此所述之組成物與方法可為各種修改及替代形式，在

此將就範例實施例詳加說明。然應知本發明並不限於在此揭露之特定形式，反之，本發明意欲包含所有落於本發明精神與範疇中之修改、均等方案及替代方案，而本發明精神與範疇係如所附申請專利範圍所定義者。

【0065】除非上下文另有說明，否則於應知提供數值之處，均包含介於該範圍上下限之間小至下限單位十分之一之每一中介值，以及其他任何於該範圍內之聲明值或中介值。較小範圍亦包括在內。除非另有排除，否則此等較小範圍之上下限亦應包括於其中。

○

【0066】除非另有定義，所有在此使用之技術及科學術語之定義均與本發明所屬技術領域中具有一般知識者所知者相同。雖然在此就較佳方法及材料進行描述，但任何與本說明書所稱者類似或相等之方法及材料亦可用於本發明之實施或測試。

【0067】除非上下文另有明言，否則本說明書及申請專利範圍中所用單數之「一」及「該」包括複數之含義。

○

【0068】如在此定義，「取自」意指直接分離自或取自一特定來源或與分離自或取自特定來源之物質或有機體具有相同特性者。若該「來源」為有機體，「取自」意指其係分離自或取自該有機體本身或分離自或取自用以培養或種植該有機體之媒介。

【0069】如在此定義，「全細胞培養物」或「全細胞培養液」意指包含細胞與培養基兩者之液態培養物。若將細菌種植於培養皿中，可於水或其他液體中收穫液態全培養物，以提供全細胞培養物。

【0070】如在此定義，「表層浮質」意指細胞成長於成長於培養液或從洋菜皿中收穫於另一液體中之細胞且經 離心、過濾、沉澱，或其他本技藝

中已知方式處理後剩餘之液體。

【0071】如在此定義，「濾液」意指已通過薄膜之液態全培養物。

【0072】如在此定義，「萃取物」意指以溶劑（水、清潔劑、緩衝液）自細胞去除且以離心、過濾或其他方法自細胞分離之液態物質。

【0073】如在此定義，「代謝物」意指微生物或取自微生物之表層浮質、濾液或萃取物發酵所生之化合物、物質或副產物，其中所述微生物為具殺有害物性且特別是殺細菌或殺真菌活性者。如在此定義，「分離化合物」實質上不含其他化合物或物質，如至少約20%純度，較佳者為至少約40%純度，更佳者為約60%純度，又更佳者為約80%純度，最佳者為約90%純度，且又最佳者為約95%純度，如以分析方測定者，所述分析法包括但不限於色析法、電泳法。在本文中，「代謝物」與「化合物」兩詞可交替使用。

【0074】如在此定義，「載體」為可與活性成份混合或配製成劑以便活性成分對於植物或其他待處理物之施用，或便於其存放、輸送及／或搬運之惰性有機或無機材料。

【0075】如在此定義，「調控」，意指改變有害物侵擾量或有害物侵擾率。

【0076】如在此定義，「有害物侵擾」係指有害物以造成有害效應之數量存在，所述有害效應包括疾病或於宿主群之中感染或於生長系統中出現雜草。

【0077】如在此定義，「農藥」為一取自生物產物或化學物質之物質，其可增加固定性或抑制植物有害物生長率，且包括但不限於殺線蟲劑、除殺昆蟲劑、植物殺真菌劑、植物殺細菌劑及植物殺病毒劑。

【0078】芽孢桿菌 F727之鑑別與特性描述

【0079】經由結合16S rRNA序列測定、脂肪酸分析、MALDI-TOF蛋白質分析與數種生物化學檢驗之特性描述（見下文實例1-4）之多重方法確定芽孢桿菌分離株F727為芽孢桿菌之新穎品種。

【0080】對芽孢桿菌 F727發酵產生之代謝物進行分離與特性描述。見下文實例5、25及26。其中部份代謝物經體內與體外試驗證明具有對抗真菌病原體 及細菌病原體之活性。見下文實例6-17、20、22、23及27-29。亦觀察芽孢桿菌 F727及其代謝物在數種植物上之生長促進功效。見下文實例18及19，以及21、24。

【0081】因此芽孢桿菌 F727及／或其代謝物可做為農業上控制真菌或細菌引起之疾病之天然產物；並可用於促進植物生長。

【0082】製造方法

【0083】如上所述，化合物或代謝物係取自或可取自具有一或多種芽孢桿菌 F727品種鑑別特性之有機體。此方法包含種植此等有機體並將本發明之化合物及／或組成物自此等有機體之培養物中分離。

【0084】具體而言，係利用此技藝中習之方法於營養培養基中培養該有機體。有機體之培養可採用搖瓶培養、於實驗室或工業發酵器中以適當培養基在允許細胞生長之條件下所進行之小規模或大規模發酵（包括但不限於連續、批次、饋料批次或固態發酵）。種植可利用本技藝中已知程序於適當之營養培養基上進行，包含碳源與氮源及無機鹽。適用之培養基可由商業管道購得或根據公開之組成自行製備。

【0085】培養後，芽孢桿菌（如，芽孢桿菌F727）之表層浮質、濾液

及／或萃取物即可用於配製滅殺有害物組成物。

【0086】或者，培養後，可從培養液中萃取、增進成分或純化出該化合物及／或代謝物。

【0087】該萃取物可經層析法區分為片段。接著可利用此技藝中已知方法檢驗層析片段對真菌（如*Botrytis*、*Sclerotinia*、*Rhizoctonia*及*Bipolaris*）之毒性。可利用相同或不同層析法重複劃分。

【0088】在一實施例中，產自F727菌種之組成物包含一或多種化合物，其 (i)具有殺有害物活性；(ii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為1020 -1120；(iii) 利用一以水與乙腈(CH₃CN)調製之梯度溶劑系統(0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈)，設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC) 滯留時間為約6-15分鐘；以及 (iv) 可取自一種芽孢桿菌品種。該化合物在一實施例中為胜肽。

【0089】在一特定實施例中，該化合物 A (i) 可取自一芽孢桿菌品種；(ii) 對有害物具有毒性；(iii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1020-1060，且更具體為1044；(iv) ¹H NMR值為 δ 7.15, 6.72, 4.81, 4.70, 4.65, 4.40, 4.35, 4.25, 4.15, 3.85, 3.65, 3.50, 3.22, 2.85, 2.80, 2.65, 2.45, 2.35, 2.30, 2.20, 1.95, 1.55, 1.31, 1.20及0.85；以及 (v) 利用一以水與乙腈(CH₃CN)調製之梯度溶劑系統(0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈)，設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-12分

鐘，更具體為約8分鐘，且又更具體為約8.31分鐘。此外， ^1H NMR、 ^{13}C NMR與MS分析中，化合物A之訊號包含47個碳、72個氫、12個氮及15個氧。 ^1H NMR譜特性屬於典型胜肽。化合物 A之 ^1H NMR、 ^{13}C NMR與MS/MS詳細分析以及胺基酸分析顯示其中存在有穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）。

【0090】在另一特定實施例中，F727產生之化合物為化合物 B，其(i) 具有殺有害物活性；(ii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1030-1080，且更具體為1058；以及 (iii) 利用一以水與乙腈(CH_3CN)調製之梯度溶劑系統(0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈)，設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-14分鐘，更具體為約8分鐘，且又更具體為約8.67分鐘。 ^1H 及 ^{13}C NMR資料，連同MS資料，顯示其包含 48個碳、74個氫、12個氮及15個氧。 ^1H NMR譜 特性屬於典型胜肽。化合物 B之 ^1H NMR、 ^{13}C NMR與MS/MS詳細分析以及胺基酸分析顯示其中存在有穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）。

【0091】在又一特定實施例中，F727產生之化合物為化合物 C，其 (i) 具有殺有害物活性；(ii) 經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1050-1120，且更具體為1072；以及 (iii) 利用一以水與乙腈(CH_3CN)調製之梯度溶劑系統（0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈），設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留

時間為約6-14分鐘，更具體為約9分鐘，且又更具體為約9.19分鐘。¹H及¹³C NMR資料，連同MS資料，顯示其包含 49個碳、76個氫、12個氮及15個氧。¹H NMR譜特性屬於典型胜肽。化合物 C之¹H NMR、¹³C NMR與MS/MS詳細分析以及胺基酸分析顯示其中存在有穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）。

【0092】組成物

【0093】組成物可包含芽孢桿菌菌株之全細胞培養物、全培養液、液態培養物或懸浮液，特別是取自具有至少一或多種芽孢桿菌分離株F727鑑別特性之芽孢桿菌菌株，以及取自該芽孢桿菌之表層浮質、濾液或萃取物。該組成物亦可包含取自芽孢桿菌分離株F727之一或多種代謝物或分離化合物，其特別具有殺細菌性、殺真菌性及／或植物促生活性。

【0094】上述組成物可以任何方法配製成劑。非限制性劑型範例包括，但不限於，乳化濃縮劑(EC)、可濕性粉末(WP)、可溶性液體 (SL)、浮質、超低量濃縮溶液(ULV)、可溶性粉末(SP)、微膠囊體、水分散細粒、流體(FL)、微乳膠(ME)、奈米乳膠(NE)等等。於在此所述之任何劑型中，活性成份之比例為約0.01%至99.99%。

【0095】該組成物可為液體、膠體或固體型態。固態組成物之製備法為將固態載體懸浮於活性成份溶液中，再以溫和條件乾燥該懸浮液，如室溫蒸發或於65°C或以下之真空蒸發。

【0096】組成物可包含以凝膠包覆之活性成份。此種凝膠包覆材料之製備法為將成膠劑（如明膠、纖維素，或木質素）混合巨大芽孢桿菌之活體培養物或死菌懸浮液，或巨大芽孢桿菌培養物或懸浮液之無細胞濾液或

細胞部分，或噴灑或凍乾培養物、細胞，或細胞部分或在本發明方法所用殺有害物化合物之溶液中；以及使該劑形成膠狀。

【0097】該組成物可另包含表面活性劑，其目的為乳化、分散、潤濕、延展、整合、分解控制、活性成份穩定化，及改善流動性或防鏽。於一特定實施例中，該表面活性劑為一非植物毒性非離子表面活性劑，其較佳者為屬於EPA List 4B者。於另一特定實施例中，該非離子表面活性劑為聚山梨醇酐酯月桂酸酯(20)。該表面活性劑之濃度可為總製劑之約0.1-35%；較佳者為約5-25%。分散乳化劑之選擇，如非離子、陰離子、兩性及陽離子分散乳化劑，其用量取決於組成物之性質及所需促進本發明組成物分散之能力。

【0098】上述組成物可與另一微生物及／或農藥（如殺線蟲劑、殺細菌劑、殺真菌劑、殺疥蟲劑、殺昆蟲劑）結合。該微生物可包括，但不限於，取自*Bacillus* sp.（如、*Bacillus firmus*、*Bacillus thuringiensis*、*Bacillus pumilus*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus subtilis*）、*Paecilomyces* sp. (*P. lilacinus*)、*Pasteuria* sp. (*P. penetrans*)、*Pseudomonas* sp.、*Brevibacillus* sp.、*Lecanicillium* sp.、*Ampelomyces* sp.、*Pseudozyma* sp.、*Streptomyces* sp (*S. bikiniensis*、*S. costaricanus*、*S. avermitilis*)、*Burkholderia* sp.、*Trichoderma* sp.、*Gliocladium* sp.、*avermectin*、*Myrothecium* sp.、*Paecilomyces* spp.、*Sphingobacterium* sp.、*Arthrobotrys* sp.、*Chlorosplrnium*、*Neobulgaria*、*Daldinia*、*Aspergillus*、*Chaetomium*、*Lysobacter* spp、*Lachnum papyraceum*、*Verticillium suchlasporium*、*Arthrobotrys oligospora*、*Verticillium chlamydosporium*、*Hirsutella rhossiliensis*、*Pochonia chlamydosporia*、*Pleurotus*

ostreatus、*Omphalotus olearius*、*Lampteromyces japonicas*、*Brevudimonas sp.*、*Muscodor sp.*。

【0099】該藥劑可為具殺線蟲、殺真菌、殺細菌及／或殺昆蟲活性之天然油或油產物（如石臘油、茶樹油、檸檬草油、丁香油、肉桂油、柑橘油，包括但不限於苦橙、柳橙、檸檬；迷迭香油、除蟲菊、多香果、佛手柑、藍膠尤加利、甘菊、香茅、普通茉莉、普通杜松、普通薰衣草、普通沒藥、中國薄荷、小蒼蘭、銀灰菊、牛膝草、聖羅勒、香樹、茉莉、薰衣草、金盞花、薄荷、胡椒薄荷、金盞菊、綠薄荷、伊蘭伊蘭樹、皂素）。

【0100】此外，該農藥可為一單點抗真菌劑，其可包括但不限於：苯并咪唑、去甲基抑制劑(DMI)（如咪唑、嘧啶、三唑）、嗎啉、羥基嘧啶、苯胺基嘧啶、磷硫醇鹽、醌外部抑制劑、喹啉、二甲醯亞胺、羧胺、苯基醯胺、苯胺基嘧啶、苯基吡咯、芳香烴、桂皮酸、羥基苯胺、抗生素、多氧菌素、醯基胺、鄰苯二甲醯亞胺、苯環（二甲苯基丙胺酸）、選自咪唑、嘧啶、三唑之去甲基抑制劑（如bitertanol、myclobutanil、penconazole、propiconazole、triadimefon、bromuconazole、cyproconazole、diniconazole、fenbuconazole、hexaconazole、tebuconazole、tetraconazole）、邁克尼，及醌外部抑制劑（如嗜球果傘素）。該嗜球果傘素可包括但不限於亞托敏(azoxystrobin)、克收欣(kresoxim-methyl)或三氟敏(trifloxystrobin)。在又一特定實施例中，該抗真菌劑為一醌，如快諾芬(5, 7-二氯-4-喹啉基 4-氟苯基醚)。該抗真菌劑亦可取自虎杖萃取物。

【0101】該殺真菌劑亦可為多點非無機化學殺真菌劑，選自以下項目構成之群組：氯腈、喹啉、磺醯胺、磷酸酯、亞磷酸酯、二硫代胺基甲

酸酯、氯烷基硫代、苯基吡啶-胺、氰基-乙醯胺肪。

【0102】如上所述，該組成物可其進一步包含一殺線蟲劑。此殺線蟲劑可包括但不限於化學物，如有機磷酸酯、胺基甲酸鹽，及燻蒸劑，以及微生物產品，如阿佛菌素、漆斑菌、芽孢桿菌、巴斯德菌、擬青黴菌，以及有機產物 如皂素及植物油。

○ 【0103】該組成物可利用此技藝已知方法施用。具體而言，此等組成物可施用於植物周圍或植物部分。本文中所稱植物包含所有植物及植物族群，如爲人所需要及不需要之野生植物或作物植物（包括天然產生之作物植物）。作物植物可爲經習知植物育種與優化方法或生物科技及基因工程方法或上述方法之組合所取得之植物，包括基因轉殖植物，且包括受到或不受植物育種權保護之植物培育品種。植物部分包含植物位於地上及地下之所有部分及器官，如芽、葉、花及根，其範例包括葉、針、梗、莖、花、果體、水果、種子、根部、塊莖及地下莖。該植物部分亦包括，但不限於，收穫材料，及植物生長繁衍材料，例如切枝、塊莖、地下莖、分枝及種子。

○ 【0104】以上述組成物處理植物與植物部分時，可直接處理或使組成物於其周圍、棲地或儲存空間內作用，方法例如爲浸泡、噴灑、蒸發、噴霧、噴濺、塗抹或注射。

【0105】該組成物亦可透過本技藝中已知之方法施用於土壤。包括但不限於(a)滴注灌溉或施化灌溉、(b)土壤混合、(c)土壤灌藥、(d)種子處理及施料；以及(e)裸根沾浸。

【0106】種子處理

【0107】種子處理包括以本發明組成物，隨選配合其他生物活性劑、

摻抗劑或協同劑，於播種前施用於種子表面。殺有害物毒素、蛋白質及／或本發明之化合物可以乾粉、粉漿或噴劑方式在種植前施用於種子。

【0108】本發明之組成物可採以下任一模式配製成種子處理劑：乾粉、水漿粉、溶液、可流動濃縮物或乳膠、乳膠、微膠囊、凝膠、或水可分散顆粒。

【0109】若為乾粉形態，活性成分以類似可濕性粉末之方式配製，但以如礦物油等黏著劑取代潤濕劑。例如，取一公斤純化滑石粉（消毒12小時）、15 g碳酸鈣及10 g羧甲基纖維素在無菌條件下按照Nandakumar等人（2001年）所述之方式混合。活性成分之混合比為1:2.5（懸浮液對混合乾料），將產品陰乾，使含水量降低至 20-35%。

【0110】若欲將本發明組成物用於種子時，可於種子種植前利用一或多種種子披衣劑於種子上構成被覆層。此等種子披衣劑包括，但不限於，乙烯乙二醇、聚乙二醇、甲殼素、羧基甲基甲殼素、泥煤苔、樹脂及蠟。該組成物亦可利用此技藝已知方式結合例如化學殺真菌劑或化學殺細菌劑以單點、多點或其他行為模式施用於種子。

【0111】在其他實施例中，本發明之組成物可經種子吸收或以粉狀接種體之方式施用於種子。

【0112】所述可為習知種子，或為基因改造種子，如Liberty Link (Bayer CropScience)、Roundup Ready種子(Monsanto)，或其他抗除草劑種子，及／或經調整而具有昆蟲抗性之種子，或經基因「累加」而成為具有除草劑抗性及昆蟲抗性基因之種子。

【0113】植物生長促進

【0114】植物與細菌於根際之交互作用為決定土壤肥沃與植物健康之重要因素。有益於植物生長之腐生性細菌又稱為植物促生性根棲細菌(PGPR)。一般而言，植物生長促進因子之作用方式可分為三種：合成植物生長調控因子、促進土壤養分吸收，及預防植物疾病。因此，PGPR之效用可直接性或間接性。間接植物生長促進可包括對植物致病菌之抵抗性，方式包括，例如，產生攜鐵蛋白、合成抗生素，以及產生HCN 及／或細胞壁降解酵素。直接植物生長促進效果之達成方式為調節植物激素（幫助植物及根部發展，並保護植物不受惡劣環境傷害），以及溶解礦物磷酸鹽和其他營養素。

【0115】本發明之組成物，特別是，芽孢桿菌分離株F727及／或取自芽孢桿菌分離株F727培養物之表層浮質、濾液、萃取物、化合物、代謝物或細胞片段，可用於調控或更詳言之是促進植物生長，適用者如以下作物：如水果（如草莓）、蔬菜（如番茄、南瓜、椒、茄）、豆科植物，或穀類作物（如大豆、小麥、稻米、玉米）、樹、花、觀賞植物、灌木（如，棉、玫瑰）、草皮（如一年生黑麥草、百慕達草、野牛草、細弱剪股穎、小糠草、小金錢草、硬羊茅、肯塔基藍草、克育草、多年生黑麥草、紅牛毛草、粗莖苗系草、海雀稗、聖奧古斯丁草、高狐草、韓國草等等）、球莖植物（如，洋蔥、大蒜）或藤（如，葡萄藤）。該組成物亦可用於調控植物之種子發芽。

【0116】本發明之組成物，或配製產品，可單獨使用或與一或多種下述其他成分結合使用，如生長促進劑及／或抗植物致病劑，於槽中混合或以預設順序之編程（依序輪用）在生長季節中施用。當與上述產物結合使用時，濃度應低於產品標籤建議之濃度，在一特定實施例中，二或多種產

品（其中一種為本發明之組成物）結合之功效高於其個別成分之功效加總。因此，此等二（或多）種產物間之協同效應可加強整體效果，且可降低植物病原體品種產生農藥抗性之風險。

【0117】該組成物可於移種時以根浸方式施用，具體而言可藉由在水果或蔬菜移栽至土壤之前，先將其之根部略為浸泡該組成物（約0.25至約1.5%，且更具體而言為約0.5%至約1.0%體積比），藉此利用該組成物處理該水果或蔬菜。

【0118】或者，該組成物可透過滴加或其他灌溉系統施用。具體而言，可將該組成物注入一滴加灌溉系統。於一特定實施例中，該組成物之施用濃度為 1×10^8 CFU/ml，用量可為每英畝約11至約4 夸脫。

【0119】在又一實施例中，可將該組成物添加於犁溝中以達施用之目的。具體而言，可利用校準為2-6加侖／英畝之總輸出量之噴嘴於種植時進行該組成物之犁溝內噴灑。位於犁溝之噴嘴運作與種植機配合，使得可於種子落入犁溝之同時施用農藥。

【0120】利用已知方式將上述混合物與一固態或液態輔藥（視需要）製備成劑。例如，該混合物之製備可透過均質混合及／或將該成份與增量劑混合而成，所述增量劑例如為溶劑、固態載體，以及表面活性化合物（表面活性劑）（視需要）。該組成物亦可進一步包含如穩定劑、黏性調節劑、結合劑、輔藥以及肥料等成份或其他活性成份，以獲得特殊效應。

【0121】與植物促生劑結合

【0122】本發明之組成物可與其他生長促進劑結合使用，所述其他生長促進劑如合成或有機肥料（如，粒狀或液態二銨磷酸鹽）、堆肥茶、海藻

萃取物、植物生長荷爾蒙如IAA（吲哚乙酸）用於移植之生根荷爾蒙處理，可單獨使用或與植物生長調節劑結合使用，如IBA（吲哚丁酸）及NAA（萘乙酸），及生長促進微生物，例如，芽孢桿菌、假單胞菌、根瘤菌及木黴菌。

【0123】抗植物致病劑

【0124】本發明之組成物亦可結合其他抗植物致病劑使用，如植物萃取物、生物農藥、無機作物殺蟲撒佈劑（如銅）、界面活性劑（如鼠李糖酯；Gandhi 等人，2007年）或具有殺蟲性質之天然油，如石蠟油或茶樹油，或具有單點、多點或其他作用模式之化學殺真菌劑或殺細菌劑。如在此所定義，「抗植物致病劑」為可調控植物病原體生長之藥劑，所指病原體特別是會造成植物之土傳疾病者，或為可預防植物受一植物病原體感染之藥劑。所述植物病原體包括但不限於真菌、細菌、放射菌或病毒。

【0125】如上所述，抗植物病原劑可為一單點抗真菌劑，其可包括但不限於去甲基抑制劑(DMI)（如咪唑、嘧啶、三唑）、嗎啉、羥基嘧啶、苯胺基嘧啶、磷硫醇鹽、醌外部抑制劑、喹啉、二甲醯亞胺、羧胺、苯基醯胺、苯胺基嘧啶、苯基吡咯、芳香烴、桂皮酸、羥基苯胺、抗生素、多氧菌素、醯基胺、鄰苯二甲醯亞胺、苯環（二甲苯基丙胺酸）。在一更特定實施例中，該抗真菌劑係一去甲基抑制劑，其細選自由以下項目所構成之群組：咪唑、嘧啶、三唑（如，bitertanol、myclobutanil、penconazole、propiconazole、triadimefon、bromuconazole、cyproconazole、diniconazole、fenbuconazole、hexaconazole、tebuconazole、tetraconazole）。在一最特定實施例中，該抗真菌劑為邁克尼。在又一特定實施例中，該抗真菌劑係一醌外部抑制劑（如噻球果傘素）。該噻球果傘素可包括但不限於azoxystrobin、

kresoxim-methoyle或trifloxystrobin。在又一特定實施例中，該抗真菌劑為一醌，如快諾芬（5, 7-二氯-4-喹啉基 4-氟苯基醚）。

【0126】在又另一實施例中，該殺真菌劑為多點非無機化學殺真菌劑，選自以下項目構成之群組：氯腈、喹啉、磺醯胺、磷酸酯、亞磷酸酯、二硫代胺基甲酸酯、氯烷基硫代、苯基吡啶-胺、氰基-乙醯胺。

【0127】在又另一實施例中，該抗植物病原劑可為鏈黴素、四環素、氧四環素、銅或春日黴素。

【0128】實例

【0129】實例1：芽孢桿菌分離株F727之分離與透過16S rRNA、*recA* 及 *phoR*序列之特性描述

【0130】從採集自美國加州 Jonesville之土壤樣本中利用傳統平板稀釋法分離出芽孢桿菌品種 F727。經PCR放大與 16S rRNA、*recA* 及*phoR*通用細菌引子之基因定序判定此分離株為芽孢桿菌。Cerritos *et al.* (2008) *Int. J. Sys.Evol.Microbiol.***58**:919-923; Guo *et al.* (2012) *Can. J. Microbiol.***58**: 1295-1305.

【0131】以無菌環從洋芋葡萄糖培養皿上刮下培養24小時之生長物，並將之再次懸浮於DNA 萃取緩衝液中。利用MoBio超潔淨微生物 DNA萃取組萃取DNA。將5uL之等份DNA萃取物置於1% 瓊膠上以電泳法確認其質／量。

【0132】rRNA序列

【0133】16S rRNA基因放大之PCR反應設定為將2 μL之該潔淨DNA 萃取物與25 μL之GoTaq Green Mastermix、1.5 μL正向引子(FD1 primer,

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO:4), 及1.5 μ L反向引子 (RD1 primer, 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' (SEQ ID NO:5))結合。以無菌之無核酸水將該反應量補足至50 μ L。將連鎖反應器設定為以下條件供進行PCR反應：10分鐘之95°C（初始變性），以45秒之94°C進行30次循環，45秒之55°C及2分鐘之72°C，而後為5分鐘之72°C（最終延伸）及最終保溫10°C。

【0134】將5 μ L之等份PCR產物置於1% 瓊膠上確認其大小、量及質，而後將該產物帶與一質量階梯對照。



【0135】以MoBio PCR 清理組去除該PCR產物中之多餘引子、核苷酸、酵素及型板。利用上述引子將清理後之PCR產物直接定序。

【0136】用BioEdit軟體對齊正向及反向序列，得一1459 bp 保留序列。

【0137】利用BLAST將F727菌株之16S rRNA 基因保留序列與細菌領域代表物可得序列比對。最接近之匹配為芽孢桿菌（庫藏編號GU250449.1），具99% 相似性。公開資料庫中無任何單一16S序列顯示與品種F727之100% 相似性。



【0138】此外，以EzTaxon-e server (eztaxon-e.ezbiocloud.net/；Kim等人，2012年）根據16S rRNA序列資料分析保留序列。最接近之匹配（示於表1）包括芽孢桿菌中屬數種之典型菌株，無法單靠16S rRNA序列區分。

【0139】表1

名次	名稱	品種	作者	登錄號	配對相似度 (%)	差異／總 核苷酸	完整性 (%)
1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	BGSC 3A28(T))	Rooney 等人 2009	EU1384 67	99.66	4/1168	79.3
2	<i>Brevibacterium</i> <i>halotolerans</i>	DSM 8802(T)	Delapor te and Sasson 1967 Roberts	AM747 812	99.65	5/1442	100
3	<i>Bacillus</i> <i>mojavensis</i>	RO-H-1 (T)	等人 1994 Roberts	JH6002 80	99.58	6/1442	100
4	<i>Bacillus</i> <i>vallismortis</i>	DV1-F- 3(T)	等人 1996 Gatson	JH6002 73	99.51	7/1442	100
5	<i>Bacillus</i> <i>tequilensis</i>	10b(T)	等人 2006 Sumpav	HQ223 107	99.51	7/1427	98.5
6	<i>Bacillus</i> <i>siamensis</i>	KCTC 13613(T)	apol 等 人 2010 (Ehrenb	AJVF01 000043	99.45	8/1442	100
7	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	NCIB 3610(T)	erg 1835) Cohn 1872 Borriss	ABQL0 100000 1	99.45	8/1442	100
8	<i>Bacillus</i> sp. subsp. <i>plantarum</i>	FZB42(T)	等人 2011 Nakamu	CP0005 60	99.38	9/1442	100
9	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	NRRL B-2304 9(T)	ra 等人 1999	CP0029 05	99.38	9/1442	100
10	<i>Bacillus</i>	JCM	Nakamu	AB0211	99.38	9/1442	100

	atrophaeus	9070(T)	ra 1989 Borris (ex Fukumo to 1943) Priest 等人 1987 Madhai yan 等	81 FN5976 44	99.31	10/1442	100
11	<i>Bacillus</i> sp. subsp. <i>amyloliquefacie</i> ns	DSM 7(T)					
12	<i>Bacillus</i> <i>methyilotrophicu</i> s	CBMB 205(T)	人 2010 (Weigm ann 1898) Chester 1901 Palmisa no 等	EU1948 97	99.09	13/1434	98.3
13	<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i>	ATCC 14580(T)	1898) Chester 1901 Palmisa no 等	AE0173 33	98.06	28/1441	100
14	<i>Bacillus</i> <i>sonorensis</i>	NRRL B-2315 4(T)	人 2001 Shivaji 等人	AF3021 18	97.7	32/1389	95.7
15	<i>Bacillus aerius</i>	24K(T)	2006 Shivaji 等人	AJ8318 43	97.36	38/1442	100
16	<i>Bacillus</i> <i>aerophilus</i>	28K(T)	2006 Shivaji 等人	AJ8318 44	97.15	41/1441	100
17	<i>Bacillus</i> <i>altitudinis</i>	41KF2b (T)	2006 Shivaji 等人	AJ8318 42	97.15	41/1441	100
18	<i>Bacillus</i> <i>stratosphericus</i>	41KF2a (T)	2006 Satomi 等人	AJ8318 41	97.15	41/1441	100
19	<i>Bacillus safensis</i>	FO-036 b(T)	2006	AF2348 54	97	43/1434	97.5

【0140】 *recA* 序列s

【0141】*recA* 基因放大之PCR反應設定為將2 μ L之該潔淨DNA萃取物與25 μ L之GoTaq Green Mastermix、1.5 μ L正向引子 (*recAf*, 5'-GATCGTCARGCAGSCYTWGAT -3', SEQ ID NO:6)、1.5 μ L反向引子 (*recAr*, 5'-TTWCCRACCATAACSCCRAC -3', SEQ ID NO:7)結合。以無菌之無核酸水將該反應量補足至50 μ L。將連鎖反應器設定為以下條件供進行PCR反應：5分鐘之95°C（初始變性），以30秒之95°C進行30次循環，30秒之45°C及1分鐘之72°C，而後為5分鐘之72°C（最終延伸）及最終保溫4°C。

【0142】將5 μ L之等份PCR產物置於1%瓊膠上以電泳法確認其大小、量及質，而後將該產物帶與一質量階梯對照。

【0143】以MoBio PCR 清理組去除該PCR產物中之多餘引子、核苷酸、酵素及型板。利用上述引子將清理後之PCR產物直接定序。

【0144】利用BioEdit軟體對齊正向與反向序列，產生505 bp 保留序列。

【0145】利用BLAST比對F727 (SEQ ID NO:10) *recA*之基因保留序列與代表性之細菌序列。最符合者之匹配為液化澱粉芽孢桿菌完整基因組（庫藏編號CP002927.1），具有92%相似性。

【0146】 *phoR* 序列s

【0147】*phoR* 基因放大之PCR反應設定為將2 μ L之該潔淨DNA萃取物與25 μ L之GoTaq Green Mastermix、1.5 μ L正向引子 (*phoR-f*: 5'-TTYARYTCATGRGAVACATT -3', SEQ ID NO:11)、1.5 μ L反向引子(*phoR-r*: 5'-GGNTAYAAANARGAGGAGCC -3', SEQ ID NO:12)結合。以無菌之無核酸水將該反應量補足至50 μ L。將連鎖反應器設定為以下條件供進行PCR

反應：5分鐘之95°C（初始變性），以45秒之95°C進行35次循環，45秒之48°C及1分鐘之72°C，而後為10分鐘之72°C（最終延伸）及最終保溫4°C。

【0148】以電泳法將5uL之等份PCR產物置於1% 瓊膠上以電泳法確認其大小、量及質，而後將該產物帶與一質量階梯對照。

【0149】以MoBio PCR 清理組去除該PCR產物中之多餘引子、核苷酸、酵素及型板。利用上述引子將清理後之PCR產物直接定序。

【0150】利用上述之反向引子取得998核苷酸 *phoR*序列。

○

【0151】利用BLAST與*phoR*反向序列比對。最符合者之匹配為液化澱粉芽孢桿菌完整基因組，具有83%相似性。

【0152】實例2：分離株F727之脂肪酸組成

【0153】於MIDI Labs, Inc (Newark, DE) 根據商業標準確認分離株F727之脂肪酸特性資料。結果示於表2。將分離株F727脂肪酸特性資料與RTSBA6 6.10脂肪酸資料庫比對，顯示分離株F727與枯草芽孢桿菌之相似性指數為0.885。

○

【0154】表2

脂肪酸	%	脂肪酸	%
13:0 iso	0.44	16:0 iso	2.57
13:0 anteiso	0.32	16:1w11c	2.53
14:0 iso	1.09	16:0	2.99
14:0	0.45	17:1w10c	2.92
15:0 iso	26.19	Sum 4	0.82
15:0 anteiso	37.58	17:0 iso	12.59
16:1 w7c OH	0.56	17:0 anteiso	8.71
		18:0	0.23

【0155】實例3：以MALDI-TOF蛋白質特性資料進行之分離株F727特性描述

【0156】於MIDI Labs, Inc. (Newark, DE)確認分離株F727之MALDI-TOF 質譜蛋白質指紋。分離株F727 之MALDI-TOF蛋白質特性資料與質譜資料庫中之其他微生物不同。雖與*Bacillus vallismortis*、*Bacillus mojaviensis* 及*Bacillus subtilis* 之蛋白質特性資料有些許相似性，但相似性分數均不足以表示基因匹配。

【0157】實例4：芽孢桿菌分離株F727之生物化學特性描述

【0158】革蘭氏染色

【0159】細胞壁主要是由肽糖組成，因此革蘭氏染色法便是利用細胞壁之物理特性區分細菌。革蘭氏陽性細菌之肽糖層較厚，染色結果會呈紫／藍色；而革蘭氏陰性細菌細胞壁之肽糖層較薄，呈現紅色／粉紅染色。分離株F727經革蘭氏染色後之顯微鏡檢驗顯示紫色細胞，意味芽孢桿菌分離株F727為革蘭氏陽性細菌。

【0160】尿素酶活性

【0161】 尿素酶測試係用於偵測尿素酶之酵素活性，此種酵素可催化尿素轉換為氨與重碳酸鹽。尿素培養液包含尿素與pH指示劑酚紅。酚紅在酸性環境中轉為黃色，在鹼性環境中呈現粉紅色。若尿素酶具有有效素活性，培養液中之尿素會被降解而產生氨，培養基則轉為粉紅，表示陽性檢測結果。

【0162】 以分離株F727接種後，尿素培養液顏色由紅轉黃，表示尿素酶活性測試結果為陰性。因此，芽孢桿菌分離株F727創造酸性環境，並無尿素酶活性存在。

【0163】過氧化氫酶活性

【0164】 過氧化氫酶測試係用於偵測過氧化氫酶之酵素活性。過氧化氫酶可將過氧化氫分解為氧與水。具有過氧化氫酶活性之有機體在以過氧化氫處理時會產生氣泡。芽孢桿菌分離株F727培養物接觸試劑數秒內就開始起泡，表示此有機體具有過氧化氫酶活性。

【0165】氧化酶活性

【0166】 氧化酶測試係用於偵測細胞色素c之氧化酶活性。於呼吸鏈中含有細胞色素c之細菌為氧化酶陽性，會將試劑轉為紫色。反之，氧化酶陰性之細菌不會使試劑氧化，因此試劑仍保持無色。芽孢桿菌分離株F727將試劑轉為紫色，證明其具有氧化酶活性。

【0167】TSI瓊脂

【0168】 三糖鐵(TSI)瓊脂係用於判定微生物使葡萄糖、乳糖及／或蔗糖發酵之能力，以及腸內細菌產生硫化氫之能力。培養基含有pH指示劑酚

紅及硫酸亞鐵，可與硫化氫反應而產生黑色沉澱物。測試分離株F727時，斜面仍為紅色，而尾端由紅轉黃，且未觀測到黑色。上述結果顯示分離株F727並不會生成硫化氫，且僅會使葡萄糖發酵，而不會使乳糖或蔗糖發酵。

【0169】 抗生素易感性

【0170】於Muller-Hinton培養基上利用抗生素試片測試芽孢桿菌分離株F727之抗生素易感性。將一圈F727再懸浮於1 mL之無菌去離子水中，並將100 μ L之此懸浮液刮入 Mueller-Hinton瓊脂培養皿。待吸入瓊脂後，將預先裝好抗生素之試片放置於培養皿上，並將培養皿以25 °C 培養48小時。結果示於表3。

表 3：芽孢桿菌 F727 對各種抗生素之易感性

	濃度 (ug)	易感性*
四環素	30	+++
卡那黴素	30	+++
紅黴素	15	+++
鏈黴素	10	++
青黴素	10	+++
氨比西林	10	+++
氧四環素	30	+++
氯黴素	30	+++
賽普洛	5	+++
慶大黴素	10	+++
達比黴素	100	+++
頭孢呋辛酯	30	+++
亞胺硫黴素	10	+++
磺胺甲基噁唑-三甲氧 苄氨嘧啶	23.75/ 25	+++

【0171】* +++表示高度易感（無生長）；++表示中度易感（減緩生長）；-表示無易感性

【0172】API ZYM試紙

【0173】API ZYM試紙 (BioMerrieux)可供測試微生物之各種酵素活性。按照製造商指示進行檢測，結果歸納於表4。

表 4

編號	檢驗酵素	基質	pH	解釋		結果
				陽性	陰性	
1	對照組		8.5	無色或若樣本本身有強烈顏色即為樣本顏色		-
2	鹼性磷酸酵素	2-萘基磷酸鹽	6.5	紫	無色或極淡黃色	++
3	酯酵素 (C 4)	2-萘基酪酸鹽	7.5	紫		++
4	酯酵素解脂酶 (C 8)	2-萘基辛酸鹽	7.5	紫		+
5	解脂酶 (C 14)	2-萘基肉豆蔻酸鹽	7.5	紫		-
6	亮胺酸胺基肽酶	L-亮胺醯基-2-萘基醯胺	7.5	橘		+
7	纈胺酸胺基肽酶	L-纈胺醯基-2-萘基醯胺	7.5	橘		+
8	胱胺酸胺基肽酶	L-胱胺醯基-2-萘基醯胺	7.5	橘		-
9	胰蛋白酵素	N-苯甲醯基-DL-精胺酸-2-萘基醯胺	8.5	橘		-
10	α -胰凝酪酶	N-戊二基-苯丙胺酸-2-萘基醯胺	7.5	橘		-
11	酸性磷酸酵素	2-萘基磷酸鹽	5.4	紫		+++

12	萘酚-AS-BI-磷酸 水解酶	萘酚-AS-BI-磷酸鹽	5.4	藍	+++
13	α -半乳糖苷酶	6-Br-2-萘基- α D-半乳 糖苷	5.4	紫	-
14	β -半乳糖苷酶	2-萘基- β D-半乳糖苷	5.4	紫	-
15	β -葡萄糖醛酸酶	萘酚-AS-BI- β D-葡萄 糖醛酸	5.4	藍	-
16	α -葡萄糖苷酶	2-萘基- α D-葡萄糖苷	5.4	紫	-
17	β -葡萄糖苷酶	6-Br-2-萘基- β D-葡萄 糖苷	5.4	紫	-
18	N-乙醯基- β -乙醯 葡萄糖胺酶	1-萘基-N-乙醯基 - β D-葡萄糖胺苷	5.4	棕	-
19	α -甘露糖苷酶	6-Br-2-萘基- α D-甘露 糖苷	5.4	紫	-
20	α -岩藻糖苷酶	2-萘基- α L-岩藻糖苷	5.4	紫	-

【0174】 API 20 NE試紙

【0175】 API[®] 20 NE試紙之20支微管中含有脫水基質。於習知測試件上接種芽孢桿菌分離株F727懸浮液以重新構成培養基。發生代謝後微管便會改變顏色。於同化作用測試件上接種最少量之培養基與芽孢桿菌分離株。若細菌能夠利用基質，則F727會有所成長。根據製造商讀數表分析反應，並將結果歸納於表5。

表 5

陽性： +

陰性： -

微弱： ±

測試	有效成份	反應／酵素	結果		
			陰性	陽性	總結
NO ₃	硝酸鉀	將硝酸鹽還原成 亞硝酸鹽	NIT 1 + NIT 2，5 分鐘後讀取		+
			無色	粉紅-Red	
		將硝酸鹽還原成 氮	ZN，5 分鐘後讀取		-
			粉紅	無色	
TRP	L-色胺酸	吲哚產生（色胺酸）	JAMES，立即讀取		-
			無色 淡綠／ 黃	粉紅	
GLU	D-葡萄糖	發酵（葡萄糖）	藍到綠	黃	-
ADH	L-精胺酸	精胺酸二水解酶	黃	橘／粉紅／ 紅	-
URE	尿素	尿素酶	黃	橘／粉紅／ 紅	-
ESC	七葉靈檸檬 酸鐵	水解（β-葡萄糖苷 酶）（七葉靈）	黃	灰／棕／黑	+
GEL	明膠 （牛來源）	水解（蛋白酶）（明 膠）	無染料擴散	黑色染料擴 散	+

PNG	4-對硝基苯 -βD-半乳糖 苷	B-半乳糖苷酶(對 -對硝基苯-βD-半 乳糖苷)	無色	黃	-
[GLU]	D-葡萄糖	葡萄糖同化作用	透明	不透明	+
[ARA]	L-樹膠醛糖	樹膠醛糖同化作 用	透明	不透明	-
[MNE]	D-甘露糖	甘露糖同化作用	透明	不透明	-
[MAN]	D-甘露醇	甘露醇同化作用	透明	不透明	+
[NAG]	N-乙醯基-葡 萄糖胺	n-乙醯基-葡萄糖 胺同化作用	透明	不透明	+
[MAL]	D-麥芽糖	麥芽糖	透明	不透明	+
[GNT]	葡萄糖酸鉀	葡萄糖酸鉀同化作 用	透明	不透明	-
[CAP]	癸酸	癸酸同化作用	透明	不透明	-
[ADI]	己二酸	己二酸同化作用	透明	不透明	-
[MLT]	蘋果酸	蘋果酸鹽同化作 用	透明	不透明	+
[CIT]	檸檬酸鈉	檸檬酸鈉同化作 用	透明	不透明	±
[PAC]	苯乙酸	苯乙酸同化作用	透明	不透明	-

【0176】實例5：化合物 A、B及C之分離與特性描述

【0177】純化程序

【0178】利用以下步驟（概述於圖1）對萃取自芽孢桿菌分離株F727細胞培養物之化合物進行純化。

【0179】用安伯來特XAD-7樹脂（Asolkar 等人，2006年）從芽孢桿菌分離株F727之1-L 發酵物中萃取培養液，方法為將細胞懸浮液在室溫下以155 rpm之轉速搖動兩小時。以紗布濾得樹脂與細胞團，並用去離子水洗去鹽。而後將樹脂和細胞團連同紗布浸泡於丙酮中2小時，接著濾去丙酮，並在真空下利用旋轉蒸發器進行乾燥，藉此取得粗萃取物。

【0180】以逆相C18 真空液相層析法（VLC, H₂O/CH₃OH；梯度80:20至0:100%）粗萃取物劃分為 6個片段。將此等片段以旋轉蒸發器濃縮至乾燥，並透過瓊脂盤檢驗確認結果乾燥剩餘物之生物活性。見下文實例16。檢驗結果顯示C-18 VLC片段3具有殺真菌活性。

【0181】將活性片段3以逆相HPLC (Spectra System P4000, Thermo Scientific)處理，取得純化合物，而後將之交付上述生物檢驗以定位／鑑別該活性化合物。

【0182】於HPLC C-18柱 (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30) 上以水：乙腈(含0.01% TFA)梯度溶劑系統(0-10分鐘； 70%水CH₃CN，10-20分鐘； 70-45% 水 CH₃CN，20-40分鐘； 45 - 30 %水CH₃CN，40-60分鐘； 30-0% CH₃CN，60-65分鐘； 100 % CH₃CN，65-70分鐘； 0 - 30%水CH₃CN)以8 mL/min流速及210 nm紫外線偵測等條件將活性片段3進一步純化。取得三種 純化化合物：

【0183】化合物 A (F727F3H11)之停留時間為35.95分鐘，

【0184】化合物 B (F727F3H14) 之停留時間為37.26分鐘，以及

【0185】化合物 C (F727F3H17) 之停留時間為38.11分鐘。

【0186】質譜法

【0187】在Thermo Finnigan LCQ DECA XP^{Plus} 電噴灑(ESI)儀器之LCQ DECA XP^{Plus} 質譜儀 (美國加州聖瓊斯Thermo Electron Corp.) 上利用全掃描模式中之陽性及陰性離子化模式(m/z 100-1500 Da)進行活性峰值之質譜分析。Thermo高效液相層析(HPLC)儀器配備有 Finnigan Surveyor PDA加偵測器、自動採樣器、MS泵及4.6 mm x 100 mm之 Luna C18 5 μ m柱 (Phenomenex)。溶劑系統包含水(溶劑A)與乙腈(溶劑B)。流動相開始於10% 溶劑 B, 於20分鐘之間線性增加至100%溶劑 B, 而後保持4分鐘, 最後在3分鐘之間回到10%溶劑 B, 並維持3分鐘。流速為0.5 mL/min。注射量為10 μ L, 將樣本在自動採樣器內保持於室溫。

【0188】用LC-MS透過LC 及逆相層析來分析該化合物。本發明化合物之質譜法分析係採以下條件進行：噴霧氣及輔助氣之氮流速分別固定為30及15 arb。進行電噴灑離子化, 採用之噴灑電壓為 5000 V且毛細電壓為35.0 V。毛細溫度設定為400°C。以Xcalibur軟體分析資料。

【0189】根據負離子化模式中之1043.84 (M - H)分子離子峰(圖2), 判定化合物 A (F727F3H11)之分子量經判定為1044。此判定結果為正模式ESIMS之離子化圖形所支持, 圖形顯示分子離子峰位於1045.48 (M + H) 且擬分子離子峰於 1067.55 (M + Na) (圖3)。

【0190】根據負離子化模式中之1057.83 (M - H)分子離子峰(圖4), 判定化合物 B (F727F3H14)之分子量經判定為1058。此判定結果為正模式ESIMS之離子化圖形所支持, 圖形顯示分子離子峰位於1059.56 (M + H) 且

擬分子離子峰於 1081.63 (M + Na) (圖5)。

【0191】根據負離子化模式中之1071.85 (M - H)分子離子峰 (圖6)，判定化合物 C (F727F3H17)之分子量經判定為1072。此判定結果為正模式 ESIMS之離子化圖形所支持，圖形顯示分子離子峰位於1073.57 (M + H) 且擬分子離子峰於 1095.62 (M + Na) (圖7)。

【0192】層析片段與純化合物之抗真菌測試其他檢驗方法

【0193】於中等尺寸培養皿之各四分之一部分放入一片濾紙盤 (共四片)。每片濾紙盤均距離培養皿中央 2 cm。將15 μ L之層析柱片段或純化合物 (20 mg/mL) 倒在兩個相對紙盤的表面。將乙醇倒在另兩個紙盤做為對照組。紙盤上倒好料後，將小真菌塊 (約1 x 1 cm)放在培養皿中央。使用 *Bipolaris maydis*、*Botrytis cinerea* s、*Sclerotinia homeocarpa* 及 *Rhizoctonia solani*為真菌病原體。將培養皿 於25°C培養 48小時，之後測量各紙盤周圍之抑制區域。VLC片段3與化合物A、B及C之結果示於圖8；顯示三種化合物皆具有顯著之殺真菌活性。

【0194】化合物 A、B及C之胺基酸分析

【0195】以液相水解 (6N HCL, 1% 酚, 110°C, 24小時, 真空) 方式水解化合物 A (F727F3H11, 0.05 mg)。冷卻後，使反應混合物乾燥，並將水解後之產物溶解於 Norleu稀釋緩衝液至1.0 mL量。取A 50 μ l之此樣本放上離子交換柱以進行分析。

【0196】為取得標準與進行校正，使用Na型Hitachi 8800 (Sigma, A-9906) 上水解蛋白用之胺基酸標準溶液來決定反應因子，藉此校正Hitachi 8800分析儀對所有胺基酸之測量。每次注射均包含正亮胺酸為內部標準，以便修

正樣本體積與層析變因變動下之結果。系統中使用Pickering鈉緩衝液、Pierce測序級HCl（水解）、Transgenomic 離子交換柱及加州大學戴維斯分校分子結構處(MSF)之優化方法。就樣本中之個別胺基酸進行報告。化合物 A 中之胺基酸為穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）。

【0197】化合物 B及 C之胺基酸組份亦用相同方式分析。發現化合物 B及C具有與化合物 A相同之胺基酸且比例相同。



【0198】實例6：芽孢桿菌分離株F727對番茄植物灰黴病菌之效果



【0199】以F727發酵物表層浮質處理番茄植物(*Solanum lycopersicum*) var. Roma。對每株植物噴灑約3 ml之無細胞發酵表層浮質。讓植物乾燥後再接種2 ml之*Botrytis cinerea*孢子懸浮液，其濃度為每毫升 6.67×10^7 孢子。對照組植物則噴灑去離子水，兩組陰性對照組植物僅噴灑孢子（濃度為 1×10^7 spores/ml及 6.67×10^7 spores/ml），而一組陽性對照組植物噴灑SWITCH® 65.2 WG（Cypronidil 與 Fludioxonil，Bayer Crop Sciences, Inc.銷售），比例為14oz/100gal/acre。每種處理均製做一式三份。將植物放入生長室中之透明塑膠箱，於照明恆溫控制環境下生長。處理後8天進行疾病評等。評估植物疾病嚴重度之方式為目視評估 染病葉片面積，取得疾病等級。見，例如，WC James（1971年）之「A Manual of Assessment Keys in Plant Diseases」American Phytopathological Society，ISBN 978-0-89054-081-7。結果示於圖9，可看出疾病嚴重度從65%（感染，未處理對照組）降低至40%（經F727表層浮質處理之感染植物）。

【0200】其他實驗中測試F727 WCB之兩倍、四倍及十倍稀釋。利用兩

種發酵物之 WCB觀察三種稀釋版本之疾病嚴重度降低效果。

【0201】實例7：芽孢桿菌F727 對萵苣露霉病之效果

【0202】種植萵苣植物(*Lactuca sativa*) var. Celtuce，密度為每盆四株幼苗。對每盆噴灑2ml之 F727發酵表層浮質。讓植物乾燥後再接種2ml之 *Bremia lactuca*（露霉病）孢子懸浮液 (1×10^5 spores/ml)。每種處理一式五份。將處理過之植物培養於加蓋托盤中，生長室溫度設定為15°C，曝光週期12小時。處理後10天評估疾病嚴重度，如實例6所述。

【0203】結果示於圖10。未處理對照組之平均疾病嚴重度為54.47%，F727處理過之植物僅有14.64%之疾病嚴重度。F727 處理過植物之疾病嚴重度相當於經化學控制 RIDOMIL® GOLD EC 處理之植物(4% w/w metalaxyl-M and 64% w/w mancozeb) (150 ppm a.i.) (Syngenta)，其嚴重度為11.67%。

【0204】其他實驗中測試F727 WCB之兩倍、四倍及十倍稀釋。利用兩種發酵物之 WCB觀察三種稀釋版本之疾病嚴重度降低效果。

【0205】實例8：芽孢桿菌 F727與 ELEVATE之效果比較

【0206】以3ml之 F727發酵表層浮質處理番茄植物(*Solanum lycopersicum*) var. Roma。讓植物乾燥後再接種約2ml之*Botrytis cinerea*孢子懸浮液 (2.8×10^7 spores/ml)。兩小時後或待第一次處理乾燥後，對一部分受感染植物再次噴灑F727。亦對接種植物進行水（陰性對照組）及ELEVATE® 50 WDG (Fenhexamid, Bayer Crop Science, Inc.)處理，後者為陽性對照組。

【0207】每種處理一式四份。處理後九天以實例6所述方式評估疾病嚴重度。結果示於圖11。水對照組之疾病嚴重度為 38.3%，而陽性對照組

(ELEVATE® 50 WDG, Fenhexamid, Bayer Crop Science, Inc.)則使疾病嚴重度降低至13.33%。以1x及 2x F727表層浮質處理之植物其疾病嚴重度分別為8.3%及 5%。

【0208】實例9：F727表層浮質對椒上灰黴病感染之作用

【0209】對椒植物(*Capiscicum annuum*) var. Serrano噴灑約2ml之F727表層浮質後待乾。對植物接種2 ml之*Botrytis cinerea*孢子懸浮液 of (2.7×10^7 spores/ml)。植物之處理均為一式三份。處理後13天，評估疾病嚴重度，並將之與未處理對照組(噴水)及陽性對照組(依標籤率噴灑 Elevate® 50 WDG (Fenhexamid, Bayer Crop Science, Inc.)) 比較。

【0210】結果示於圖12，顯示F727對感染灰黴病之植物之疾病控制可與Elevate®處理相比。

【0211】實例10：三種培養基發酵物所產F727 全細胞液、表層浮質與細胞對黃瓜白粉病之效果評估

【0212】於三種不同生長培養基(SPY, SMP and TSB)進行F727細胞之發酵。對兩週大黃瓜植物(*Cucumis sativus*) var. SMR58噴灑約3 ml之各種發酵F727全細胞液、F727表層浮質或F727細胞。將細胞聚集後再懸浮於10 mM 硫酸鎂以便噴灑。每種處理均準備相同之四份。待植物乾燥兩小時後再噴灑約2 ml之白粉病孢子懸浮液。此懸浮液係自染病植物製得，濃度為 3.0×10^5 spores/mL。之後將植物培養於生長室，待發病，再以實例6所述方式評估疾病嚴重度。

【0213】結果之疾病控制百分比示於圖13。三種培養基產生之全細胞、全細胞液及細胞表層浮質在黃瓜上均展現抗真菌活性。

【0214】實例11：三種培養基發酵物所產F727 全細胞液、表層浮質與細胞對番茄灰黴病之效果評估

【0215】對兩週大番茄植物(*Solanum lycopersicum*) var. Stupice噴灑約2 ml之F727全細胞液、F727表層浮質及 F727細胞，每種類型均以三種不同生長培養基(SPY、SMP及TSB)所培養出之發酵物製作。將細胞聚集後再懸浮於10 mM 硫酸鎂以便噴灑。每種處理均準備相同之三份。待植物乾燥一小時，然後放置於潮濕條件下使其氣孔開啓。從以2%之Sabouraud 麥芽糖培養液培養十天之瓊脂培養皿取料製作*Botrytis cinerea*孢子懸浮液，濃度為約 1.0×10^7 spores/mL。對每株植物噴灑1 ml之上述懸浮液。將植物培養於生長室中，設定曝光週期為12小時，直到發病，再以實例6所述方式評估疾病嚴重度。

【0216】結果之疾病控制百分比示於圖14。三種培養基產生之全細胞、全細胞液及細胞表層浮質在番茄上均展現抗真菌活性。

【0217】實例12：F727 全細胞液、商業芽孢桿菌型產品與 F727 全細胞液混合 Regalia®對黃瓜白粉病之效果評估

【0218】對兩週大黃瓜植物(*Cucumis sativus*) var. SMR58之第一片真葉噴灑約3 mL之：Regalia® 5% (*Renoutria sachalinensis*, Marrone Bio Innovation, Inc., Davis, CA) 比例1:2000、Regalia® 5%比例1:200、F727 全細胞液、F727 全細胞液 + Regalia® 5%比例1:2000、Serenade® (Bayer Crop Science, Inc.) 比例1:200、Sonata® (Bayer Crop Science, Inc.)比例 1:200，Vacciplant® (Laboratoires Goëmar S.A.) 比例40 µL/50 mL、Companion® (Growth Products, Ltd.) 比例1:200，以及Double Nickel 55® (Certis USA,

L.L.C.) 比例0.06 g/50 mL。每種處理均為一式四份。待植物乾燥兩小時，而後對每株植物約噴灑2 ml之白粉病孢子懸浮液（濃度為 3.0×10^5 spores/mL）。將植物放置於生長室培養，直到發病。

【0219】圖15之結果顯示芽孢桿菌分離株F727發酵物之全細胞液（圖中標示為 MBI-110 WCB）較許多現有殺真菌劑更能有效對抗白粉病。搭配及未搭配F727表層浮質之Regalia[®]結果示於表6。柯比(Colby)協同係數指出F727 全細胞液與1:2000比例之Regalia[®] 5%可產生協同作用。

【0220】表6

處理	平均嚴重度	%控制	柯比預期值	柯比協同係數
F727 WCB	92.5	2.6	-	-
Regalia 1:2000 (v/v)	30	68.4	-	-
Regalia 1:2000 (v/v) in F727 WCB	8	91.6	69.3	1.32

【0221】實例13：F727 全細胞液、Regalia[®] 與 Double Nickel 55[®] 對蕃茄晚疫病之效果評估

【0222】在番茄植物(*Solanum lycopersicum*) var. Stupice之二真葉階段時噴灑2 ml之F727 全細胞液、Regalia[®]比例1:200 (Marrone Bio Innovations, Inc.)及Double Nickel 55[®]比例0.06 g/50mL (Certis USA, L.L.C.)。待植物乾燥後再以*Phytophthora infestans* 孢子溶液噴灑覆蓋。此溶液係從受感染之番茄葉片製得，濃度為 10^4 spores/mL。將植物培養於20°C之生長室，輔以人工光

線照明。處理後3天再以實例6所述方式評估疾病嚴重度。

【0223】圖16之結果顯示芽孢桿菌分離株F727發酵物全細胞液（圖中標示為MBI-110 WCB）對番茄之晚疫病菌感染提供良好之防護功效。

【0224】實例14：白絹病菌之F727控制體外評估

【0225】在液態培養基中進行分離株F727發酵，以離心方式取出表層浮質。半數表層浮質經0.2 μm 之濾紙過濾。將 *Sclerotium rolfsii* 之單菌核放置於 10 cm 培養皿中央，每一培養皿中並放入四片0.5 cm 直徑之紙盤，均距真菌2 cm，且彼此亦為等距。將F727表層浮質、經過濾之F727表層浮質 及濃度0.5 mL/L之Pristine[®] (BASF)以 12.5 μl 之等份加至紙盤，使兩張相對紙盤含總計25 μl 之料，另兩張相對紙盤則為50 μl 。每種處理準備兩個培養皿。將培養皿以25°C培養三天。

【0226】各測試物質之抑制百分比之判定方式是測量各培養皿中菌絲從菌核到生長菌落最遠邊緣之距離，以此判斷生長狀況。圖17之結果顯示F727表層浮質不論過濾與否，在培養皿實驗中均能有效 抑制白絹病菌生長。但未過濾表層浮質均較經過濾者有效，且其有效性可與商業標準相比。

【0227】實例15：大豆立枯絲核菌 之F727控制評估

【0228】對無菌大麥穀粒接種 *Rhizoctonia solani*後培養1-2 週。使穀粒乾燥，以一比一之比例摻混沙粒以製成 *R. solani* 接種體。將此接種體與土壤充分混合，並將每500 ml混合土裝為一盆，澆入100 mL之水並於生長室中培養24小時。製備100%、50%及25%等三種強度之分離株F727全細胞液。各取40 mL澆淋於土壤，並於每盆中植入九枚大豆種子。每一處理準備三份，每份三盆。將植物在生長室中培養 14天。而後評估發芽、植物高度、

鮮芽重及鮮根重。

【0229】測量地上幼枝（表7）、數量（表8）、平均芽重（表9）及平均芽高（表10）。結果顯示F727 全細胞液可使受*R. solani*感染之大豆植物增加芽數、芽重及芽高。

【0230】表7

處理	N	地上幼枝 (三次平均)	StDev	Fisher 分類
1- 非接種對照組；以水處理	3	24.7	1.16	A
2- 非接種對照組；100% F727 全細胞液	3	25.0	1.00	A
3- 1:1600 接種率；100% F727 全細胞液	3	11.0	3.61	B
4- 1:1600 接種率；50% F727 全細胞液	3	11.7	2.52	B
5- 1:1600 接種率；25% F727 全細胞液	3	8.0	3.61	B
6- 1:1600 接種率；水對照組	3	12.0	1.00	B
		ANOVA p <0.0005		LSD $\alpha=0.05$

【0231】表8

處理	N	數量 (三次平均)	StDev	Fisher 分類
1-非接種對照組；以水處理	3	24.7	1.16	A
2-非接種對照組；100% F727 WCB	3	25.0	1.00	A
3- 1:1600 接種率；100% F727 全細胞液	3	18.0	2.65	B
4- 1:1600 接種率；50% F727 全細胞液	3	18.3	1.16	B
5- 1:1600 接種率；25% F727 全細胞液	3	14.7	3.21	B
6- 1:1600 接種率；水對照組	3	15.3	1.16	B
		ANOVA p <0.0005		LSD $\alpha=0.05$

【0232】表9

處理	N	平均芽重 (g) (三次平均)	StDev	Fisher 分類
1-非接種對照組；以水處理	3	22.4	0.87	A
2-非接種對照組；100% F727 WCB	3	24.8	2.09	A
3- 1:1600 接種率；100% F727 WCB	3	11.2	3.23	B
4- 1:1600 接種率；50% F727 WCB	3	12.0	1.71	B
5- 1:1600 接種率；25% F727 WCB	3	8.9	2.88	B
6- 1:1600 接種率；水對照組	3	10.5	1.21	B
		ANOVA p <0.0005		LSD $\alpha=0.05$

【0233】表10

處理	N	芽高 (cm) (三次平均)	StDev	Fisher 分類
1-非接種對照組；以水處理	74	13.1	3.27	A
2-非接種對照組；100% F727 WCB	75	14.0	3.132	A
3- 1:1600 接種率；100% F727 WCB	54	7.9	3.641	B
4- 1:1600 接種率；50% F727 WCB	55	7.3	5.052	B C
5- 1:1600 接種率；25% F727 WCB	44	6.1	5.52	C
6- 1:1600 接種率；水對照組	46	6.0	5.144	C
		ANOVA p <0.0005		LSD $\alpha=0.05$

【0234】實例16：F727對細菌植物病原體控制之體外評估

【0235】於1 ml之無菌水中接種於洋芋葡萄糖瓊脂 (PDA) 培養皿中培養出之以下細菌植物病原體 *Erwinia amylovora*、*Pseudomonas syringae*、*Bacillus cereus*、*Erwinia carotovora*、*Xanthomonas campestris*、*Xanthomonas arboricola* 或 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*。將細菌調製為懸浮液，並將100 μ L之病原體懸浮液刮入 PDA瓊脂培養皿，靜置10-15分鐘待其吸收。將無菌濾紙板放在瓊脂上，並倒入20 μ L之F727 VLC片段（10 mg/mL於甲醇中）或VLC片段之組合。層析片段係從芽孢桿菌分離株F727於V8 培養基之發酵物取得，如以上實例5所述。

【0236】將培養皿培養 24-48小時，而後檢查濾紙盤周圍之抑制區域，藉此判斷病原體對F727片段之易感性。結果示於表11。

【0237】表11：細菌植物病原體對F727片段之易感性

F727 樣本	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Xanthomonas arboricola</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
1. F727-F1	-	+	-	-	-	+	+
2. F727-F2	++	-	-	-	+	-	++
3. F727-F3	++	+	-	-	+	+	+
4. F727-F4	++	+	-	+	-	-	-
5. F727-F5	+	-	+++	+++	-	+	+++
6. F727-F6	+	-	+	-	-	-	+
7. F727-F2+F3	-	-	-	+	-	+	++
8. F727-F3+F5	-	-	+	++	-	-	+++
9. F727-F2+F6	-	-	-	-	-	-	+
10. F727-F4+F5	+	-	++	+++	-	-	+++
11. F727-F4+F6	-	-	++	-	-	-	-
12. F727-F5+F6	-	-	+++	+	-	-	++

【0238】符號： +++ 高度易感，++ 易感，- 具抗性

【0239】片段3展現最大數量之細菌品種抑制作用。故而將此片段再以上述實例5之方式進一步劃分。此外，片段5對*Bacillus cereus*、*Erwinia carotovora*及*Clavibacter*展現抗細菌活性。

【0240】實例17：不同培養基所產F727表層浮質與粗萃取物對真菌病原體發芽控制能力之體外評估

【0241】使分離株F727於12種 不同液態培養基中發酵。於劑量反應孢子發芽實驗中測試表層浮質及粗萃取物樣本。將100 μ L之表層浮質或粗萃取物樣本結合200 μ L之1.5x 洋芋葡萄糖瓊脂 (PDA)放入48孔盤，待其固化。依照表12所示濃度製備真菌植物病原體孢子懸浮液，並將50 μ L之孢子懸浮液放置於PDA／處理混合物之上。將培養皿在25°C中培養3-5天，而後

目視評估真菌孢子發芽情況。

【0242】結果示於表13。所有受測表層浮質均在最低測試濃度(3.13%)抑制所有病原體發芽。粗萃取物之活性依據用以培養F727細胞之培養基而異（粗萃取物之0.4% 稀釋為受測最低濃度）。這表示F727萃取物之活性會受到細胞成長時所用之培養基影響，因此，可利用培養基之不同調整出對於特定病原體之最佳活性。例如，可用M24培養基培養以*Fusarium*為抑制目標之細胞。

○ 【0243】表12

病原體	所用孢子濃度
<i>Fusarium oxysporum f. sp. fragariae</i>	10 ⁴ spores/mL
<i>Botrytis cinerea</i>	10 ⁴ spore/mL
<i>Verticillium dahliae</i>	10 ⁵ spores/mL
<i>Alternaria japonica</i>	10 ⁴ spores/mL

○ 【0244】表13：來自不同培養基之F727 粗萃取物達成預防真菌孢子發芽效果所需之最小抑菌濃度

培養基	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. fragariae</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Alternaria japonica</i>
M1	0.40%	1.56%	0.40%	0.40%
M2	1.56%	3.13%	1.56%	0.78%
M3	0.40%	0.78%	0.40%	0.40%
M4	0.40%	0.78%	0.40%	0.40%
M5	1.56%	無抑制作用	3.13%	0.40%
M6	6.25%	無抑制作用	6.25%	3.13%
M7	25.00%	無抑制作用	12.50%	0.78%
M8	無抑制作用	無抑制作用	50.00%	無抑制作用
M11	0.40%	1.56%	0.40%	0.40%
M12	0.40%	3.13%	0.40%	0.40%
M23	0.40%	1.56%	0.40%	0.40%
M24	0.40%	0.40%	0.40%	0.40%

【0245】實例18：F727植物生長特性之體外評估

【0246】以體外實驗評估分離株F727之植物生長特性，包括溶解磷酸鹽之能力；產生ACC去胺酶、吲哚-3-乙酸(IAA)、攜鐵蛋白（CAS瓊脂）之能力；以及與甲醇生長為單一碳源（AMS瓊脂）之能力。於溴酚藍磷酸鹽瓊脂中評估磷酸鹽溶解性，ACC-去胺酶活性之評估則是採用以ACC為單一碳及氮源之瓊脂培養皿，攜鐵蛋白製造係利用CAS瓊脂進行評估，而甲基營養評估方式則是於礦物鹽瓊脂設定甲醇為唯一碳源。如表14所示，分離株F727於所有植物生長促進特性均呈正向結果。

【0247】表14

	磷酸鹽溶解	ACC-去胺 酶	IAA	CAS 瓊脂	AMS 瓊脂
F727	+++	+++	+	++	++

【0248】符號： +++：極強正向反應、++：正向反應、+：微弱正向反應

【0249】實例19：F727處理後種子之活勢分析

【0250】以1%漂白劑對玉米、大豆、小麥、稻米、高粱及番茄種子進行表面消毒六分鐘，而後用無菌水清洗五次。將種子浸沒於F727懸浮液（以10 mM硫酸鎂製備）中 24小時。使種子乾燥30分鐘，供實驗#1使用，乾燥過夜者供實驗#2使用。將種子放在濕紙巾上數天待其發芽，之後測量種子之總鮮重。

【0251】結果示於表15，顯示芽孢桿菌分離株F727細胞可促進玉米、大豆、高粱及番茄之生長。

【0252】表15

	實驗#1		實驗#2	
	總鮮重 (公克)		總鮮重 (公克)	
	對照組	F727	對照組	F727
玉米 [#]	14.06	13.81	玉米*	22.96 25.67
大豆	5.46	12.22	大豆	18.65 15.34
小麥	3.83	3.61	小麥	3.19 3.2
稻米	1.47	1.32	稻米	1.31 1.25
高粱	0.89	2	高粱	1.12 1.346
番茄	0.38	0.58	番茄	0.34 0.43

【0253】# var. Kandy Korn

【0254】* var. Trucker's Favorite Yellow、Boone County White及 Silver King.

【0255】實例20：對黑麴菌之抗真菌活性

【0256】進行沾浸實驗以評估芽孢桿菌分離株F727發酵物之全細胞液(WCB)對於收穫後水果*Aspergillus niger*之抑制效果。測試之WCB版本為無稀釋，以及用無菌水稀釋至5%、20%及50%濃度。

【0257】將無菌青葡萄浸於各濃度之 WCB五秒，然後放置於保鮮箱中之架上。待水果乾燥後，對每一保鮮箱噴灑24次調整為 3×10^3 spore/ml 之黑麴菌接種體。添加100 ml之去離子水至各箱中果架下方以增加濕度，而後封起保鮮箱，置於室溫中培養。實驗共計兩個保鮮箱，各裝有每種處理 5 顆葡萄。以水處理為陰性對照組，市售產品 Switch為陽性對照組。

【0258】觀察各葡萄上之菌絲覆蓋程度判定果粒之患病百分比。表16之結果顯示F727 WCB具有顯著之抗麴菌活性。

【0259】表16. 以F727 WCB沾浸處理並生長12天後之葡萄黑麴菌疾病

百分比

處理	平均 % 疾病	分類
水	71	A
5% WCB	77.5	A
20% WCB	34	B
50% WCB	20.5	BC
100% B. WCB	10	C
Switch @ 14 oz/gal	3.5	C

【0260】實例21：於玉米上之生長 促進效果

【0261】將玉米種子種植於盆栽混合土，所用盆體直徑為4英吋，栽種密度為每盆10顆種子。埋好種子後之盆栽於種植時及一週後分別澆淋F727全細胞液。將盆栽置於溫室中培養。每盆總計10株植物，每種處理各備9盆以供評估之用。

【0262】生長兩週後測量總鮮重。對照組植物（澆水）之平均鮮重為 21.48 ± 4.02 g，而澆淋F727 WCB之植物其平均鮮重為 26.5 ± 3.55 g。經Minitab ANOVA Tukey判定，此等差異具有統計上之顯著性。實驗結果再次證明F727 WCB 具有促生功效。

【0263】實例22：以F727全細胞液澆淋土壤控制萵苣之露菌病

【0264】從種植於培養箱中之受感染植物上取下含孢子葉片，將之置於50 ml之去離子水中搖晃，以取得露菌病 (*Bremia lactucae*)孢子。之後將液體以100 μ m尼龍篩網過濾。用血球計點算過濾後液體中之孢子數量，將液

體以去離子水調整為 5×10^4 spores/ml濃度。

【0265】於SPY 培養基中以25°C種植芽孢桿菌品種F727 24-72小時，以取得製備全細胞液 (WCB)之原料。

【0266】將萵苣 (c.v. Celtuce)種植於2.5英吋之盆中，密度為每盆6株。植物所在之生長室設定為 16°C，12小時曝光週期。經10日之生長後，於土壤澆淋20 ml之F727 WCB。

【0267】澆淋後一小時，將約1 ml之上述露菌病孢子懸浮液噴灑於各盆萵苣植物上。接種後之 48小時將盆栽放置於加蓋塑膠托盤上培養，之後改為以16°C 及12小時曝光週期之條件繼續培養8天。

【0268】針對每片子葉觀察葉片表面染病比例以評估疾病嚴重度，並求得各盆植物之平均嚴重度。利用t-test方式比較處理（土壤澆淋）與未處理對照組 (UTC)植物之結果，示於表17及圖18。結果顯示以F727全細胞液澆淋之土壤中所種萵苣植物之露菌病嚴重度在統計上顯著降低 ($p=0.0036$)。

【0269】表17：F727 WCB 土壤澆淋對萵苣露菌病感染之作用

【0270】（兩份樣本 t-Test 假設變異相同）

	MBI-110	
	UTC	澆淋
平均疾病嚴重度 (%)	69.49306	32.125
變異	342.5953	345.2292
觀察	12	4
合併變異數	343.1597	
假設平均差異	0	
Df	14	
t Stat	3.49392	
P(T<=t) 雙尾	0.003578	
t 臨界雙尾	2.144787	

【0271】實例23：F727全細胞液 與液化澱粉芽孢桿菌 於控制黃瓜白粉病之協同作用

【0272】以去離子水沖洗感染黃瓜葉片並用兩層紗布過濾沖洗液，藉此製得*Sphaerotheca fuliginea*接種體。

【0273】對二真葉階段之黃瓜植物噴灑 2 ml之處理液（見以下），待其乾燥三小時，接著將2 ml之*Sphaerotheca fuliginea*接種體（濃度為 2.5×10^5 conidia/ml）刷在葉片上，完成對植物之接種。

【0274】處理液如下（每種處理準備三份）：

【0275】1. 水（陰性對照組）

【0276】2. F727全細胞液（全強度）

【0277】3. F727全細胞液（50% 強度）

【0278】4. F727全細胞液（全強度）+ Double Nickel 55 (3 lbs./acre)

【0279】 5. F727全細胞液（50% 強度）+ Double Nickel 55 (3 lbs./acre)

【0280】 6. Double Nickel 55(3 lbs./acre)

【0281】使F727於 SPY 培養基中生長 5天，用以製作全細胞液。Double Nickel 55爲市售 液化澱粉芽孢桿菌製劑(Certis USA, Columbia, MD)，其具有廣泛之殺真菌活性，包括對抗白粉病之活性。

【0282】接種後，將植物培養於約25°C之生長室十天，並透過目視評估疾病嚴重度，評估時係以葉片表面患病百分比爲依據。結果示於表18，利用Minitab 16統計軟體 (Minitab, State College, PA)分析，經計算柯比協同作用係數，評估可能具有協同作用。Colby (1967) “Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations.” *Weeds*15:20-22.

【0283】表18：F727全細胞液及與Double Nickel 55混合物於控制黃瓜白粉病之效果

處理	疾病嚴重度 (%)*	%控制 (E)	Ee [#]	E/Ee
水對照組	83.3±2.9 (A)	0.0		
MBI-110 100% WCB	77.5±8.7 (A)	7.0		
MBI-110 50% WCB	61.3±22.9 (A)	26.5		
MBI-110 100% WCB + DoubleNickel 55	25.0±0.0 (B)	70.0	0.12	5.6
MBI-110 50% WCB + DoubleNickel 55	33.6±25.0 (B)	59.5	0.32	1.8
DoubleNickel 55	78.8±13.2 (A)	5.5		

【0284】*呈現之疾病嚴重度資料爲平均值及標準誤差。未帶有相同字

母之平均值爲經Fisher之LSD 測試判斷爲顯著不同者($p < 0.05$)。

【0285】[#] Ee 爲根據柯比公式之預期效應 (Colby, 1967年)：

$Ee = A + B - AB/100$ ，其中A及B爲個別產品之效率；若組合之效率（%控制，E）高於Ee ($E/Ee > 1.0$)，即表示協同作用存在。

【0286】表18結果顯示F727全細胞液與Double Nickel在控制白粉病上展現強大之協同效應，全強度及半強度全細胞液之柯比協同係數分別爲5.6及1.8。

● 【0287】實例24：F727全細胞液滑石粉製劑促進植物生長

【0288】滑石粉製劑之製備方式是混合乾載體 made of 滑石粉(1 kg)、羧甲基纖維素(10 g)、碳酸鈣 (15 g)及F727 全細胞液，而後以 1:1 (w/v)之比例調製乾載體混合料：WCB。將混合物靜置過夜使其乾燥，而後磨細成粉。此製劑可以兩種方式施用。第一種方法是在種植時施用於土壤，置於種子（田間玉米）下方，此爲犁溝間施用。於第二種方法中，將滑石粉製劑溶解於水，並用以滲調種子一夜後再行種植。以水爲對照組。讓植物在溫室中生長兩週，而後秤重。

【0289】此等分析之結果示於表19及20。犁溝間施用使平均鮮重增加16%（表19），而滲調使平均鮮重增加15%（表20）。因此，F727 WCB具有生長促進活性。

【0290】表19：F727 WCB滑石粉製劑之犁溝間施用

	平均鮮重 (g)	SD	%
對照組	25.8	2.63	100
F727	30.18	1.03	116.98

【0291】表20：用 F727 WCB滑石粉製劑進行種子滲調

	每株植物鮮重(g)	%
對照組	0.65	100
F727	0.75	115

【0292】實例25：F727全細胞液劃分

【0293】於一公升適合發酵培養基(SPM、SPY、TSB、V8)中以25°C種植F727菌株48-72小時。用安伯來特XAD-7萃取一公升全細胞液，方法為將細胞懸浮液在室溫下以155 rpm之轉速搖動兩小時。以紗布濾得樹脂與細胞團，並用去離子水洗去鹽。而後將樹脂和細胞團連同紗布浸泡於丙酮中2小時，接著濾去丙酮，並在真空下利用旋轉蒸發器進行乾燥，藉此取得粗萃取物。

【0294】以逆相C18 真空液相層析法將粗萃取物劃分為片段。在前述之劃分辦法中（實例5及圖1），發現片段 3（40-60%甲醇）及4（60-80%甲醇）具有殺有害物活性。為最大化單一片段之活性量，修改逆相 C-18 VLC 程序，如表21所示，以提供 50-80%甲醇之版本（片段4）。之後透過如實例5所述之C-18 HPLC辦法將化合物 A、B及C從片段4純化。

【0295】表21：F727 安伯來特萃取物之VLC片段

片段：	洗提於：
1	20% 甲醇
2	40% 甲醇
3	50% 甲醇
4	80% 甲醇

5	100% 甲醇
6	50% 甲醇：乙腈

【0296】實例26：經MS/MS 分析判定之化合物 A結構

【0297】以電子噴灑離子化質譜法／質譜法 (ESIMS/MS)分析片段4之1044 MW化合物（化合物 A），藉以取得其構成胺基酸之序列。結果示於圖19。基於此等結果，判定化合物 A具有如圖20所示之環狀胜肽結構。

【0298】實例27：化合物與VLC片段之殺細菌活性

【0299】將*Erwinia carotovora*、*Pseudomonas syringae*、*Xanthomonas arboricola*、*Acidovorax avenae subsp. citrulli* 及 *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* were plated on 洋芋葡萄糖瓊脂。累積充份之生物量後，於每種病原體培養皿中各取出一圈病原體，使其懸浮於無菌水中。將每種懸浮液100 uL刮入洋芋葡萄糖瓊脂培養皿，並放置10-15分鐘使其吸收入培養皿中。

【0300】實例25之VLC片段 4及 5，以及實例25中取自VLC片段4之化合物 A (MW=1044)、B (MW=1058)及C (MW=1072) 以5mg/mL之濃度製成甲醇樣本，並用水製做各樣本五組之兩倍依序稀釋版本（0.15625 mg/mL與5 mg/mL間之濃度，以兩倍濃度增額）。將無菌濾紙盤放置於瓊脂培養皿中，並於濾紙盤上放置20 uL之各樣本。將培養皿於 25°C培養3天，而後觀察濾紙盤周圍生長區域之抑制現象，藉以得知病原體對樣本之易感性。若觀測得抑制作用，則判定展現抑菌活性之最低樣本濃度。結果示於表21。片段4及 5對*Erwinia caratovora* 及*Clavibacter michagensis*具有抑菌活性，而化合物 A及B可抑制*Acidovorax avenae*之生長。

【0301】表21：最小濃度樣本抑制病原體生長

病原體	化合物 A	化合物 B	化合物 C	片段 4	片段 5
<i>Erwinia carotovora</i>	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用	1.25 mg/mL	1.25 mg/mL
<i>Pseudomonas syringae</i>	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用
<i>Xanthomonas arboricola</i>	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp.	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用	2.5 mg/mL	0.15625 mg/mL
<i>michiganensis</i>					
<i>Acidovorax avenae</i> subsp.	5 mg/mL	5 mg/mL	無抑制作用	無抑制作用	無抑制作用
<i>citrulli</i>					

【0302】實例28：化合物與VLC片段之殺真菌活性

【0303】將實例25中VLC片段4及5，以及實例25中取自VLC片段4之化合物 A (MW=1044)、B (MW=1058)和 C (MW=1072) 以5mg/mL之濃度製成甲醇樣本。在48孔盤中製備各樣本之不同稀釋版本。各受測樣本最高濃度為500 $\mu\text{g/mL}$ (原始濃度之10%)，之後將樣本連續以兩倍水之增額量稀釋至3.9062 $\mu\text{g/mL}$ 之濃度。將100 μL 之稀釋後樣本加入各孔，接著加入200 μL 之1.5X 洋芋葡萄糖瓊脂 (PDA)，並使混合物靜置固化10-15分鐘。

【0304】將*Colletotrichum cereale*、*Fusarium oxysporum*、*Botrytis cinerea*

及 *Verticillium dahliae* 放置於PDA並在室溫中培養直到菌絲生長覆蓋整個培養皿為止。在各盤中加入無菌水，並用無菌抹刀取出菌絲和孢子。過濾漿狀物以將菌絲與孢子分開。用血球計數算孢子數量，並用水稀釋以調整至 $10^3 - 10^4$ spores/ml之濃度。

【0305】 *Phytophthora capsici* 放置於PARP瓊脂並使其於室溫中成長，直到可觀察到菌絲生長為止。在盤中加入無菌水，並用抹刀取出孢子。使培養皿在Convicon室中以16°C培養1-2小時，直到孢子囊釋放出游走芽孢為止。之後將孢子收集於管中，以血球計計數，並加水調整孢子懸浮液之濃度至 $10^3 - 10^4$ spores/ml。

【0306】將各病原體50 μ L之孢子溶液接種至各樣本孔中。以25°C 之溫度將培養皿培養4-5天，之後觀察各孔中之孢子發芽抑制現象，以得知病原體對樣本之易感性。若觀測得抑制作用，則判定展現抑菌活性之最低樣本濃度。結果示於表22。

【0307】表22：可抑制孢子發芽之樣本最低濃度

病原體	化合物 A	化合物 B	化合物 C	片段 4	片段 5
<i>Botrytis cinerea</i>	500 μg/mL	250 μg/mL	62.5 μg/mL	125 μg/mL	無抑制作 用
<i>Phytophthora capsici</i>	無抑制作 用	無抑制作 用	無抑制作 用	無抑制作 用	無抑制作 用
<i>Fusarium oxysporum</i>	500 μg/mL	500 μg/mL	500 μg/mL	500 μg/mL	無抑制作 用
<i>Verticillium dahliae</i>	500 μg/mL	125 μg/mL	125 μg/mL	125 μg/mL	無抑制作 用
<i>Colletotrichum cereale</i>	125 μg/mL	62.5 μg/mL	31.25 μg/mL	62.5 μg/mL	無抑制作 用

【0308】化合物 A、B及C 與片段4可抑制除番椒疫病菌(*Phytophthora capsici*)以外所有受測真菌病原體之孢子發芽。化合物 C及片段4展現最高之抑菌活性。

【0309】在此說明與請求保護之發明並不受在此所述特定觀點之限制，該等觀點僅為說明本發明之用。任何均等觀點均應屬於本發明之範疇。除此處所述者外，本發明之其他各種修改均為熟悉此技藝人士參照上述說明而可輕易知悉。此等修改亦屬所附申請專利範圍之範疇。若有牴觸，應以本說明書揭露之定義為準。

【0310】本說明書中所提及之各參考文獻其整體於此合併參照。

【符號說明】

【0311】

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

財團法人食品工業發展研究所、2013年11月26日、BCRC 910600

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

以下生物材料已依據布達佩斯條約寄存於美國農業研究菌種保藏中心 (NRRL)，該中心地址為1815 N. University Street, Peoria, Illinois 61604, USA，且其寄存號碼如下：

寄存物	編號	寄存日期
芽孢桿菌品種F727	NRRL B-50768	2012年8月1日

【序列表】(請換頁單獨記載)

F727 FD1 16S序列：

TATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGG
GATAACTCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGC
ATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACC
CGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACTGCTCACCAAGGCAACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTC
GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCTGAATA
GGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGAGT
GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC
GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCG
CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC
GGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCNAGAACCTTACCAN
GTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGG
GCAGAGTGACNNNGGNGCATGGNNGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT

201428097

GTTGGGTAAGTCCCGCACNAGCGCAACCCNTTGATCTTANTTGCCAG
CATTcanttggnnnnnnnnnnnnnnnnaactgccnnnacnanccgnnnaa
ggnnngggnatnacgtnnannnatncnngcccnnnnntgacnnnnnn
cacnccnnnnnnnnnnnnanngnnnnnnnaannanngggncnnnnnngn
nnnnnaaanncnnncncnnnnngngnn (SEQ ID NO:1)

F727 RD1 16S序列：

TCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCG
ACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAA
GGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCG
ATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAAGTGA
ACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTT
CTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGGCATGATGA
TTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTT
AGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCG
TTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCA
TGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGA
TTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAA
TTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTG
AGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTTAATGCGT
TAGCTGCAGCACTAAGGGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCAT
CGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCC
ACGCTTTCGCTCCCTCAGCGTCAGTTACAGACCCAGAGAGTCGCCTTC
GCCCCACTGGTGTTCCCTCCACATCCTCTACGCATTTACCCCGGCTACA

ACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCCAGTTTCC
AATGACCCCTCCCCGGTTGAGCCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAA
GAAACCCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTCCGGACACGCTTG
GCCACCTACGTATTACCGCGCTTGCTTGGCACGTTAGTAGCCGTGGCT
TTTCTGGTTAGTTAACCGTCAGTGCCGCCTATTCGGAACGGTACTTGTT
CTTCCCTACACAGAGCTTTACGATCGAACTCATCACCTCCACGCGCG
TGCTCGTCAGAACTTTCGTCATGCGAAGATCCTACTGCTGCCTCCGTA
GGGTTGGCGTTTCTCTCAGTCCAGTGGCCATACGTCAGTAGCTACCCA
TCGTGCCTAGTGAGCGTTACCTCACCCACCTAGGC (SEQ ID NO:2)

F727 保留16S序列：

TATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGG
GATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGC
ATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACC
CGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTC
GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTCGAATA
GGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCCAAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGGTTTCTTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCCCGGGCTCAACCGGGGAGGGGTCATTGGAAACTGGGGAAAC

○

○

TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTTGTAGCCGGGTGAA
ATGCGTAGAGGATGTGGAGGAACACCAGTGGGGCGAAGGCGACTCTC
TGGGTCTGTAACTGACGCTGAGGGAGCGAAAGCGTGGGGGAGCGAA
CAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAACGATGAGTGCTAA
GTGTTAGGGGGTTCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAAGC
ACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGAT
AGGACGTCCCCTTCGGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
TCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGG
GCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGT
TCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAG
GTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGA (SEQ ID
NO:3)

F727正向recA序列:

AACATTCGGCAAGGTTCCATCATGAAACTCGGGGAAAAGACGGATAC
AAGAATTTCAACAGTTCCGAGCGGTTCCTTGCACTTGATACCGCTCT
CGGAATAGGCGGATACCCGCGCGGACGGATTATTGAAGTATACGGACC

TGAAAGCTCAGGTAAAACGACTGTAGCGCTTCATGCGATTGCTGAAG
TTCAGGAGAAAGGCGGACAAGCCGCATTTATTGATGCTGAGCATGCC
CTTGACCCTGTTTACGCGCAAAAGCTCGGTGTAAATATTGAGGAGCTG
CTGCTTTCTCAGCCTGATACGGGAGAGCAGGCGCTTGAGATTGCCGA
AGCGCTGGTACGAAGCGGAGCCGTCGATATCGTAGTTGTCGACTCTGT
TGCGGCGCTTGTCCCGAAAGCTGAAATCGAAGGAGACATGGGGGATT
CCCACGTCGGTTTGCAGGCCCGTTTGATGTCTCAAGCGCTCCGTAAGC
TTTCCGGTGCCATCAATAAATCTAAAACAATCGCAATCTTTATTAACCA
AATTCGTGAAAAAGTCGGCGTTAGGGTCGGAAAAAA (SEQ ID NO:8)

F727 反向recA序列:

GTATAAGATTGCGATTGTTTTAGATTTATTGATGGCACCGGAAAGCTTA
CGGAGCGCTTGAGACATCAAACGGGCCTGCAAACCGACGTGGGAATC
CCCCATGTCTCCTTCGATTTTCAGCTTTCGGGACAAGCGCCGCAACAGA
GTCGACAACTACGATATCGACGGCTCCGCTTCGTACCAGCGCTTCGGC
AATCTCAAGCGCCTGCTCTCCCGTATCAGGCTGAGAAAGCAGCAGCT
CCTCAATATTTACACCGAGCTTTTGCGCGTAAACAGGGTCAAGGGCAT
GCTCAGCATCAATAAATGCGGCTTGTCCGCCTTTCTCCTGAACTTCAG
CAATCGCATGAAGCGCTACAGTCGTTTTACCTGAGCTTTCAGGTCCGT
ATACTTCAATAATCCGTCCGCGCGGGTATCCGCCTATTCCGAGAGCGGT
ATCAAGTGCAAGGGAACCGCTCGGAACTGTTGAAATTCTTGTATCCGT
CTTTTCCCCGAGTTTCATGATGGAACCTTTGCCGAATTGTTTTTCTATT
TGCTTAAGAGCCATATCWAAGRCTGWAWTRAMRATCAA (SEQ ID
NO:9)

F727保留recA序列:

AAGGTTCCATCATGAAACTCGGGGAAAAGACGGATACAAGAATTTCA
ACAGTTCCGAGCGGTTCCCTTGCACTTGATACCGCTCTCGGAATAGGC
GGATACCCGCGCGGACGGATTATTGAAGTATACGGACCTGAAAGCTCA
GGTAAAACGACTGTAGCGCTTCATGCGATTGCTGAAGTTCAGGAGAA
AGGCGGACAAGCCGCATTTATTGATGCTGAGCATGCCCTTGACCCTGT
TTACGCGCAAAAGCTCGGTGTAAATATTGAGGAGCTGCTGCTTTCTCA
GCCTGATACGGGAGAGCAGGCGCTTGAGATTGCCGAAGCGCTGGTAC
GAAGCGGAGCCGTCGATATCGTAGTTGTCGACTCTGTTGCGGCGCTTG
TCCCGAAAGCTGAAATCGAAGGAGACATGGGGGATTCCCACGTCGGT
TTGCAGGCCCGTTTGATGTCTCAAGCGCTCCGTAAGCTTTCCGGTGCC
ATCAATAAATCTAAAACAATCGCAATCTT (SEQ ID NO:10)

F727 Reverse phoR序列:

TCGTTGTCTGTATCATATTGGTTTTTCAGTGTTCTCGGCCTTTTCTTGCAG
CAGCTCATTCTTCATCCGCCAAGGAAAGAACGGAGGGACAGCTTGA
AAAGGAAGCCGCATACATAGCCGGACTCCTTGACGCCGGCCAAGTAA
ACAATAAAAGAAACGAAACGGTCATTAAAGATGCCAGCCGTACATTA
GATATCGACGTGTCCGTATTAAATGAAAAAGGCCGCGGTTTATATCACT
CAGGCAGACGCGCTGATGACTCGGCTATAAAGGAATTCGTCTCCCGTA
ATAAAAATGCGGCGGGCGATTCAGAACGGAGAGAAAGTATGGCATGGA
ACGGCCCTTAAAAACGCCGCCGGCCAAACGGCGGGATATGTGCTCGT
TTCCTCGCGGATCGATAAAGGTTCGAATATAACAGGGGAAATGTGGGG

201428097

CATGCTGGCTGCAAGCCTTTGTACTGCTTTTATTATTATCGTTTTCTTCT
ATACGAATATGACCTCCCGTTACAAAAGGTCAATCGACTCCGCGACAA
AAGTGGCCACTGAGCTGTCTAAGGGGAACATGACGCCCCGCTCCTAC
GGCGGGTACGCAAGACGCTCAGACCGTCTCGGGCGCGCTATGAACAG
CCTCGCTGTGGATTTGATGGAAATGACGAGAACGCAGGATATGCAGC
GCGACCGCCTGCTGACCGTCATCGAAAATATCGGATCAGGTTTGATTT
TAATAGACGGGAGAGGCTTTATTAATCTCGTGAACAGGTCGTATACGA
AGCAGTTCCATACAAATCCTGAACGTCTGCTTCGGCGTCTCTACCATG
ACGCATTTGAGCATGAGGAAATCATTCGGCTGGTCGAAGACATCTTTA
TGACAGAAACGAAGAAACGCCAGCTGCTCACGCTTCCCATCAAAATC
GAACGGCGCTATTTTGAGGTTGACGGCGTCCCGATTATGGGCCCTGAC
GATGAATGGAAAAGGCATTGTTCTCGTGTTTCATGATATGAC(SEQ ID
NO:13)

申請專利範圍

1.一種芽孢桿菌 (*Bacillus*)品種之實質純種培養物，其係具有以下特性：

(A)至少以下一者：

(1)一核苷酸序列，其具有至少與SEQ ID NO:3所列16SrRNA序列99.5%之同一性；

(2)一核苷酸序列，其具有至少與SEQ ID NO:10所列*recA*序列95%之同一性；以及

(3)一核苷酸序列，其具有至少與SEQ ID NO:13所列*phoR* 序列90%之同一性；

(B)殺有害物活性；

(C)抗卡那黴素 (Kanamycin)、氯黴素 (Chloramphenicol)、氨比西林 (ampicillin)、青黴素 (penicillin)、頭孢呋肟 (cefuroxime)、達比黴素 (piperacillin)、四環素(tetracycline)；

(D)具有鹼性磷酸酵素、酯酵素、酸性磷酸酵素、萘酚-AS-BI-磷酸水解酶活性；以及

(E)對脊椎動物無致病性。

2.如申請專利範圍第1項所述之培養物，其中該品種具有至少一種芽孢桿菌品種F727 (NRRL Accession No.B-50772)之鑑別特性。

3.一種取自申請專利範圍第1項所述之培養物之濾液、表層浮質、萃取物、細胞片段或全細胞液。

4.一種化合物，其係選自由以下項目所構成之群組：

(a)一化合物 A，其

(i)可取自芽孢桿菌分離株F727；

(ii)具有殺有害物活性；

(iii)經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1020-1060，且更具體為1044；

(iv)¹H NMR值為 δ 7.15, 6.72, 4.81, 4.70, 4.65, 4.40, 4.35, 4.25, 4.15, 3.85, 3.65, 3.50, 3.22, 2.85, 2.80, 2.65, 2.45, 2.35, 2.30, 2.20, 1.95, 1.55, 1.31, 1.20及 0.85；

(v)利用一以水與乙腈(CH₃CN)調製之梯度溶劑系統(0-20分鐘90 - 0 %水乙腈；20-24分鐘100%乙腈；24-27分鐘0 - 90 %水乙腈；27-30分鐘90%水乙腈)，設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) 柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-12分鐘，更具體為約8分鐘，且又更具體為約8.31分鐘；

(vi)隨選性包含47個碳原子、72個氫原子、12個氮原子，以及15個氧原子；
以及

(vii)隨選性為一包含穀胺醯胺(1單位)、脯胺酸(1單位)、絲胺酸(1單位)、酪胺酸(1單位)及天冬醯胺酸(3單位)之胜肽；

(b)一化合物 **B**，其

(i)具有殺有害物活性；

(ii)經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1030-1080，且更具體為1058；

(iii)利用一以水與乙腈(CH₃CN)調製之梯度溶劑系統(0-20分鐘90 - 0 %水乙

腓；20-24分鐘100%乙腓；24-27分鐘0 - 90 %水乙腓；27-30分鐘90%水乙腓），設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-14分鐘，更具體為約8分鐘，且又更具體為約8.67分鐘；

(iv)隨選性包含48個碳原子、74個氫原子、12個氮原子，以及15個氧原子；
以及

(v)隨選性為一包含穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）之胜肽；以及

(c)一化合物C，其

(i)具有殺有害物活性；

(ii)經液相層析法／質譜法 (LC/MS)判定之分子量為約1050-1120，且更具體為1072；

(iii)利用一以水與乙腓(CH_3CN)調製之梯度溶劑系統（0-20分鐘90 - 0 %水乙腓；20-24分鐘100%乙腓；24-27分鐘0 - 90 %水乙腓；27-30分鐘90%水乙腓），設定為0.5 mL/min 流速及210 nm之紫外線偵測，於一逆相C-18 HPLC柱所測得之高壓液相層析法(HPLC)滯留時間為約6-14分鐘，更具體為約9分鐘，且又更具體為約9.19分鐘；

(iv)隨選性包含49個碳原子、76個氫原子、12個氮原子，以及15個氧原子；
以及

(v)隨選性為一包含穀胺醯胺（1單位）、脯胺酸（1單位）、絲胺酸（1單位）、酪胺酸（1單位）及天冬醯胺酸（3單位）之胜肽。

5.一種組成物，其係包含：

(a)一第一物質，係選自由以下項目所構成之群組：

(i)如申請專利範圍第1項所述之培養物；

(ii)如申請專利範圍第1項所述之培養物之細胞片段；

(iii)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之表層浮質；

(iv)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之濾液；

(v) (i)、(ii)、(iii)及(iv)中任一者之萃取物；

(vi)產自如申請專利範圍第1項所述之培養物之代謝物；

(vii)化合物A；

(viii)化合物B；

(ix)化合物C；以及

(b)隨選性結合以下至少一者：

(i)一第二物質，其中該第二物質係化學性或生物性農藥、一植物生長促進劑、一抗植物致病劑及一肥料中之一或多者；以及

(ii)一載體、稀釋液、界面活性劑或輔藥中之至少一者。

6.如申請專利範圍第5項所述之組成物，其中該第二物質係一化學性或生物性農藥。

7.如申請專利範圍第5項所述之組成物，其中該組合係一組成物。

8.一種用以調控一植物中有害物侵擾之方法，其係包含對該植物及／或其種子及／或用以種植該植物之基質施加一用量之組成物，該組成物係選自由以下項目所構成之群組：

(a)如申請專利範圍第1項所述之培養物；

(b)如申請專利範圍第1項所述之培養物之細胞片段；

(c)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之表層浮質；

(d)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之濾液；

(e) (a)、(b)、(c)及(d)中任一者之萃取物；

(f)產自如申請專利範圍第1項所述之培養物之代謝物；

(g)化合物A；

(h)化合物B；以及

(i)化合物C；

○ 其中該用量係可有效調控該有害物侵擾。

9.如申請專利範圍第8項所述之方法，其中該有害物係一真菌或一細菌。

10.如申請專利範圍第9項所述之方法，其中該真菌係選自由以下項目所構成之群組：麴菌(*Aspergillus*)、鏈格菌(*Alternaria*)、盤梗黴菌(*Bremia*)、白粉菌(*Sphaerotheca*)、炭疽菌(*Colletotrichum*)、鐮胞菌(*Fusarium*)、蠟蚧輪枝菌(*Verticillium*)、葡萄孢菌(*Botrytis*)、核盤菌(*Sclerotinia*)、白絹菌(*Sclerotium*)、絲核病菌(*Rhizoctonia*)及雙孔孢菌(*Bipolaris*)。

○ 11.如申請專利範圍第10項所述之方法，其中該組成物抑制孢子發芽。

12.如申請專利範圍第9項所述之方法，其中該細菌係選自由以下項目所構成之群組：芽孢桿菌(*Bacillus*)、歐文氏菌(*Erwinia*)、斑點病菌(*Acidovorax*)及棒狀桿菌(*Clavibacter*)。

13.如申請專利範圍第8項所述之方法，其中該有害物為疫菌(*Phytophthora*)。

14.如申請專利範圍第9項所述之方法，其中該組成物進一步包含一農藥。

15.如申請專利範圍第14項所述之方法，其中該有害物為一真菌且該農藥係選自由以下項目所構成之群組：虎杖(*Reynoutria sachalinensis*) 萃取物、

Regalia[®] 及Double Nickel 55[™]。

16.一種用以調控一植物生長及／或一種子發芽之方法，該方法包含使該植物、其生長基質，及／或該植物之一種子接觸一用量之組成物，該組成物係選自由以下項目所構成之群組：

- (a)如申請專利範圍第1項所述之培養物；
- (b)如申請專利範圍第1項所述之培養物之細胞片段；
- (c)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之表層浮質；
- (d)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之濾液；
- (e)(a)、(b)、(c)及(d)中任一者之萃取物；
- (f)產自如申請專利範圍第1項所述之培養物之代謝物；
- (g)化合物A；
- (h)化合物B；以及
- (i)化合物 C；

其中該用量係可有效調控該該植物之生長及／或該種子之發芽。

17.如申請專利範圍第16項所述之方法，其中該組成物進一步包含一生長促進劑、一界面活性劑、一載體、一輔藥，及／或一肥料。

18.如申請專利範圍第16項所述之方法，其中該組成物係一滑石粉製劑。

19.一種組成物用於配製一殺有害物及／或植物生長促進組成物之用途，其中該組成物係選自由以下項目所構成群組中之一或多者：

- (a)如申請專利範圍第1項所述之培養物；
- (b)如申請專利範圍第1項所述之培養物之細胞片段；
- (c)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之表層浮質；

(d)取自如申請專利範圍第1項所述之培養物之濾液；

(e) (a)、(b)、(c)及(d)中任一者之萃取物；

(f)產自如申請專利範圍第1項所述之培養物之代謝物；

(g)化合物A；

(h)化合物B；以及

(i)化合物 C。

20.如申請專利範圍第19項所述之用途，其中該殺有害物或植物生長促進組

○ 成物進一步包含一第二物質，該第二物質係選自以下項目構成群組中之一或多者：

(a)一農藥；

(b)一植物生長促進劑；

(c)一載體；

(d)一輔藥；

(e)一界面活性劑；

○ (f)一肥料；以及

(g)一抗植物致病劑。

21.如申請專利範圍第20項所述之用途，其中該農藥係選自由以下項目所構成之群組：一殺細菌劑、一殺真菌劑及一殺線蟲劑。

22.如申請專利範圍第21項所述之用途，其中該農藥係選自由以下項目所構成之群組：虎杖萃取物及Regalia[®]。

圖式

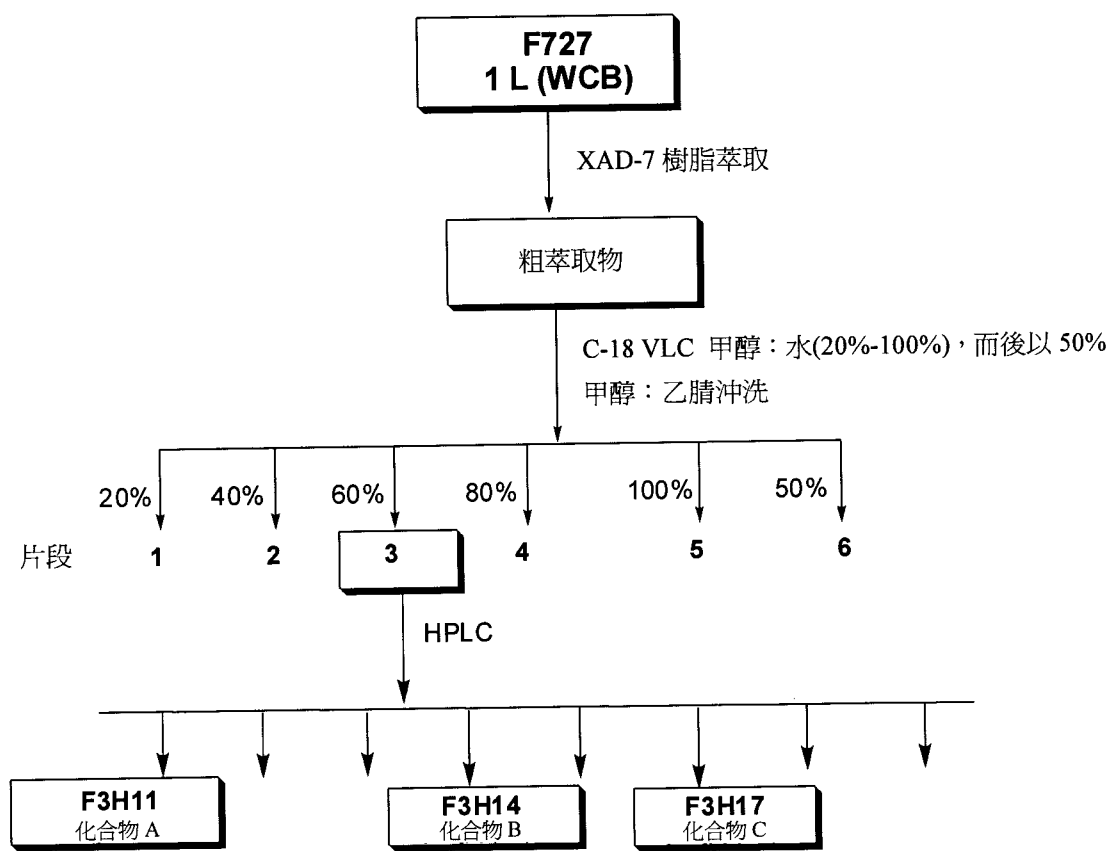


圖 1

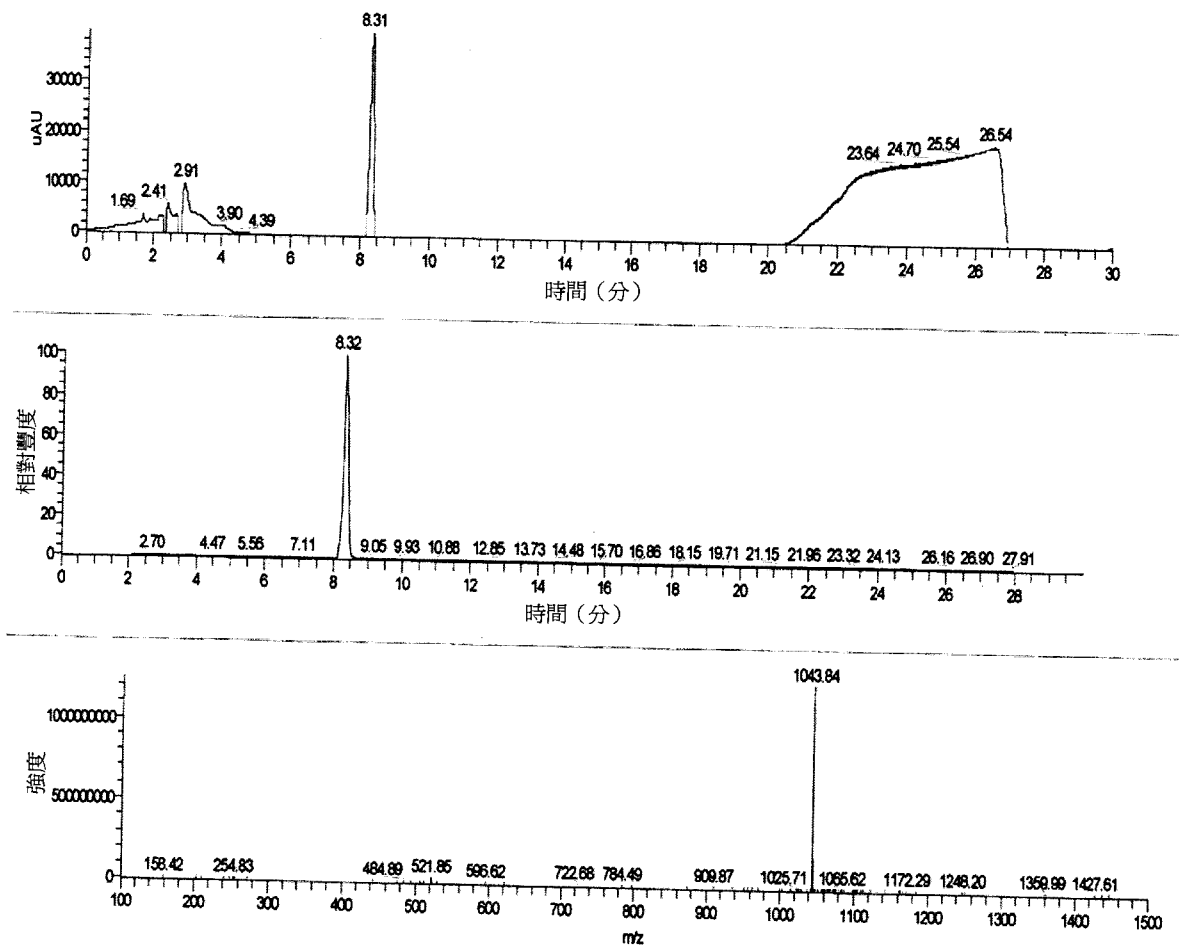


圖 2

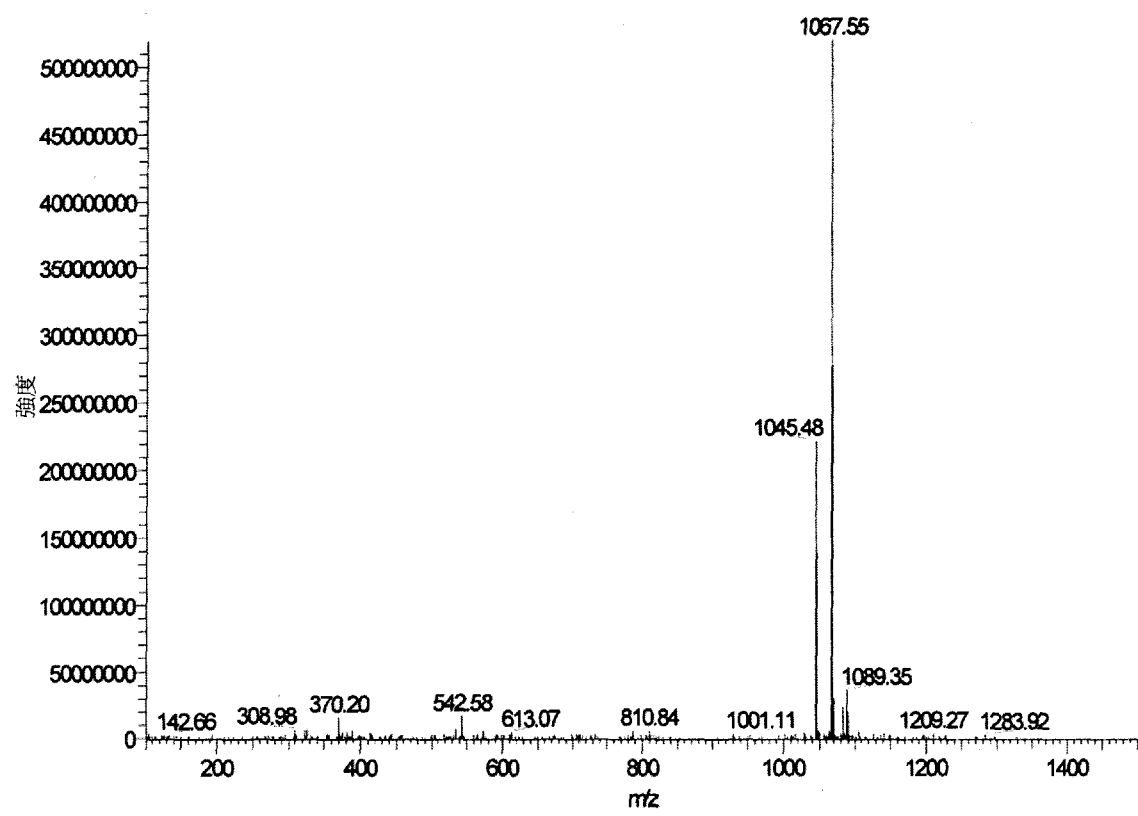


圖 3

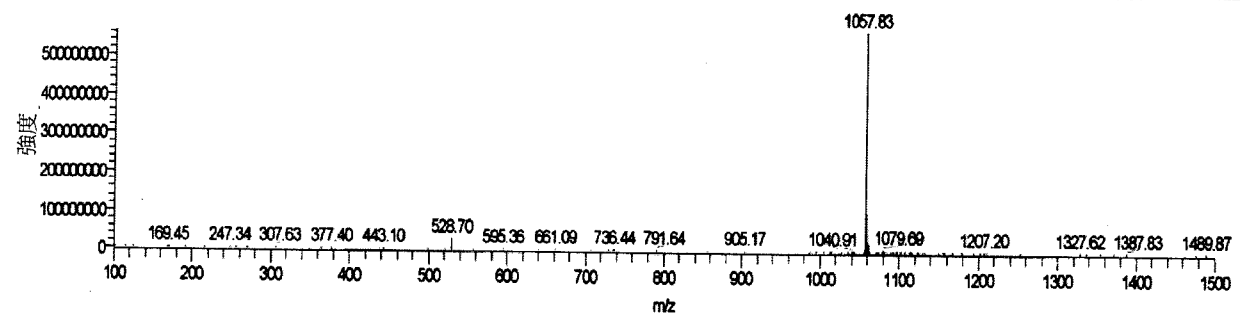
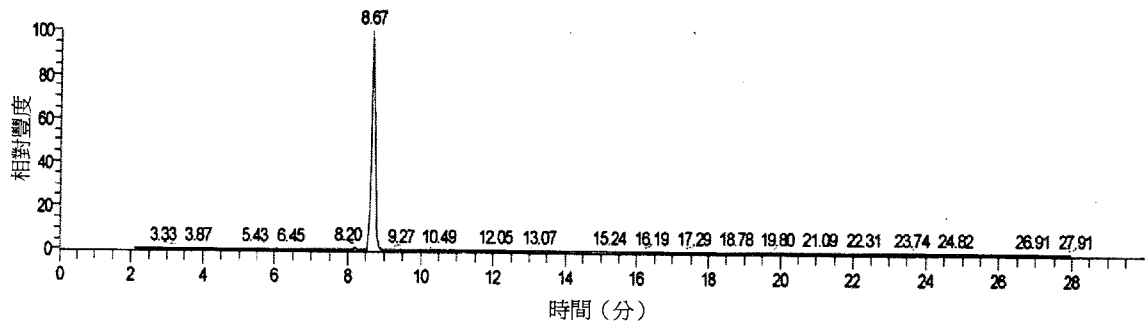
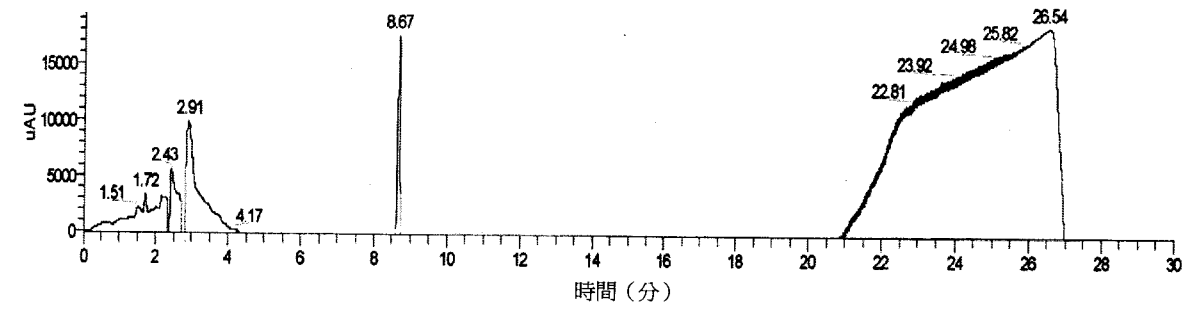


圖.4

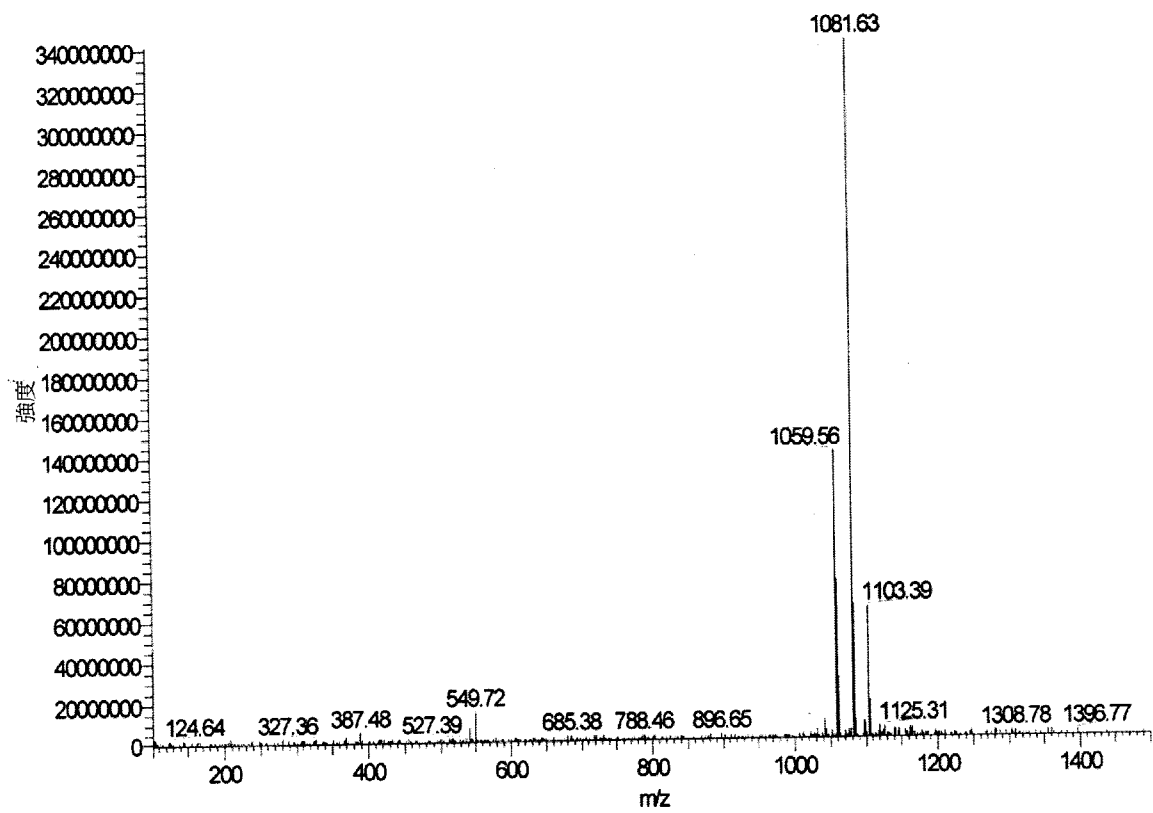


圖 5

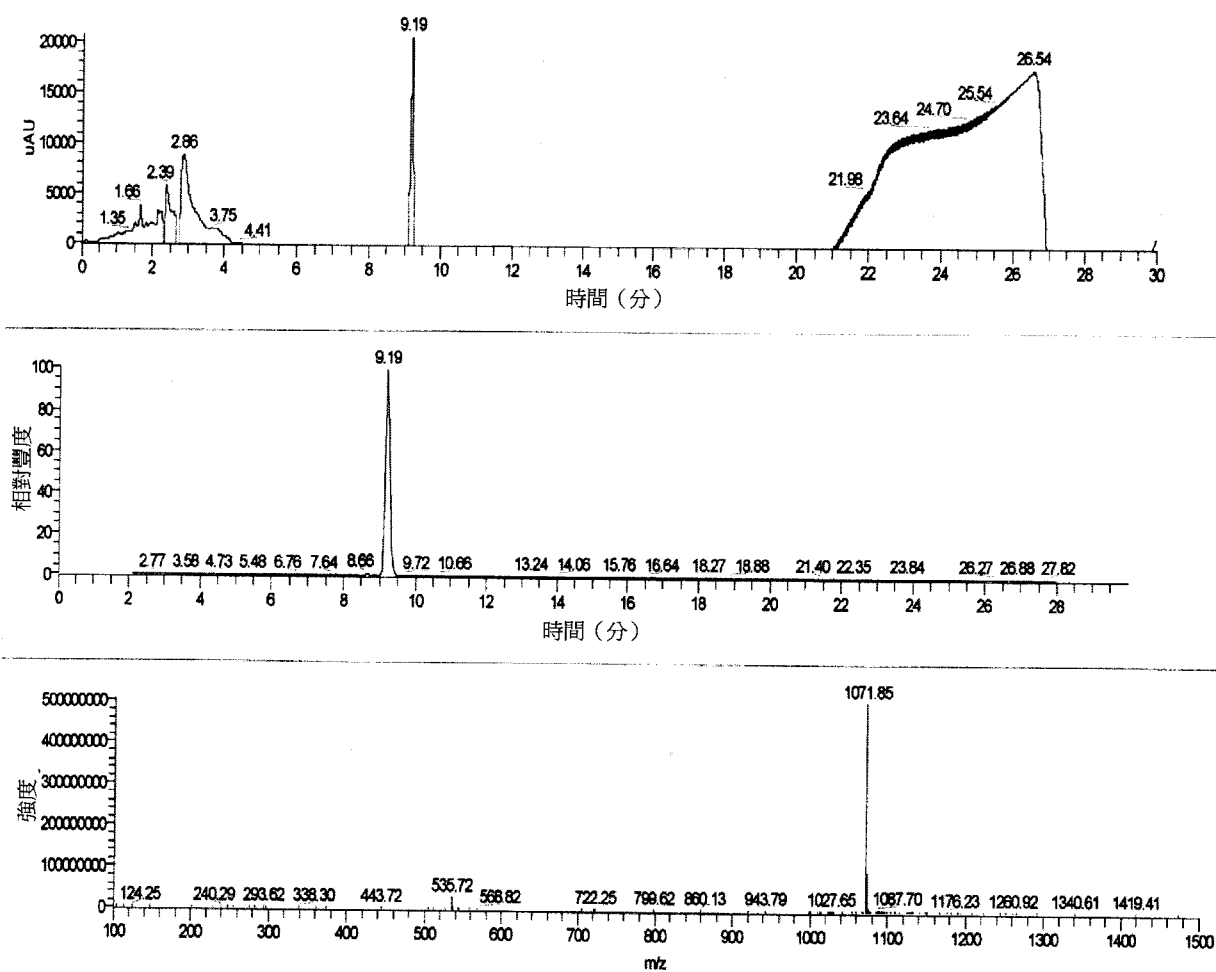


圖 6

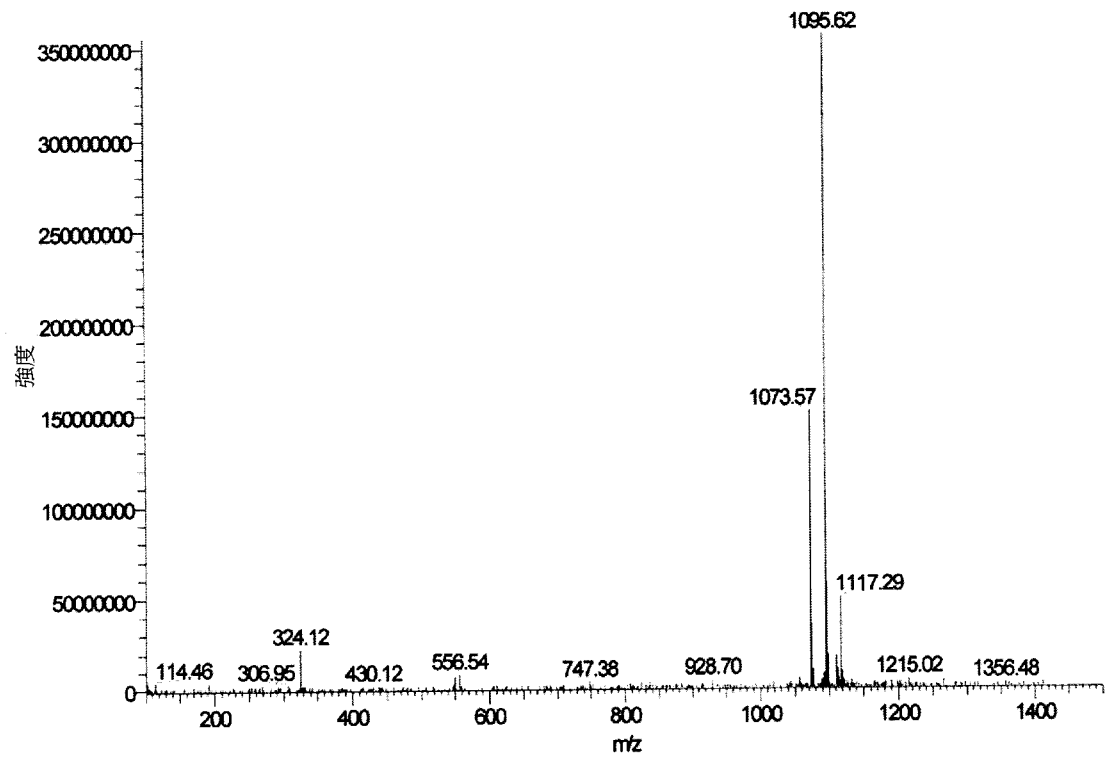


圖 7

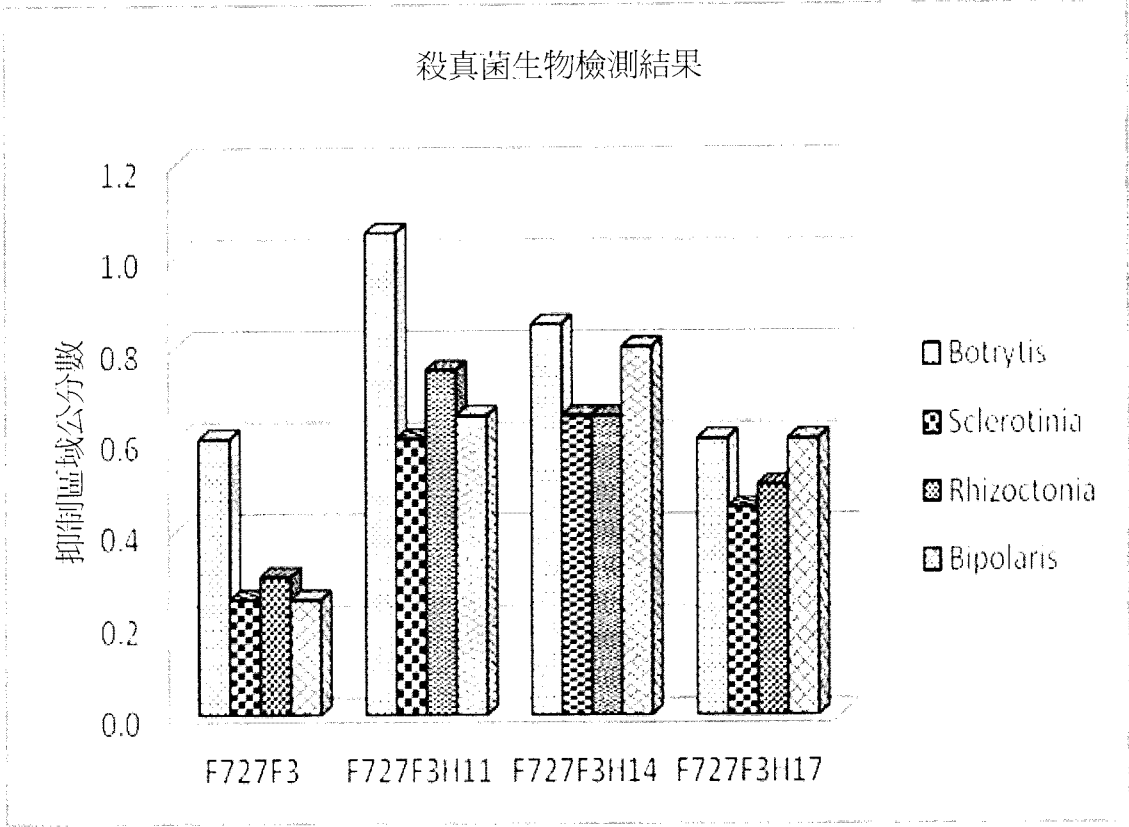


圖 8

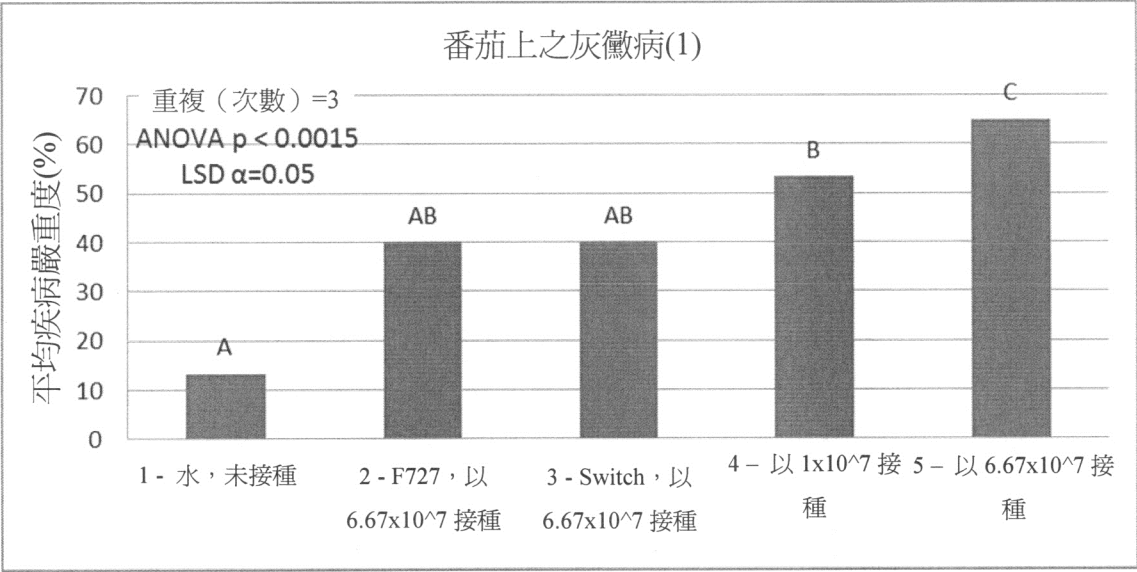


圖 9

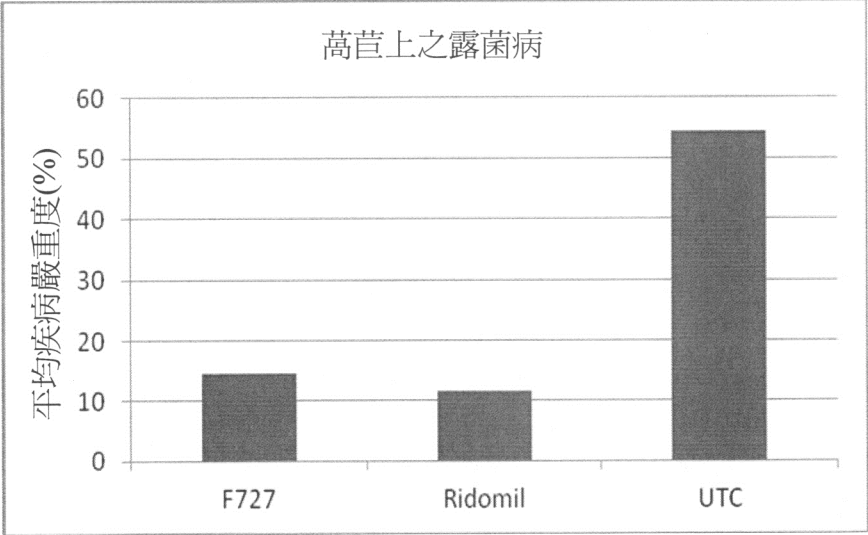


圖 10

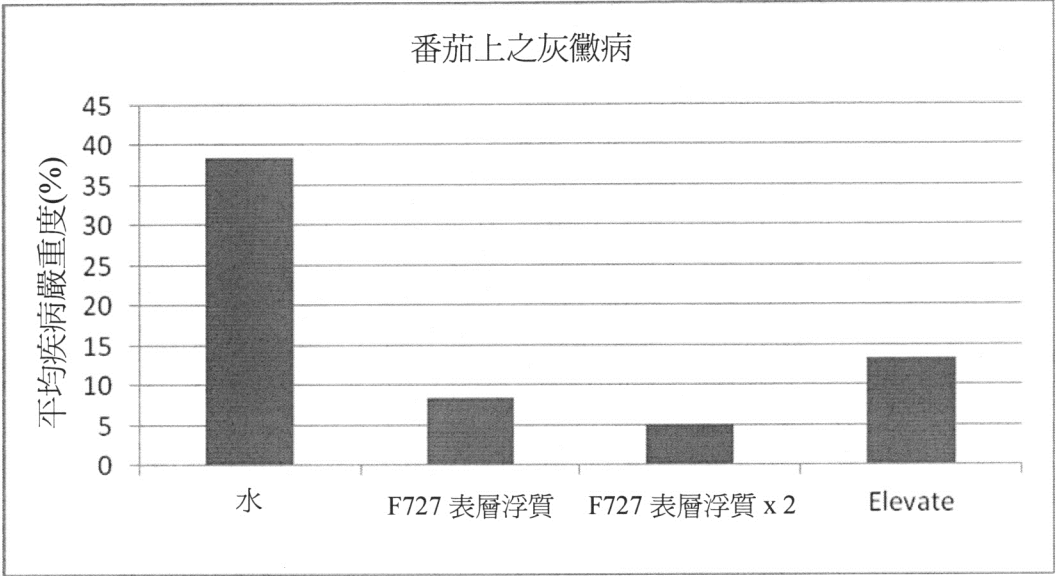


圖 11

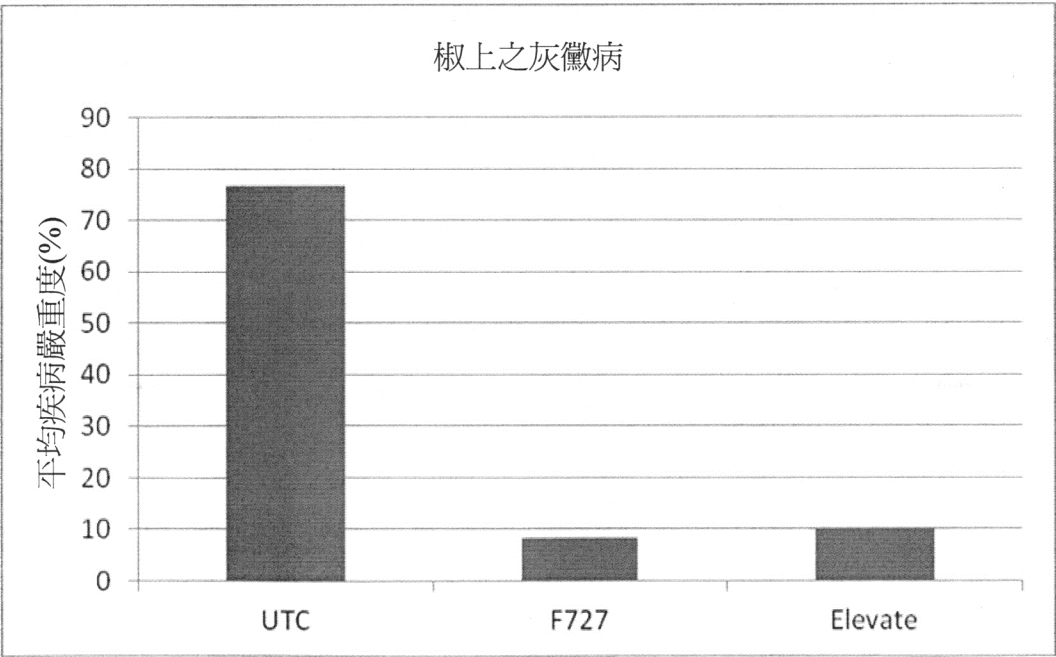


圖 12

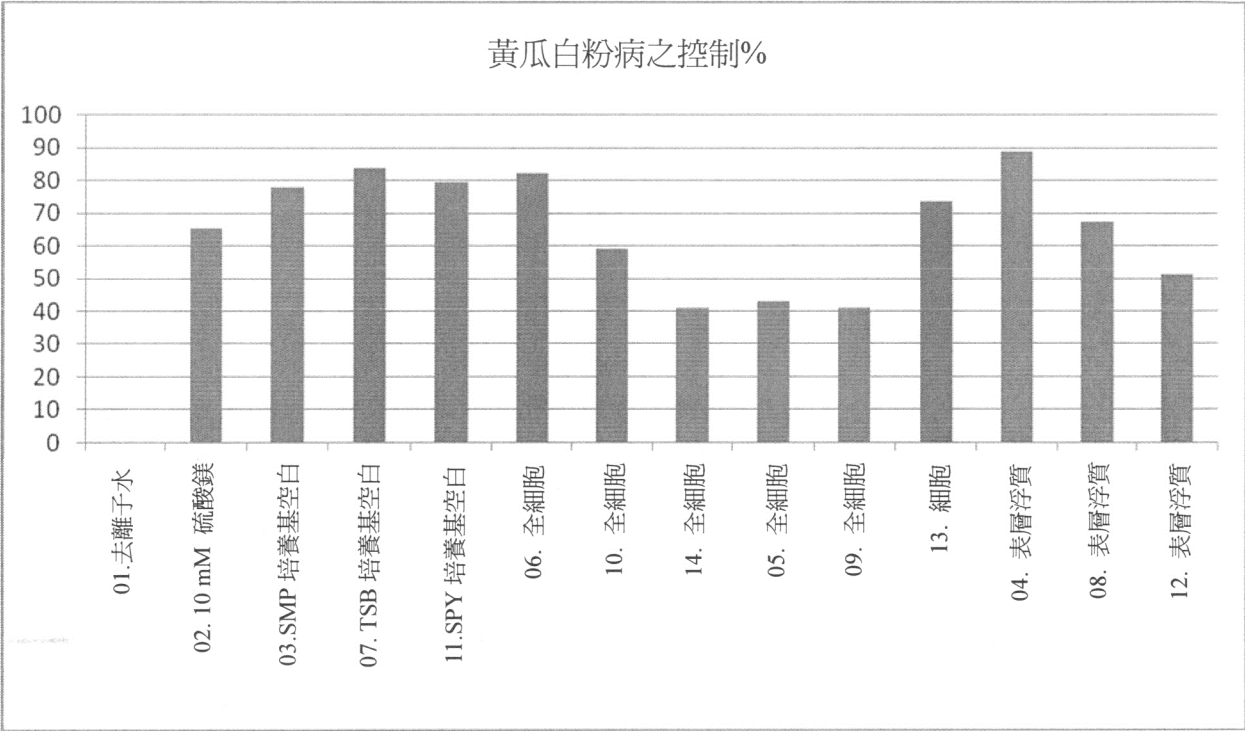


圖 13

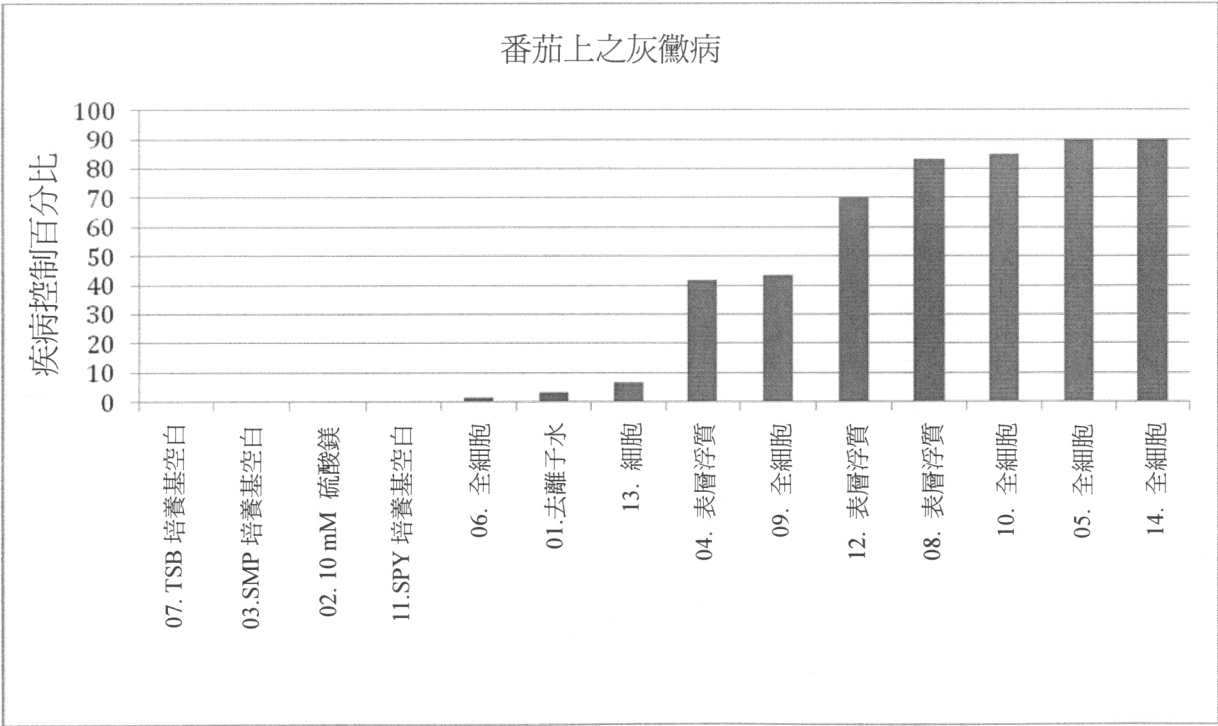


圖 14

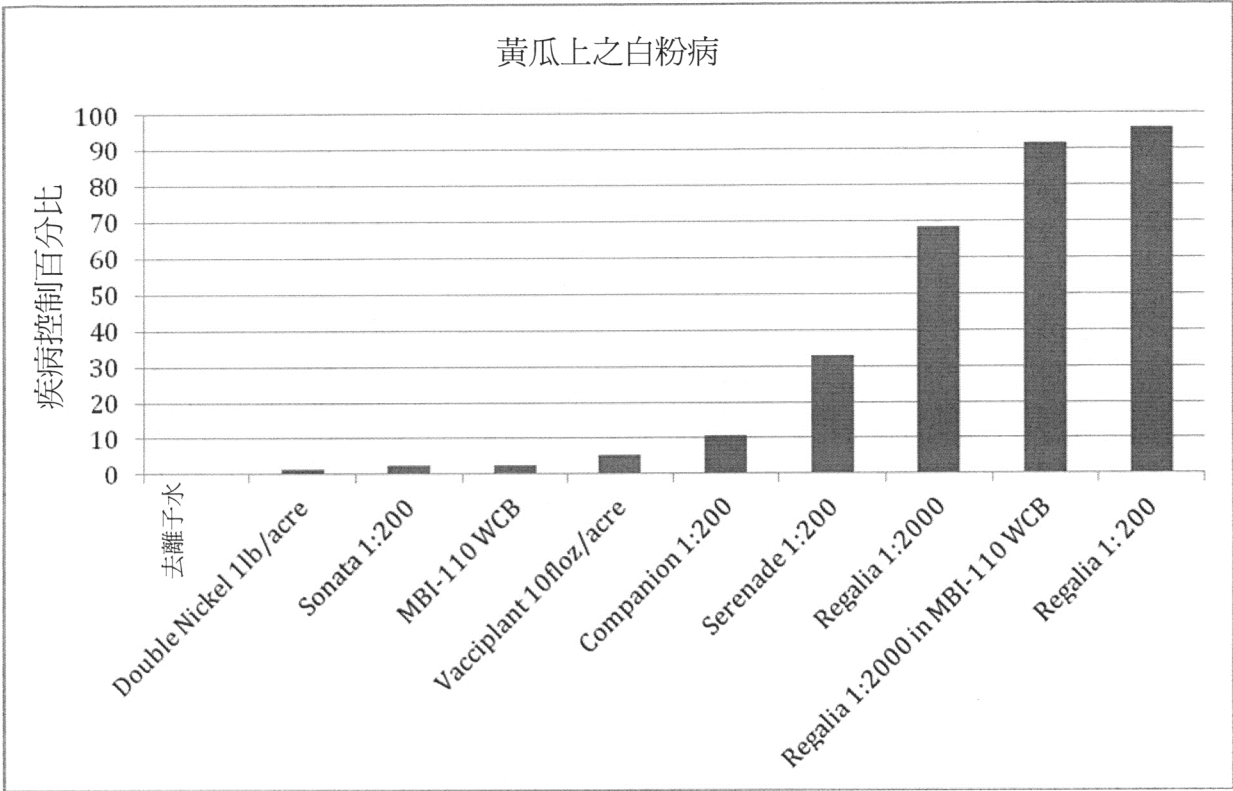


圖 15

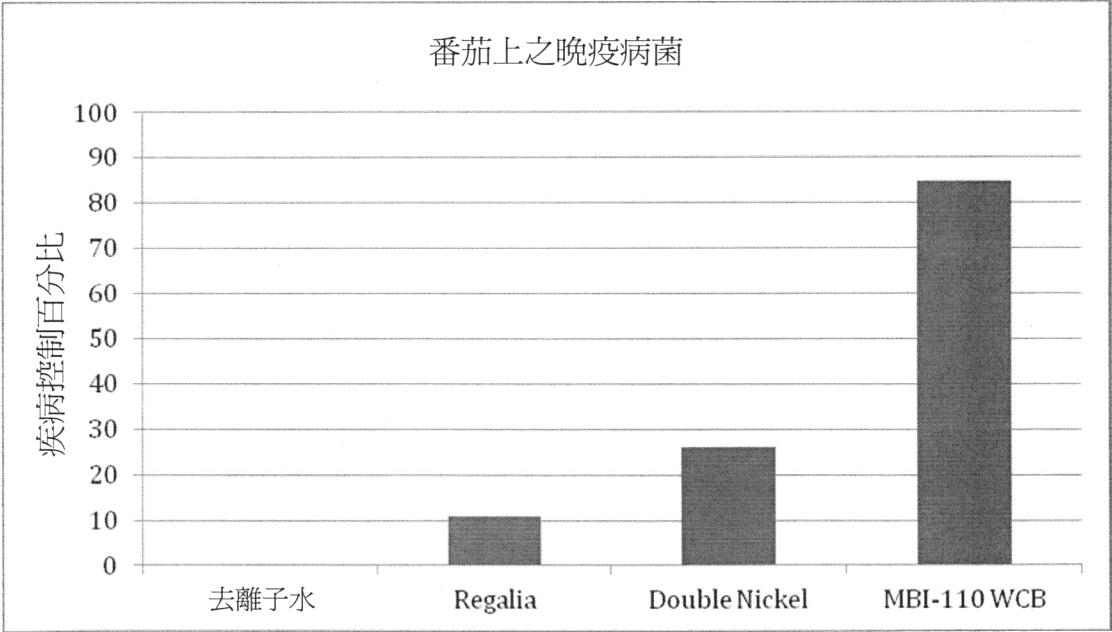


圖 16

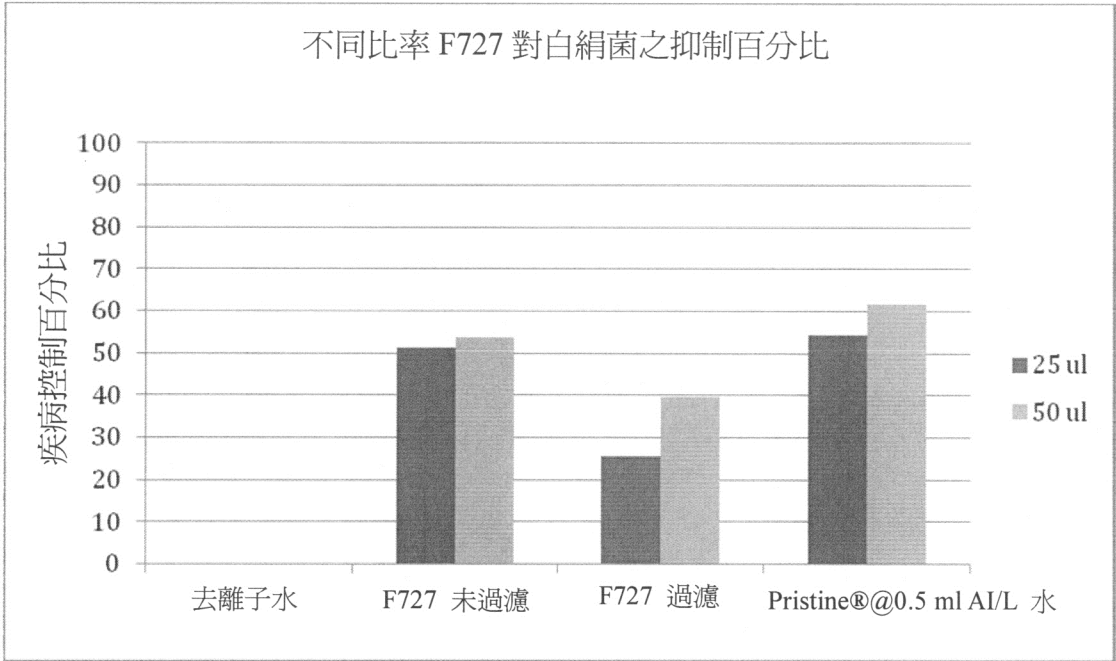


圖 17

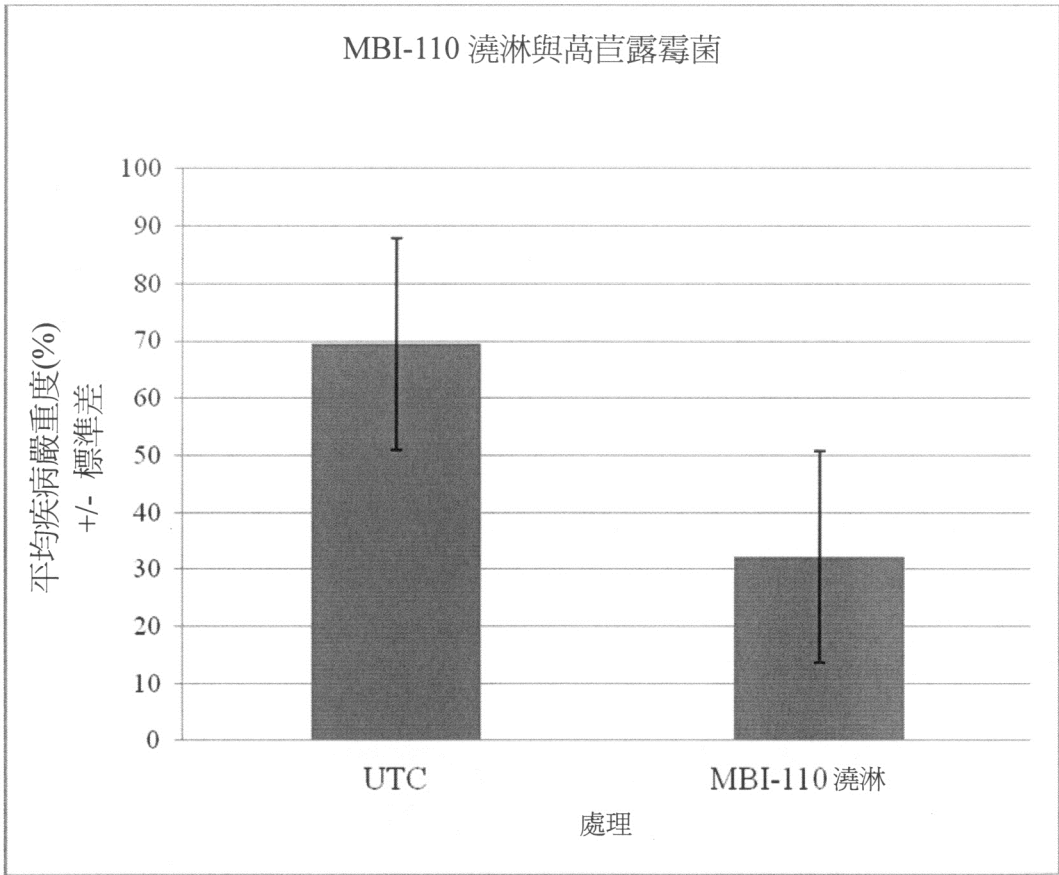


圖 18

F4H11 (MW 1044) MS/MS分析

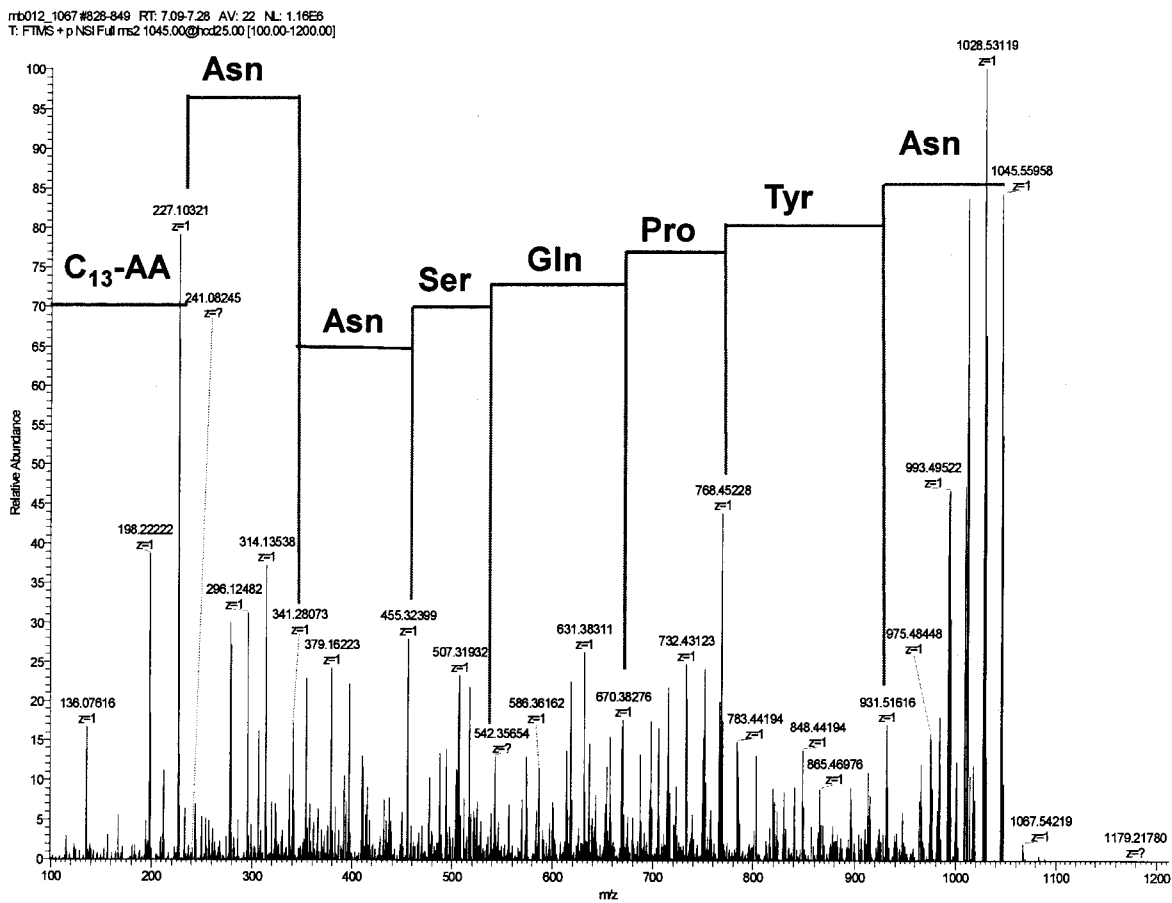


圖 19

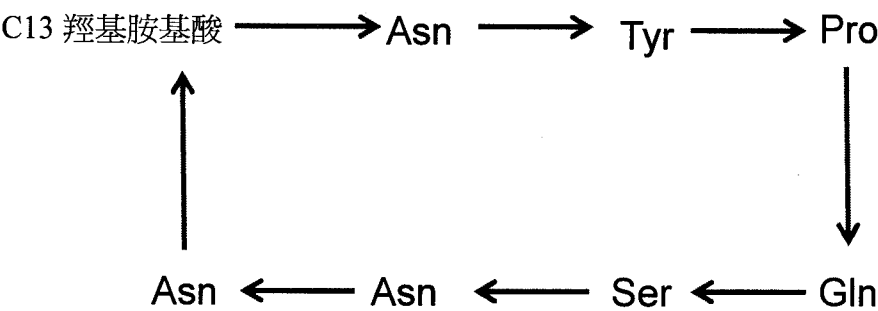


圖 20