

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-505995

(P2004-505995A)

(43) 公表日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
AO1N 63/00	AO1N 63/00 F	4B065
AO1G 7/00	AO1G 7/00 G05Z	4H011
AO1N 59/08	AO1N 59/08 Z	
AO1N 61/00	AO1N 61/00 D	
AO1N 65/00	AO1N 65/00 F	
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-518767 (P2002-518767)	(71) 出願人	502352748
(86) (22) 出願日	平成12年8月16日 (2000.8.16)		ヨンホンイツァウツクウフンヨウシェンコ
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月14日 (2003.2.14)		ンス
(86) 国際出願番号	PCT/CN2000/000237		台湾、タイペイスツォンチンナンルウ2ト
(87) 国際公開番号	W02002/013613		ァン51ハウ15ロウ
(87) 国際公開日	平成14年2月21日 (2002.2.21)	(74) 代理人	100058479
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), O A (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, C U, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, S I, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW	(74) 代理人	100091351
			弁理士 鈴江 武彦
		(74) 代理人	100091351
			弁理士 河野 哲
		(74) 代理人	100088683
			弁理士 中村 誠
		(74) 代理人	100108855
			弁理士 蔵田 昌俊
		(74) 代理人	100075672
			弁理士 峰 隆司
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 微生物作用剤の製造方法及び生物病害防除方法

(57) 【要約】

本発明は微生物作用剤の製造方法及び生物病害の防除方法に関するものである。その微生物作用剤の製造方法は、物体に作用する微生物を提供するステップと、該微生物作用物を粘合物、培養液およびフロート剤と中間物に結合させるステップと、該中間物に造形剤を添加してこの中間物を造形し、作用剤に形成させるステップとを備えてなる。そしてこの微生物作用物を有する作用剤を植物体と接触させて該微生物作用剤から該微生物作用物を植物体上に放出することにより植物病害を防除する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) 物体に作用する微生物作用物を提供するステップと、
(2) 前記微生物作用物を粘合物、培養液及びフロート剤と中間物に結合させるステップと、
(3) 前記中間物に造形剤を添加してこの中間物を造形し、作用剤に形成させるステップと、
を備えてなることを特徴とする作用剤の製造方法。

【請求項 2】

前記作用剤はさらに、微生物作用物を携帯するキャリアを備えることを特徴とする請求項 1 記載の作用剤の製造方法。 10

【請求項 3】

前記微生物作用物は拮抗菌であることを特徴とする請求項 1 記載の作用剤の製造方法。

【請求項 4】

前記拮抗菌はカビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスであることを特徴とする請求項 3 記載の作用剤の製造方法。

【請求項 5】

前記拮抗菌は水稻立枯病原菌 (*Rhizoctonia solani*, AG-1) への拮抗に用いられることを特徴とする請求項 4 記載の作用剤の製造方法。

【請求項 6】

前記粘合物は造形用とするアルギン酸ナトリウムであることを特徴とする請求項 1 記載の作用剤の製造方法。 20

【請求項 7】

前記培養液は前記微生物作用物の培養に用いられる厚孢子培養液であることを特徴とする請求項 1 記載の作用剤の製造方法。

【請求項 8】

前記フロート剤は水と親和しない物質又は空気であって、前記作用剤にフロート性質を持たせる役目を果たすことを特徴とする請求項 1 記載の作用剤の製造方法。

【請求項 9】

前記水と親和しない物質は植物性サラダ油である大豆サラダ油であることを特徴とする請求項 8 記載の作用剤の製造方法。 30

【請求項 10】

前記造形剤は前記粘合物と凝集する作用を生ずる塩化カルシウム (CaCl_2) 溶液であることを特徴とする請求項 1 記載の作用剤の製造方法。

【請求項 11】

前記粘合物は造形用に供されるアルギン酸ナトリウムであることを特徴とする請求項 10 記載の作用剤の製造方法。

【請求項 12】

植物病害の防除に応用される生物防除の導入系統であって、
前記植物病害を防除する微生物作用物と、
前記微生物を携帯して一植物体に送ると共に、該微生物作用物を放出して前記植物病害を防除する作用剤と、を備えてなり、
前記作用剤は前記拮抗微生物と粘合する粘合物と、該拮抗微生物を培養する培養液と、フロート性質を有するフロート剤と、該粘合物と凝集する作用を生じて造形する造形剤とを含んでなることを特徴とする生物防除の導入系統。 40

【請求項 13】

前記作用剤はさらに前記微生物作用物を携帯するキャリアを備えることを特徴とする請求項 12 記載の生物防除の導入系統。

【請求項 14】

前記微生物作用物は拮抗菌であることを特徴とする請求項 12 記載の生物防除の導入系統 50

。

【請求項 15】

前記拮抗菌はカビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスであることを特徴とする請求項 14 記載の生物防除の導入系統。

【請求項 16】

前記拮抗菌は水稻立枯病原菌 (*Rhizoctonia solani*, AG-1) への拮抗に用いられることを特徴とする請求項 15 記載の生物防除の導入系統。

【請求項 17】

前記作用剤と前記物体との接触は該作用剤を該物体上に吸着させることにより達成されることを特徴とする請求項 12 記載の生物防除の導入系統。

10

【請求項 18】

水耕栽培作物系統に適用される植物病害の防除方法であって、

(1) 植物病害を防除するための微生物作用物を有する浮動性作用剤を提供するステップと、

(2) 前記水耕栽培作物系統を介して前記浮動性作用剤を植物体と接触させるステップと、

(3) 前記浮動性作用剤より前記微生物作用物を前記植物体に放出させて前記植物病害を防除するステップと、

を備えてなることを特徴とする植物病害の防除方法。

20

【請求項 19】

前記浮動性作用剤はさらに、前記微生物作用物を携帯するキャリアを備えることを特徴とする請求項 18 記載の植物病害の防除方法。

【請求項 20】

前記微生物作用物は拮抗菌であることを特徴とする請求項 18 記載の植物病害の防除方法。

【請求項 21】

前記拮抗菌はカビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスであることを特徴とする請求項 20 記載の植物病害の防除方法。

【請求項 22】

前記拮抗菌は水稻立枯病原菌 (*Rhizoctonia solani*, AG-1) への拮抗に用いられることを特徴とする請求項 21 記載の植物病害の防除方法。

30

【請求項 23】

前記浮動性作用剤と前記物体との接触は該作用剤を該物体上に吸着させることにより達成されることを特徴とする請求項 19 記載の植物病害の防除方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

[技術分野]

本発明は微生物作用剤の製造方法及び生物が病害に感染されるのを防除する病害防除方法に関する。

【0002】

40

[背景技術]

一般に、植物病害の防除については従来からいずれも農薬を使用して植物病害を防除することにより、作物の生産量を増加すると共に、作物が病害に罹る確率を低下させている。しかしながら、農薬自体は一種の化学製剤であり、投薬濃度が高過ぎ及び/又は収穫後の後期になってから使用すると、使用方法の不当により生物に農薬残留による毒性問題、すなわち農薬が人体内に滞留又は急性中毒現象を引き起して人々の健康を危害する問題が発生している。

【0003】

この農薬残留の問題を解消する手段として現在では、非農薬方式で植物病害を防除する方法が開発され、微生物を利用して植物病害を防除することにより、農薬が作物に残留する

50

問題を解決して人の健康を保護すると共に、多量な農薬を使用したために環境に危害を与える問題を解消することが可能になった。

【0004】

一般に生物防除方法による場合、スプレー方式で該防除性微生物を作物栽培区に加えるが、該防除性微生物を確実に病原の侵入位置に送ることができない。水稻立枯病 (*Rhizoctonia solani*) を例にとれば、病原の侵入位置は通常葉身上に見られ、スプレー方式で病害を防除しようとする、スプレーされた水稻の葉が噴射バーの横への移動を邪魔し、水稻の植物体上に傷口を生じさせると共に、この噴射バーの移動が容易でないために水稻植物体上に大量な傷口を生じさせ、効果的に葉身に作用できないばかりでなく、他の病原菌が該傷口に侵入する糸口となり、却って病害の発生機会を増加させている。

10

【0005】

したがって、本発明は上記先行技術の欠点にかんがみ、鋭意試験と研究とを重ねた結果、ついに「微生物作用剤の製造方法及び生物病害防治方法」を案出し、これにより上記先行技術の不備を解決した。

【0006】

[発明の開示]

本発明の目的は伝統農薬の代りに微生物作用剤を使用して大量農薬が乱用される問題を解決する、微生物作用剤を提供することにある。

【0007】

本発明の次の目的は微生物作用剤を生物防除に応用して、該微生物作用剤を正確に植物病害をかもす病原のルートに進入させて病害防除及び病原菌死滅の効果を向上させる微生物作用剤の製造方法及び生物病害防除方法を提供することにある。

20

【0008】

本発明の又次の目的は微生物作用剤を生物防除に応用し、該微生物作用剤を作用される植物体に作用して抗生作用、超寄生作用及び競争作用を行わさせ、これにより病原の活性を抑制して病害防除の目的を達成する微生物作用剤の製造方法及び生物病害防除方法を提供することにある。

【0009】

上記目的を達成するための本発明の微生物作用剤の製造方法は (1) 物体に作用する微生物作用物を提供するステップと、 (2) 該微生物作用物を粘合物、培養液及びフロート剤と中間物に結合させるステップと、 (3) 該中間物に造形剤を添加してこの中間物を造形し、作用剤に形成させるステップとを備えてなる。(請求項1に対応)

30

【0010】

この微生物作用物を有する作用剤を植物体と接触させて該微生物作用剤から該微生物作用物を植物体上に放出することにより植物病害を防除する。

【0011】

上記アイディアによれば、上記本発明の微生物作用剤の製造方法において、該作用剤はさらに微生物作用物を携帯するキャリアを備え、この微生物作用物はカビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスという拮抗菌であって、水稻立枯病原菌 (*Rhizoctonia solani*) AG-1 への拮抗に用いられる。(請求項2、3、4、5に対応)

40

【0012】

また上記アイディアによれば、上記本発明の微生物作用剤の製造方法において、該造形物質は粘合物と培養液とフロート剤とを含んでなり、その中、該粘合物は造形用とするアルギン酸ナトリウムであり、該培養液は該微生物作用物の培養に用いられる厚孢子培養液であり、そして該フロート剤は水と親和しない物質又は空気であって、該作用剤にフロート性質を持たせる役目を果す。この水と親和しない物質は植物性サラダ油である大豆サラダ油である。(請求項6、7、8、9に対応)

【0013】

また上記アイディアによれば、上記本発明の微生物作用剤の製造方法において、該造形剤

50

は該造形物質中の粘合物と凝集する作用を生じる塩化カルシウム (CaCl_2) 溶液であり、該粘合物は造形用に供されるアルギン酸ナトリウムである。(請求項 10、11 に対応)

【0014】

さらには上記発明の目的を達成するための本発明の生物防除の導入系統は植物病害防除に応用されるものであって、該植物病害を防除する微生物作用物と、該微生物作用物を携帯して一植物体に送ると共に、該微生物作用物を放出して該植物病害を防除する作用剤とを備えてなり、その中、該作用剤は該拮抗微生物と粘合する粘合物と、該拮抗微生物を培養する培養液と、浮動性質を有するフロート剤と、該粘合物と凝集する作用を生じて造形する造形剤とを含んでなる。(請求項 12 に対応)

10

【0015】

上記アイディアによれば、上記本発明の生物防除の導入系統において、該作用剤と該物体との接触は該作用剤を該物体上に吸着させることにより達成される。(請求項 17 に対応)

【0016】

さらには上記他の目的を達成するための植物病害の防除方法は水耕栽培系統に適用される方法であって、(1) 植物病害を防除するための微生物作用物を有する浮動性作用剤を提供するステップと、(2) 該水耕栽培作物系統を介して該浮動性作用剤を植物体と接触させるステップと、(3) 該浮動性作用剤より該微生物作用物を該植物体に放出させて該植物病害を防除するステップとを備えてなる。(請求項 18 に対応)

20

【0017】

上記アイディアによれば、上記植物病害の防除方法は植物水耕系統に適用される。

【0018】

本発明の上記技術的手段は、以下実施例における詳細な説明により一層深く理解され得る。

【0019】

[実施例の説明]

本発明の上記目的を達成するための作用剤の好適な製造方法は先ず物体に作用する微生物作用物を提供し、次に該微生物作用物を造形物質と中間物に結合させ、最後に該中間物に造形剤を添加してこの中間物を造形し、作用剤を形成する。以下、これらステップの詳細を説明する。

30

【0020】

先ず該微生物作用物を携帯するキャリアを提供する。本発明では学名がグリオクラディウムビレンスというカビ毒産生菌を拮抗菌とし、上記作用剤中の微生物作用物として使用する。この微生物作用物は学名が *Rhizoctonia solani* AG-1 という水稻立枯病原菌を拮抗するためのもので、水稻立枯病の防除として用いられる。

【0021】

次に、粘合物、培養液及びフロート剤を含んでなる造形物質を添加する。その中、使用される粘合物は 2 % のアルギン酸ナトリウムであり、塩化カルシウムと凝集作用を起して造形用に供される。また使用される培養液は該微生物作用物質 (即ち、本発明記載のグリオクラディウムビレンス) の培養に用いられる厚孢子培養液である。そして該フロート剤は水と親和しない物質を用い、又は空気を打込むことにより該作用剤に浮動性質を持たせるもので、本発明においては 10 % の、水と親和しない物質例えば植物性大豆サラダ油が用いられる。

40

【0022】

最後に、塩化カルシウム (CaCl_2) 溶液を造形剤として添加し、上記アルギン酸ナトリウムと凝集する作用を生じさせ、乾燥後、カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスを含有する浮動性微生物作用剤を完成する。

【0023】

このカビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスを含んでいる拮抗菌が上記作用剤中の微生物

50

物作用物として水稻立枯病を防除拮抗することに応用される生物防除実験では、これが浮動性微生物作用剤を有していることを利用して浮力により水耕植物系統を水面上に浮上らせて生物防除試験を実施する。水の表面張力及び水の流れがこの浮動性微生物作用剤を駆使して水稻稲稈に近寄せ、ひいてはしっかり水稻葉身上に吸着されることにより、葉身の生長空間を占めて葉身上で生存する。この時に、病原が近付くと抗生作用、超寄生作用及び競争作用を引起し、病原活性を抑制して病害の防除効果を達成する。以下、その実施過程及び結果を説明する。

【 0 0 2 4 】

第 1 の試験区において、水稻の田植後、水稻粉芽盛期の約 5 0 日目の時にカビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスの浮動性微生物作用剤を第 1 の試験区中の各小区毎に均一に 1 0 0 g、そして週毎にさらに 5 0 g 投与する。同じ方式で、なんらの防除措置のない小区に投与して対照試験組とし、かつ、カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンス微生物の厚孢子培養液を 1 回のみ及び 3 回投与して試験する。以上の試験はそれぞれ 4 回重複施行すると共に、水稻生長期間において紙蓆の変化及び水稻紋枯病の発生確率を記録する。そして収穫時には水稻の刈りたて重量及び乾燥重量を記録すると共に、水稻立枯病に罹った水稻病株上の病斑の相対病斑高度を測量する。その相対病斑高度 (R e l a t i v e L e s i o n H e i g h t) は以下の式により算出される。

【 0 0 2 5 】

【数 1】

$$\text{相 対 病 斑 高 度 (\%)} = \frac{\text{可 視 病 斑 最 高 点 (cm)}}{\text{水 稻 植 物 体 高 度 (cm)}} \times 100\%$$

(Relative Lesion Height)

【 0 0 2 6 】

次に第 2 試験区において、水稻の田植後、水稻生長 7 0 日目の時にカビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスの浮動性微生物作用剤を第 2 の試験区中の各小区毎に均一に 1 0 0 g、7 7 日目に各小区毎にさらに 1 0 0 g、そして 8 4 日目に各小区毎にさらに 5 0 g 投与する。また別に同じ方式で、なんらの防除措置のない小区に投与して対照試験組とし、かつ、カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンス微生物の厚孢子培養液を 1 回のみ及び 3 回投与して試験する。以上の試験はそれぞれ 4 回重複施行する。そして、水稻立枯病に罹った水稻病株上の病斑の相対病斑高度 (R e l a t i v e L e s i o n H e i g h t) を測量する。その相対病斑高度は以下の式により算出される。

【 0 0 2 7 】

【数 2】

$$\text{相 対 病 斑 高 度 (\%)} = \frac{\text{可 視 病 斑 最 高 点 (cm)}}{\text{水 稻 植 物 体 高 度 (cm)}} \times 100\%$$

(Relative Lesion Height)

【 0 0 2 8 】

表 1 に第 1 の試験区の試験結果を示す。この表 1 から分るように、カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスの浮動性微生物作用剤を投与した相対病斑高度は 1 3 . 4 %、カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンス微生物の厚孢子培養液を 3 回投与した相対病斑高度は 2 3 . 4 %、そしてカビ毒産生菌グリオクラディウムビレンス微生物の厚孢子培養液を 1 回投与した相対病斑高度は 3 7 . 6 %であり、この 3 試験結果をなんらの防除措置のない小区の対照試験組と対照して比較したところ、なんらの防除措置のない対照試験組は 4 1 . 4 %を示し、統計上明らかな差異を表し、カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスの浮動性微生物作用剤を投与した水稻に、その相対病斑高度が降下し、防除効果を有していることが裏けられた。また、前記の、カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンス G - 8 の

浮動性微生物作用剤を投与した稲の刈りたて重量、カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンス G - 8 微生物の厚孢子培養液を 3 回投与した稲の刈りたて重量、及びカビ毒産生菌グリオクラディウムビレンス G - 8 微生物の厚孢子培養液を 1 回投与した稲の刈りたて重量はそれぞれ $8148.8 \text{ kg} / 10000 \text{ m}^2$ 、 $7917.3 \text{ kg} / 10000 \text{ m}^2$ 及び $7593.2 \text{ kg} / 10000 \text{ m}^2$ であった。一方、なんらの防除措置のない対照組の稲の刈りたて重量は $5898.7 \text{ kg} / 10000 \text{ m}^2$ であった。また同じ方式で処理した前記 3 種の稲の乾燥重量はそれぞれ $6852.4 \text{ kg} / 10000 \text{ m}^2$ 、 $6620.9 \text{ kg} / 10000 \text{ m}^2$ 及び $6250.5 \text{ kg} / 10000 \text{ m}^2$ であり、一方対照組の乾燥重量は $5648.6 \text{ kg} / 10000 \text{ m}^2$ であり明らかな差異を示した。

【0029】

10

表 2 に第 2 の試験区の試験結果を示す。この表 2 から分るように、カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスの浮動性微生物作用剤を投与した相対病斑高度は 18.75% 、カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンス微生物の厚孢子培養液を 3 回投与した相対病斑高度は 13.5% 、そしてカビ毒産生菌グリオクラディウムビレンス微生物の厚孢子培養液を 1 回投与した相対病斑高度は 29.5% であり、この 3 試験結果をなんらの防除措置のない小区の対照試験組と対照して比較したところ、なんらの防除措置のない対照試験組は 47.25% を示し、統計上明らかな差異を表し、カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスの浮動性微生物作用剤を投与した水稻に、その相対病斑高度が低下し、防除効果を有していることが裏付けられた。

【0030】

20

試験結果

表 1：第 1 の試験区においてカビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスの浮動性微生物作用剤を投与して水稻生物の防除とした結果を示す。

【0031】

【表 1】

処 理 方 法	相対病斑高度 (%)	稲刈りたて重量 (kg/10000m ²)	稲刈りたて重量 (kg/10000m ²)
カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスの浮動性微生物作用剤を投与	13.4	8148.8	6852.4
カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンス微生物の厚孢子培養液を 3 回投与	23.4	7917.3	6620.9
カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンス微生物の厚孢子培養液を 1 回投与	37.6	7593.2	6520.5
なんらの防除措置のない対照試験組	41.4	6898.7	5648.6

30

(付注：以上、表 1 の同一欄内の各項数値は Duncan's 多重範囲を通して分析検出したもので、 $P = 0.05$ 以下では顕著な差異 (Significantly Different) が見えなかった。その数値は個別的に十分その 4 重複実験値を代表することができる。)

40

【0032】

表 2：第 2 の試験区においてカビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスの浮動性微生物作用剤を投与して水稻生物の防除とした結果を示す。

【0033】

【表 2】

処 理 方 法	相対病斑高度 (%)
カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンスの浮動性微生物作用剤を投与	18.75
カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンス微生物の厚孢子培養液を3回投与	13.5
カビ毒産生菌グリオクラディウムビレンス微生物の厚孢子培養液を1回投与	29.5
なんらの防除措置のない対照試験組	47.25

10

(付注：以上、表2の同一欄内の各項数値はDuncan's多重範囲を通して分析検出したもので、 $P = 0.05$ 以下では顕著な差異(Significantly Different)が見えなかった。その数値は個別的に十分その4重複実験値を代表することができる。)

【0034】

要するに、本発明により開示された、微生物作用剤の製造方法を応用して得た産品は生物の防除上において確実に植物病害を防除でき、水稻植物体の病菌に感染される相対病斑高度が低下すると共に、各種類の該作用剤を製造する方法に広く応用され、これにより生物病害を防除して十分に本発明の目的を達成でき、産業の利用可能性に大きく寄与する。

20

【0035】

また、上記に開示された実施例は本発明をより具体的に説明するために挙げたもので、当然本発明の技術的思想はこれに限定されるべきでなく、添付クレームの範囲を逸脱しないかぎり、当業者による単純な設計変更付加、置換はいずれも本発明の技術的範囲に属する。

【国际公开パンフレット】

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局(43) 国际公布日:
2002年2月21日(21.02.02)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 02/13613 A1

- (51) 国际分类号: A01N 63/00
(21) 国际申请号: PCT/CN00/00237
(22) 国际申请日: 2000年8月16日(16.08.00)
(25) 申请语言: 中文
(26) 公布语言: 中文
(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 永丰余造纸股份有限公司(YUEN FOONG YU PAPER MFG CO., LTD.) [CN/CN]; 中国台湾省台北市重庆南路二段51号15楼, Taiwan (CN).
(72) 发明人: 及
(75) 发明人/申请人(仅对美国): 谢式钰(HSIEH, Shihpanyu) [CN/CN]; 中国台湾省台北市重庆南路二段51号15楼, Taiwan (CN). 黄晋志(HUANG, Ruizhi) [CN/CN]; 中国台湾省桃园县大溪镇瑞源里18邻96号, Taiwan (CN).
(74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号, Shanghai 200233 (CN).
- (81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW
(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
本国际公布:
— 包括国际检索报告。
所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING WORKING REAGENT AND FOR BIOLOGICAL PREVENTION OR CONTROL

(54) 发明名称: 一种作用剂制造方法及其生物防治之应用

(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing a microorganism working reagent and the use of said working reagent for biological prevention or control. Said method comprises the steps of: providing a microorganism working substance which acts on a plant, combining said microorganism working substance with a molding material so as to form an intermediate, and, finally, adding a molding agent into the said intermediate so as to form the said working reagent. Thereafter, the said working reagents which comprising a microorganism working substance is contacted with a plant to release said microorganism working substance onto the plant for preventing or controlling plant diseases or pests.

(57) 摘要

本发明系关于一种微生物作用剂之制造方法及其在生物防治之应用, 其步骤包含提供一种微生物作用物, 使其作用于一植物体, 再使此微生物作用物与一造型物质结合成一中间物, 最后加入一造型剂, 俾予造型而形成一微生物作用剂; 并应用此具有微生物作用物之作用剂与一植物体接触, 使此微生物作用剂释出此微生物作用物于植物体上, 以防治植物病害。

WO 02/13613 A1

WO 02/13613

PCT/CN00/00237

一种作用剂制造方法及其生物防治之应用发明领域

本发明系关于一种微生物作用剂之制造方法及其于生物防治的应用，以防治
5 生物受病害感染之机会。

发明背景

一般在对于防治植物病虫害，以往皆以使用农药来进行防治植物病虫害，以提高作物产量及降低作物罹患病害的机率。但农药本身是一种化学制剂，若施用的
10 浓度过高及接近采收后期才施用，此因使用的方法不当，会使作物产生农药残留的
毒性问题，而危及人们的健康，造成农药积聚于人们体内或急性中毒现象。

而现阶段在以非农药方式防治植物病害上，以一种微生物来进行生物性防治，已成为可能，利用微生物来防治植物病害，可以解除农药残留于作物之问题以
维护人们健康，亦可消除大量使用农药危害环境的问题。

15 一般在施用生物防治方法时，是利用喷洒方式将该防治性微生物施用于作物
栽培区，但此种方式并不能确实将该防治性微生物确切的送至病原侵入的位置。以
水稻枯纹病为例，病原侵入的位置最常见于叶鞘上，若以喷洒方式来操作防治病虫害
的过程，会因为实施喷洒的水稻叶横阻喷杆的移动，造成水稻于植物体上产生伤口，
20 同时因喷杆的移动不易，更造成大量伤口处见于水稻植物体上，非但不能有效
作用于叶鞘上，反而增加其他病原菌侵入该受伤水稻的机会，使发生病害的机会提
高。

因此，本发明鉴于习之技术之缺失，乃悉心试验与研究并一本锲而不舍之精
神，终创作出本发明“一种作用剂之制造方法及其于生物防治之应用”，以解决上
述之施用缺失与伤害。以下为本案之简要说明。

25

发明简要说明

本发明之目的在于提供一种微生物作用剂以代替传统农药之使用，解决大量
农药被滥用与使用不当之问题。

30 本发明之另一目的在于提供一种微生物作用剂及其应用于生物防治，能正确
的进入病原造成植物病害的途径位置，以提升病害防治与杀死病原的效果。

本发明之又一目的为提供一微生物作用剂及其应用于生物防治之方法，使该
微生物性作用剂作用于该受作用之植物体，以进行抗生作用、超寄生作用与竞争作

WO 02/13613

PCT/CN00/00237

用等用于抑制病原之活性，达到防治病害之目的。

是以本发明之主要目的，在提供一种微生物作用剂之制造方法，其制造法包含提供一种微生物作用物，其可作用于一物体，其次使此微生物作用物与一造型物质结合成一中间物，最后加入一造型剂，俾予造型而形成该作用剂。

- 5 根据上述构想，其中该作用剂更包含一载体，用以携带该微生物作用物。而其中之微生物作用物，为一种拮抗菌，系为黏帚霉菌 *Gliocladium virens*，用以拮抗水稻纹枯病原菌(*Rhizoctonia solani*)AG-1。

- 根据上述构想，其中该造型物质含有一粘合物、一培养液与一漂浮剂。该粘合物为藻酸钠(Sodium Alginate)，供以作造型之用；该培养液为一种厚孢子培养液，用以培养该微生物作用物；该漂浮剂可以是一不与水亲和之物质或是空气，以提供该作用剂具有一漂浮性质，其中该不与水亲和之物质为一植物性沙拉油之大豆沙拉油。

- 10 根据上述构想，其中该造型剂为氯化钙(CaCl_2)溶液，用以与该造型物质中之一粘合物产生凝聚作用，其中该粘合物为藻酸钠(Sodium Alginate)，为供以作造型之用。

本发明之再另一重要目的为提供一种以作用剂进行作用之方法，此方法包含提供一作用剂，该作用剂具有一微生物作用物，并使该作用剂与一物体接触，从而使该作用剂释出该微生物作用物于该物体。

- 15 根据上述构想，该作用剂与该物体接触之方式为使该作用剂吸附于该物体上。

本发明之再另一重要目的为提供一种以作用剂防治植物病害之方法，方法包含提供一作用剂，且该作用剂具有一微生物作用物，其可用以防治一种植物病害，经使该作用剂与一植物体接触后，使该作用剂释出该微生物作用物于该植物体上，以进行防治植物病害。

- 20 根据上述构想，其中该方法适用于一植物水耕系统。

由上所述，本发明得藉由下面之实施例中之详细说明，俾得更深入了解。

实施例说明

- 30 本发明提供一种作用剂之最佳制造方法，其方法为：首先提供一种微生物作用物，用于作用于一物体；再使该微生物作用物与一造型物质结合成一中间物，最后加入一造型剂，俾予造型而形成该作用剂。其详细步骤说明如下所述。

首先提供以一载体，用以携带该微生物作用物。在本发明中是以一种黏帚霉

WO 02/13613

PCT/CN00/00237

菌，其学名为 *Gliocladium virens* 作为一拮抗菌，来作为上述作用剂中之微生物作用物，用以拮抗水稻纹枯病原菌，其学名为 *Rhizoctonia solani* AG-1，以作为防治水稻纹枯病之用。

接著，再添加入一造型物质，此造型物质含有一粘合物、一培养液与一漂浮剂。其中所使用的粘合物为 2% 的藻酸钠(Sodium Alginate)，可与氯化钙产生凝聚作用，供以作造型之用，所使用之培养液为一种厚孢子培养液，是用来培养微生物作用物质，即本发明所述之 *Gliocladium virens* 黏帚霉菌。而漂浮剂，可使用一不与水亲和之物质或是以打入空气的方式，来提供该作用剂具有一漂浮性质，在本发明中是使用 10% 的一不与水亲和之物质之植物性大豆沙拉油，作为漂浮剂。

最后步骤加入一氯化钙(CaCl₂)溶液作为造型剂，与上述之藻酸钠(Sodium Alginate)，产生凝聚作用，经干燥后，即完成此具有黏帚霉菌 *Gliocladium virens* 之漂浮性微生物作用剂制造过程。

在有关于应用此含有黏帚霉菌 *Gliocladium virens* 之拮抗菌，作为上述作用剂中之微生物作用物，以防治拮抗水稻纹枯病之生物防治实验，乃利用此具漂浮性微生物作用剂，可藉由浮力漂浮一水耕植物系统水面上的特性，而据以实施生物防治试验。因为水的表面张力及水的流动驱使此漂浮性微生物作用剂会向水稻稻秆靠近，而紧紧吸附在水稻叶鞘上，藉以占据叶鞘生长空间，并存活于叶鞘上，在病原靠近时，随即进行抗生作用、超寄生作用与竞争作用来抑制病原活性，达到病害防治功效。其实施过程与结果说明如下。

在第一试验区，是以水稻插秧后，在水稻分蘖盛期约在第 50 天时，均匀施用黏帚霉菌 *Gliocladium virens* 之漂浮性微生物作用剂于第一试验区中的每一小区，每小区施用量为 100 克，隔周每小区再施用 50 克。如上述方式，并加上一无任何防治措施之小区以作为对照试验组及一只施用黏帚霉菌 *Gliocladium virens* 微生物之厚孢子培养液 1 次与 3 次之试验来操作。以上之试验，各施以四重复试验，并在水稻生长期间纪录纸席变化及水稻纹枯病发生机率，且于收割时纪录水稻之鲜重与干种，及测量罹患水稻纹枯病之水稻病株上病斑的相对病斑高度，其相对病斑高度，是以下列式子计算而得：

$$\text{相对病斑高度 (Relative Lesion Height)} \% = \frac{\text{可见病斑最高点 (Highest Point a Lesion Is Seen)cm}}{\text{水稻植物体高度 (Plant Height)cm}} \times 100\%$$

在第二试验区，是以水稻插秧后，在水稻生长第 70 天时，均匀施用黏帚霉菌

WO 02/13613

PCT/CN00/00237

5 Gliocladium virens 之漂浮性微生物作用剂于第一试验区中的每一小区，每小区施用量为 100 克，第 77 天每小区再施用 100 克，第 84 天每小区再施用 50 克。如上述方式，并加上一无任何防治措施之小区以作为对照试验组及一只施用黏帚霉菌 Gliocladium virens 微生物之厚孢子培养液 1 次与 3 次之试验来操作。以上之试验，各施以四重复试验。并测量罹患水稻枯纹病之水稻病株上病斑的相对病斑高度，其相对病斑高度，是以下列式子计算而得：

$$\text{相对病斑高度 (Relative Lesion Height)} \% = \frac{\text{可见病斑最高点 (Highest Point a Lesion Is Seen)cm}}{\text{水稻植物体高度 (Plant Height)cm}} \times 100\%$$

在第一试验区，其试验结果详见表一。由表一中可知，经施用黏帚霉菌 Gliocladium virens 之漂浮性微生物作用剂的相对病斑高度为 13.4 %，施用黏帚霉菌 Gliocladium virens 微生物之厚孢子培养液 3 次的相对病斑高度为 23.4 %，施用黏帚霉菌 Gliocladium virens 微生物之厚孢子培养液 1 次的相对病斑高度为 37.6 %，此三试验结果经与无任何防治措施之小区的对照试验组，其相对病斑高度为 41.4 % 比较后，在统计上皆呈现明显的差异，显示该施用黏帚霉菌 Gliocladium virens 之漂浮性微生物作用剂的水稻，其相对病斑高度降低，具有防治效果。另外经前述三种施用黏帚霉菌 Gliocladium virens G-8 之漂浮性微生物作用剂、施用黏帚霉菌 Gliocladium virens G-8 微生物之厚孢子培养液 3 次与施用黏帚霉菌 Gliocladium virens G-8 微生物之厚孢子培养液 1 次处理之稻谷鲜重分别为 8148.8 公斤/公顷、7917.3 公斤/公顷与 7593.2 公斤/公顷重，亦与无任何防治措施之对照组的 5898.7 公斤/公顷的产量比较后，呈现明显差异。相同的，前述三种处理之稻谷干重分别为 6852.4 公斤/公顷、6620.9 公斤/公顷与 6250.5 公斤/公顷重，亦与对照组之 5648 公斤/公顷呈现明显差异。

在第二试验区，试验结果详见表二。由表二可见，经施用黏帚霉菌 Gliocladium virens 之漂浮性微生物作用剂的相对病斑高度为 18.75 %，施用黏帚霉菌 Gliocladium virens 微生物之厚孢子培养液 3 次的相对病斑高度为 13.5 %，施用黏帚霉菌 Gliocladium virens 微生物之厚孢子培养液 1 次的相对病斑高度为 29.5 %，此三试验结果与无任何防治措施之小区的对照试验组，其相对病斑高度为 47.25 %，经比较后，皆呈现明显的差异，显示该施用黏帚霉菌 Gliocladium virens 之漂浮性微生物作用剂的水稻，其相对病斑高度降低，具有防治效果。

30

WO 02/13613

PCT/CN00/00237

试验结果

表一：于第一试验区施用黏帚霉菌 *Gliocladium virens* 之漂浮性微生物作用剂作为水稻生物防治的结果。

处理方法	相对病斑高度(%)	稻谷鲜重(公斤/公顷)	稻谷干重(公斤/公顷)
施用黏帚霉菌 <i>Gliocladium virens</i> 之漂浮性微生物作用剂	13.4	8148.8	6852.4
施用黏帚霉菌 <i>Gliocladium virens</i> 微生物之厚孢子培养液 3 次	23.4	7917.3	6620.9
施用黏帚霉菌 <i>Gliocladium virens</i> 微生物之厚孢子培养液 1 次	37.6	7593.2	6250.5
无任何防治措施之对照试验组	41.4	6898.7	5648.6

- (附注：以上，表格一之同一栏内之各项数值，经 Duncan's 多重范围分析检测过，在 $p=0.05$ 下，并无显著差异(Significantly Different)存在，其数值足可个别代表其四重复实验值。)

表二：于第二试验区施用黏帚霉菌 *Gliocladium virens* 之漂浮性微生物作用剂作为水稻生物防治的结果。

处理方法	相对病斑高度(%)
经施用黏帚霉菌 <i>Gliocladium virens</i> 之漂浮性微生物作用剂	18.75
施用黏帚霉菌 <i>Gliocladium virens</i> 微生物之厚孢子培养液 3 次	13.5
施用黏帚霉菌 <i>Gliocladium virens</i> 微生物之厚孢子培养液 1 次	29.5
无任何防治措施之对照试验组	47.25

- (附注：以上，表格一之同一栏内之各项数值，经 Duncan's 多重范围分析检测过，在 $p=0.05$ 下，并无显著差异(Significantly Different)存在，其数值足可个别代表其四重复实验值。)

- 综上所述，可知本发明所揭露之应用此一微生物作用剂制造方法而得的产品于生物防治上，相对于习知技术，确实能达到防治植物病害，降低水稻植物体受病原菌感染之病斑相对高度，且可广泛应用于欲各类欲制造该作用剂之方法及其应用于生物防治方面，充分达成本发明之目的。本发明得由熟悉此技艺之人士任施匠思而为诸般修饰，然皆不脱如附专利申请专利范围所欲作用者。

WO 02/13613

PCT/CN00/00237

权 利 要 求

- 1.一种作用剂制造方法，包含以下步骤：
- (1)提供一种微生物作用物，该微生物作用物可作用于一物体；
- 5 (2)使该微生物作用物与一造型物质结合成一中间物；
- (3)加入一造型剂，俾予该中间物造型而形成该作用剂。
- 2.如权利要求 1 所述的方法，其中该作用剂更包含一载体，用以携带该微生物作用物。
- 3.如权利要求 1 所述的方法，其中该微生物作用物，系为一种拮抗菌。
- 10 4.如权利要求 3 所述的方法，其中该拮抗菌，系为黏帚霉菌 *Gliocladium virens*。
- 5.如权利要求 4 所述的方法，其中该拮抗菌系用以拮抗水稻纹枯病原菌 (*Rhizoctonia solani*)AG-1。
- 6.如权利要求 1 所述的方法，其中该造型物质含有一粘合剂、一培养液与一漂浮剂。
- 15 7.如权利要求 6 所述的方法，其中该粘合剂为藻酸钠(Sodium Alginate)，供以作造型之用。
- 8.如权利要求 6 所述的方法，其中该培养液为一种厚孢子培养液，用以培养该微生物作用物。
- 9.如权利要求 6 所述的方法，其中该漂浮剂，系选自于一不与水亲和之物质与空气其中之一，以提供该作用剂具有一漂浮性质。
- 20 10.如权利要求 9 所述的方法，其中该不与水亲和之物质为一植物性沙拉油，系为一大豆沙拉油。
- 11.如权利要求 1 所述的方法，其中该造型剂为氯化钙溶液，用以与该造型物质中之一粘合剂产生凝聚作用。
- 25 12.如权利要求 11 所述的方法，其中该粘合剂为藻酸钠(Sodium Alginate)，供以作造型之用。
- 13.一种以作用剂进行作用之方法，包含：
- (1)提供一作用剂，该作用剂具有一微生物作用物；
- (2)使该作用剂与一物体接触；
- 30 (3)使该作用剂释出该微生物作用物于该物体。
- 14.如权利要求 13 所述的方法，其中该作用剂更包含一载体，用以携带该微生物作用物。

WO 02/13613

PCT/CN00/00237

- 15.如权利要求 13 所述的方法,其中该微生物作用物,系为一种拮抗菌。
- 16.如权利要求 15 所述的方法,其中该拮抗菌,系为黏帚霉菌 *Gliocladium virens*。
- 17.如权利要求 16 所述的方法,其中该拮抗菌系用以拮抗水稻纹枯病原菌
- 5 (Rhizoctonia solani) AG-1。
- 18.如权利要求 13 所述的方法,该作用剂与该物体接触之方式为使该作用剂吸附于该物体上。
- 19.一种以作用剂防治植物病害之方法,包含:
- 10 (1)提供一作用剂,该作用剂具有一微生物作用物,其可用以防治一种植物病害;
- (2)使该作用剂与一植物体接触;
- (3)使该作用剂释出该微生物作用物于该植物体,以进行防治植物病害。
- 20.如权利要求 19 所述的方法,其中该方法适用于一植物水耕系统。
- 21.如权利要求 19 所述的方法,其中该作用剂更包含一载体,用以携带该微生物作用物。
- 15 22.如权利要求 19 所述的方法,其中该微生物作用物,系为一种拮抗菌。
- 23.如权利要求 22 所述的方法,其中该拮抗菌,系为黏帚霉菌 *Gliocladium virens*。
- 24.如权利要求 23 所述的方法,其中该拮抗菌系用以拮抗水稻纹枯病原菌
- 20 (Rhizoctonia solani)AG-1。
- 25.如权利要求 19 所述的方法,该作用剂与该物体接触之方式为使该作用剂吸附于该物体上。

国际检索报告		国际分类号 PCT/CN00/00237
A. 主题的分类 IPC ⁷ A01N63/00 按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号) IPC ⁷ A01N, C12N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词) WPI, CNPAT		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
X	US4724147(James J. Marois 等) 1988年2月9日, 见全文	1-25
X	US4668512(Jack A. Lewis 等) 1987年5月26日, 见全文	1-25
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的专用类型: "A" 明确表示了一般现有技术, 不认为是特别相关的文件 "E" 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的 "L" 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件 "P" 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件 "T" 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了解构成发明基础的理论或原理 "X" 特别相关的文件, 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性 "Y" 特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性 "&" 同族专利成员的文件		
国际检索实际完成的日期 17.10 月 2000(17.10.00)		国际检索报告邮寄日期 02.11月2000(02.11.00)
国际检索单位名称和邮寄地址 中国专利局 中国北京市海淀区西土城路6号(100088) 传真号: 86-10-62019451		受权官员 常牙 电话号码: 86-10-62093906

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN00/00237
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC ⁷ A01N63/00		
According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)		
IPC ⁷ A01N, C12N		
Documentation searched other than <i>minimum</i> documentation to the extent that such documents are included in the field searched		
Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNPAT, WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
X	US4724147(James J. Marois et al) 9 February 1988, See the whole document	1-25
X	US4668512(Jack A. Lewis et al) 26 May 1987, See the whole document	1-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 October 2000(17.10.2000)		Date of mailing of the international search report 02 NOV 2000 (02.11.00)
Name and mailing address of the ISA/ The Chinese Patent Office 6, Xitucheng Road, Haidian District, Beijing, 100088, China Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer CHANG,mao Telephone No. 86-10-62093906

Form PCT/ISA/210(second sheet)(July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
// C 1 2 N 1/14	C 1 2 N 1/14	A

(74)代理人 100109830

弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(72)発明者 シェ、スペイン

台湾、タイツォンスナンチナンメンリナンメンルウ 1 5 リン 5 9 シャン 2 5 ロン 8 ハウ

(72)発明者 ファン、ズエイツ

台湾、タウエンシェンタシツンズエイエンリ 1 8 リン 9 6 ハウ

F ターム(参考) 4B065 AA57X AC14 AC20 BD22 BD31 BD38 BD43 CA47

4H011 AA01 BA04 BB21 BC18 BC19 BC22 DA02 DD01 DG16 DH15