



(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 201225844 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：100138032

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 10 月 20 日

(51)Int. Cl. : *A01N63/02 (2006.01)*
A01P5/00 (2006.01)

A01N61/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/10/25 美國

61/406,569

(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)；黃華章 HUANG, HUAZHANG (CN)；科伊武寧 瑪莉亞 KOIVUNEN, MARJA (FI)；魅潤 帕梅拉 MARRONE, PAMELA (US)

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：28 項 圖式數：9 共 60 頁

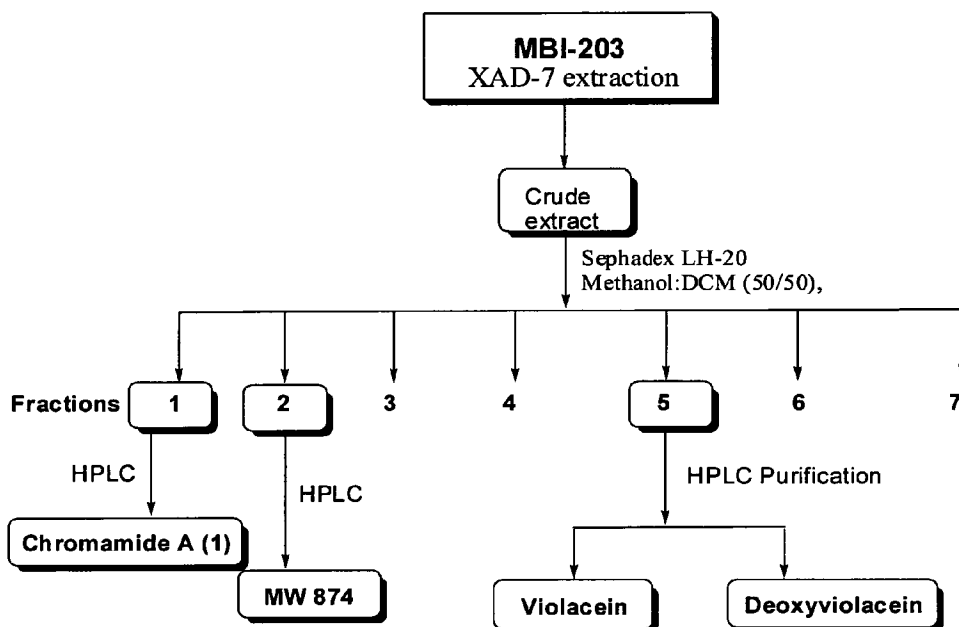
(54)名稱

色桿菌之活性組成份與代謝物

CHROMOBACTERIUM BIOACTIVE COMPOSITIONS AND METABOLITES

(57)摘要

本發明揭露一種源自色桿菌的生物活性成分和代謝物，尤其是色桿菌的培養物，可用作為控制蟲害的方法。





(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 201225844 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：100138032

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 10 月 20 日

(51)Int. Cl. : *A01N63/02 (2006.01)*
A01P5/00 (2006.01)

A01N61/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/10/25 美國

61/406,569

(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)；黃華章 HUANG, HUAZHANG (CN)；科伊武寧 瑪莉亞 KOIVUNEN, MARJA (FI)；魅潤 帕梅拉 MARRONE, PAMELA (US)

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：28 項 圖式數：9 共 60 頁

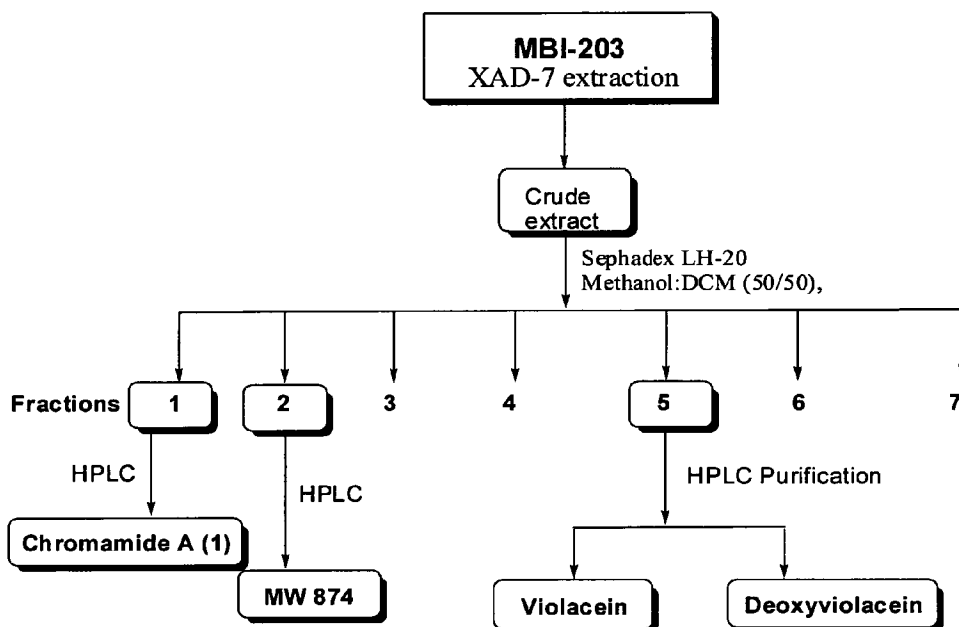
(54)名稱

色桿菌之活性組成份與代謝物

CHROMOBACTERIUM BIOACTIVE COMPOSITIONS AND METABOLITES

(57)摘要

本發明揭露一種源自色桿菌的生物活性成分和代謝物，尤其是色桿菌的培養物，可用作為控制蟲害的方法。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明所揭露為源自色桿菌 (*Chromobacterium*) 的生物活性成分和代謝物，尤其是色桿菌 (*Chromobacterium substugae*) 的培養物，可用於控制蟲害，作為蟲害控制的方法。

【先前技術】

屬微生物、植物和其他生物的天然產物。微生物的天然產物為豐富的化學多樣性來源，天然產物用於醫藥上已有悠久的歷史。雖然著重於人體的天然療法，其中有 50% 以上來自天然產物中，而只有 11% 的農藥，則來自天然成份。然而，天然產物製成的農藥，可能在傳統和有機農場中，發揮控制害蟲的重要作用。微生物（細菌、放線菌和真菌）產生的次生代謝物提供新的化學化合物成份，可用於單方或混合已知的化合物成份，而有效控制病蟲害，減少增強耐藥性的風險。有許多著名的微生物的天然產物，已成功用於農藥上 (Thompson et al., 2000; Arena et al., 1995; Krieg et al. 1983)。

微生物農藥的發展，始於微生物純培養物的析離。然後，即藉由體外、體內、溫室或田野試驗，有效進行頻譜篩選。同時，微生物產生的活性化合物，則進行析離和鑑定。關於微生物殺蟲劑的商品化，需在工業經濟規模下，發酵生產微生物，並制定生物相容性和核可的添加劑，以提高藥效，將應用的易用性和田野栽培儲存的化學穩定性最大化。

隨著農民期待殺蟲劑的強效作用，在市場上出現新的微生物殺蟲劑產品，而在新舊殺蟲劑產品間，存有各種相互作用的可能性。目前已有二種或以上的農藥，而同時或依序用於同期的作物栽培。為解決這些問題，科學家已使用外用和飼養的方法，來研究油劑、真菌和化學殺蟲劑，對害蟲和益蟲交互作用（例如參見 Chalvet-Monfray, Sabatier et al.; Meunier, Carubel et al. 1999; Hummelbrunner and Isman 2001; Wirth, Jiannino et al.

2004 ; Farenhorst, Knols et al. 2010 ; Shapiro-Ilan, Cottrell et al. 2011 等)。但目前尚未對所有的交互作用進行研究。

色桿菌

Beta-Proteobacterium 系的色桿菌顯示對許多昆蟲具有殺蟲活性(Martin, Blackburn et al. 2004 ; Martin 2004 ; Martin, Gundersen-Rindal et al. 2007; Martin, Hirose et al. 2007; Martin, Shropshire et al. 2007)。作用模式顯示具有拒食和毒素活性的結合作用，在致死劑量下，觀察到餵養上的抑制作用(Martin, Gundersen-Rindal et al. 2007)。特別是，已發現到色桿菌可有效控制科羅拉多馬鈴薯甲蟲成蟲 (*Leptinotarse decemlineata*)、西部玉米根蟲成蟲 (*Diabrotica virgifera*)、南方玉米根蟲幼蟲 (*Diabrotica undecimpunctata*)、小蜂房甲蟲幼蟲 (*Aethina tumida*)、小菜蛾幼蟲 (*Plutella xylostella*)、甘藷粉蟲成蟲和幼蟲 (*Bernisia tabaci*)和南綠椿象成蟲 (*Nezara viridula*)的蟲害。

自 Martin 和其同事發現色桿菌以來，至少已析離和區辨出三個色桿菌的新品種；Young et al. (2008)是自台灣水質樣本中，析離出一個新的色桿菌品種 (*C. aquaticum*)，而 Kampfer et al. (2009)也自馬來西亞的環境樣本中，析離出二個品種 (*C. piscinae* 和 *C. pseudoviolaceum*)。

色桿菌屬的次生代謝物

在所有已知的色桿菌中，對於紫色色桿菌(*C. violaceum*)有最多的研究，關於色桿菌的次生代謝物，其相關研究的資訊則只限於紫色色桿菌(*C. violaceum*)的研究。Durán 和 Menck (2001)已就紫色色桿菌(*C. violaceum*)即來自土壤和水中的革蘭陰性腐生菌，在藥理和工業上，發表其研究論述。此菌種通常對人類無致病性，但具有致病條件，偶而在人體和動物中，成為感染致命敗血症的病原體。紫色色桿菌(*C. violaceum*)已知可產生紫色桿菌素，是由二個 L-色氨酸分子接合氧氣所生成(Hoshino et al., 1987; Ryan and Drennan; 2009)。紫色桿菌素的生物合成作用受數量感應調節，為某種共同的調節機制，在革

蘭氏陰性菌中，調節其他不同的代謝途徑(McClean et al., 1997)。

其他由 Durán 和 Menck (2001)，就紫色色桿菌(*C. violaceum*)已知代謝物摘要列出的研究中，包括有(2001) 氰化氫、醯胺鐵 E、B-內醯胺分解酶糖肽類抗生素 SQ28,504 和 SQ28,546，抗生素如氣花青、氣色菌素、3,6-dihydroxy-indoxazene 和 monobactam SB-26.180 和 antitumoral depsipeptide FR901228。依據 Durán 和 Menck (2001) 的研究，紫色色桿菌(*C. violaceum*)也產生不尋常的糖化合物，如胞外多醣和脂多醣。

線蟲和殺線蟲劑

線蟲是不分段兩側對稱的蠕蟲狀無脊椎動物，具有體腔和完整的消化系統，但無呼吸和循環系統。其體壁由多層的角質層、四縱線的皮下組織和內部肌肉所組成(Chitwood, 2003)。身體大部份為消化和生殖系統。大部分的線蟲可自由生活，但有的品種是無處不在的動物或植物寄生蟲。

根結線蟲 (*Meloidogyne* spp.)寄生於許多的一年生和多年生作物中，而同時影響作物的產量和品質。本屬的線蟲公認是經濟植物中，最重要的寄生線蟲 (Whitehead, 1998)。植物寄生線蟲每年造成的作物損失，估計超過 1000 億美元(Koenning et al. 1999)，超過一半是根結線蟲屬造成的蟲害。此菌系的接種體來自蟲卵，在有利的條件下孵化，釋出會造成感染的第二階段幼蟲 (J2S)，在土壤中遷移到寄主植物的根上。藉由根尖滲透而發生感染，然後幼蟲即移至維管束組織，線蟲在該處常駐，直接自植物細胞中得到養分。植物因而生成蟲癭 (根節) 的巨細胞，在整個生殖階段中，雌蟲仍然嵌入植物的組織中，只有蟲卵自根中伸出。

控制根結線蟲最有效的方法是使用殺線蟲劑，可抑制蟲卵的孵化、幼蟲的活動和/或植物的感染。因為環境和生理上的原因，控制植物寄生線蟲農藥的開發是具有挑戰性的工作：1.

大部份的植物寄生性線蟲在靠近根部的土壤中，而難以噴灑殺線蟲劑的農藥。2.線蟲是貧瘠的生化指標，無法滲透到許多的有機分子中(Chitwood, 2003)。此外，口服的有毒化合物投放是幾乎不可能的，因為大多數的植物寄生線蟲品種，在侵入和感染植物的根系後，才會攝取寄主養分。因此，殺線蟲劑往往是具有高揮發性，或具有其他化學和物理性質的高毒素，才能夠促進土壤中的流動性。

在過去十年中，鹵化烴（如二溴乙烯、甲基溴）是世界各地使用最頻繁的殺線蟲劑。因為具有人體的高毒性，而對平流層臭氧具有破壞性，在蒙特羅協議中，已禁止使用這些化合物，因為缺乏替代品，但可使用甲基溴用於防治線蟲和植物病原體。伴隨使用有機磷的成份，氨基甲酸酯類是最有效的非熏類殺線蟲劑。可惜的是，大部分的有機磷殺蟲劑，如涕滅威和殺線威等均屬劇毒物。自 2010 年 8 月起，涕滅威的製造商拜耳公司已同意，取消在美國馬鈴薯和柑橘中的農藥產品註冊，而在 2018 年 8 月底時，涕滅威將徹底淘汰。近日，阿維菌素-是兩種由土壤放射菌(*Streptomyces avermitilis*)生成的除蟲菌素混合物，已註冊用於撲殺殺線蟲(Faske and Starr, 2006)。Syngenta 公司名為 Avicta[®]的市場產品中，作為棉花種子和蔬菜的防治農藥。

據報導有些微生物植物/線蟲病原體，對植物寄生的線蟲具有防止效果 (Guerena 2006)。這些生物控制劑包括細菌類的蘇雲金芽孢桿菌、洋蔥伯克霍爾德菌、穿刺巴氏菌和 *P. usgae*。Pasteuria Biosciences 已開始在美國南方，用於防治草地線蟲。殺線蟲的真菌類包括木黴菌(*Trichoderma harzianum*)、線蟲寄生菌(*Hirsutella rhossiliensis*)、食線蟲真菌(*H. minnesotensis*)、厚垣輪枝孢菌(*Verticillium chlamydosporium*)、線蟲捕捉菌(*Arthrobotrys dactyloides*) 和淡紫擬青黴(*Paecilomyces lilanicus*)(Prophyta 公司的產品名稱為 BioAct[®]和 Melcon[®])另一種真菌疣孢漆斑菌(*Myrothecium verrucaria*)可用於商業配方

上，為 Valent Biosciences 公司的 DiTera[®] 產品。這是已被殺死的真菌成份，因為殺線蟲劑化合物的成份而具有活性。其他商業市售的生物性殺線蟲劑產品，包括有 Deny[®] 和 BlueCircle[®] (B. cepacia)、Activate[®] (Bacillus chitinosporus) (Quarles, 2005) 和以色列的產品 BioNem[®] (Bacillus firmus) (目前由拜耳公司行銷作為種子用的農藥，產品名為 Votivo[®]) (Terefe et al. 2009)。據推測，這些微生物可抑制線蟲蟲卵孵化、幼蟲的活動性和微生物菌株的感染，原因來自這些機制生成的毒素 (Hallman and Sikora, 1996; Marrone et al, 1998; Siddiqui and Mahmood, 1999; Saxena et al., 2000; Meyer and Roberts, 2002)，可寄生或撲殺線蟲 (Siddiqui and Mahmood, 1996; Kerry, 2001; Jaffee and Muldoon, 1995)、誘發系統抵抗作用 (Hasky-Gunther et al. 1998)、改變線蟲的行為 (Sikora and Hoffman-Hergarter, 1993) 或干擾植物的識別功能 (Oostendorp and Sikora, 1990)。

植物殺線蟲劑如植物提取物和精油，可用於防治線蟲 (Kokalis-Burrelle and Rodriguez-Kabana, 2006)。Chitwood 總結利用防治線蟲的植物衍生化合物，進行其研究 (Chitwood, 2002)。Siddiqui 和 Alam (2001) 認為，盆栽土壤與植物加有楝樹 (Azadirachta indica) 和苦楝樹 (Melia azadirah) 的土壤成份，可抑制番茄的根結線蟲。但目前在美國沒有印楝成份的產品，註冊用於防治線蟲。來自智利的新植物性產品 (NEMA - Q[®]) 為 Quillaja saponaria 樹種的含皂質提取物 (皂樹酸的 bidesmosidic 衍生物，在 C-3 以 1 個三糖基取代，在 C-28 以 1 個寡糖取代)，最近已藉由美國環保署註冊為有機的殺線蟲劑，由美國有機資材審查學院 (OMRI) 登錄為有機農用藥劑。成為名為 Monterey AgResources 的市售產品。

通常用於非寄主的作物輪作，而用於防止線蟲種群達到經濟損害規模 (Guerena 2006)。Allelochemicals 是植物生成的化合物，會影響植物環境中的生物行為。殺線蟲劑類的化感物質包括 polythienyls、硫配醣體 (glucisonolates)、生物鹼、脂類、

萜類、甾體，三萜類和酚類 (Kokalis-Burrelle and Rodriguez-Kabana, 2006; Chitwood, 2002)。當成長為覆蓋作物類時，來自化感植物的生物活性物質，在生長期中滲出，和/或在生物質分解過程中，釋出到土壤中。芸薹屬作物可用於生物薰蒸 - 分解土壤納入組織，釋放有害生物的揮發物為殺蟲原理 (Kirkegaard and Sarwar, 1998)。但 Roubtsova 等人 (2007) 對 *M. incognita* 數量對西蘭花組織腐爛效果的影響研究中，即指出為能夠適當的控制，需徹底混合植物的組織和線蟲感染的土壤。

未來在農業土壤中的線蟲防治中，有賴於兩個因素：培養作物的線蟲抵抗能力，發現或開發新而效果廣泛但毒性較低的殺線蟲劑。新的化學殺線蟲劑中，其研究開發和註冊的成本非常高 (超過 20 億美元)，而限制了產品的開發。從 1967 至 1997 年中，在 497 種農藥使用登錄的新活性成份中，只有 7 個註冊作為殺線蟲劑使用 (Aspelin and Grube, 1999)。除了傳統的化學方法，也建議使用 RNA 干擾 (RNAi) 法，用於防治線蟲。藉由 RNAi 的基因沉默作用，最初用秀麗隱桿線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 品種，而最近也用於植物寄生線蟲，如根結線蟲 (Bakhetia et al. 2005)。找尋新的微生物菌系作為生物性殺線蟲劑使用，為重要的目標，可顯著降低植物寄生線蟲造成的經濟損失，也降低目前登錄用於線蟲防治，在有毒藥劑上的用量。

依據 Sasser 和 Freckman (1987 年) 的研究中，世界各地的主要農作物中，線蟲造成的損失範圍從 8% 到 20% 不等。植物寄生線蟲導致相當大的作物損失，估計全球每年損失約 87 億美元 (Dong and Zhang, 2006)。使用抗線蟲病的作物品種和化學性殺線蟲劑，為目前線蟲防治的主要方法選項。如甲基溴的薰蒸劑非常有效，可防治土壤傳播的植物病害和線蟲，但因為對哺乳動物具有高毒性、會消耗臭氧層和生成其他的殘留物，許多國家已禁止使用甲基溴，計畫藉由國際協商下，完全撤出市

場(Oka et al., 2000)。化學替代品如碘甲烷、1,3 - 二氯丙烯和三氯硝甲烷，對哺乳動物和環境也有安全上的問題。目前正逐漸淘汰化學性的非薰蒸殺線蟲劑，最近，美國環保署宣佈將淘汰涕滅威。

【發明內容】

本發明中的產品，均為新用途和新組合的產品，特別是在成份上，含色桿菌菌種和特別的 *Chromobacterium substugae* sp. nov. 菌種成份，尤其是 *Chromobacterium substugae* sp. nov. 的菌種成份，具有美國專利編號 7,244,607 中，NRRL B-30655 的識別特徵。

本發明中的方法為用於植物線蟲的防治方法，用於植物、種子和/或植物生長的基質，為色桿菌菌種的上清液、濾液和/或提取物，和/或一個或多個代謝物，可含有效數量的其他殺線蟲劑物質，而用於防治線蟲。

本發明也提供有一種殺蟲劑成份組合的協同作用，至少可用於某種害蟲的防治，其活性成份為：(a)某種上清液、濾液和/或色桿菌菌種的提取物，和/或一個或更多的代謝物，其成份來自色桿菌菌種的上清液、濾液和/或提取物，(a)和(b)成份同時出現在協同作用中。此害蟲在本發明的具體實例中，可能是某種蟲害，但也可能含有但不限於線蟲、植物真菌、植物病毒、植物細菌和雜草的相關害蟲。此外，該組合可為複合成份。此殺蟲物質可能：(a)來自微生物；(b)天然產物和/或(c)化學性殺蟲劑農藥成份，尤其是化學殺蟲劑的農藥。

尤其是此成份組合，可能含有上清液、濾液和/或色桿菌菌種的提取物，而含有某種的殺蟲劑成份，即來自某種微生物，包括但不限於和/或來自包括微生物，但不僅限於枯草桿菌(*Bacillus* sp.)菌種(如蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)或蘇力菌 *kurstaki* 變種)和多殺菌素。另外，此成份組合可能含某種上清液、濾液和/或色桿菌 提取物，以及某種如除蟲菊天然產物的殺蟲劑成份。另外，此成份組合可能含有上清液、濾液和/或

色桿菌菌種的提取物，以及某種化學性殺蟲劑物質，尤其是某種殺蟲劑，其成份含有但不限於除蟲菊酯、螺蟲乙酯(spirotetramet)和有機氯化化合物(organochlorine)成份。

在相關方面，本發明提供的方法，為用於至少一種或多種植物害蟲的協同作用防治方法，用於上述植物、種子和/或生長基質的防治方法，其成份組合的用量，可用於防治一種或多種的害蟲。部位也提供有可得自色桿菌菌種成份的分離化合物，尤其是色桿菌菌種的成份或可生成這些化合物的微生物，用於防治不同的蟲害，尤其是非蚊害蟲和/或線蟲的蟲害。

在具體的專利實例中，此化合物(a)具有殺蟲活性；(b)液相色譜 / 質譜(LC / MS)測定的分子量約 840-900，(c)使用水：乙腈(CH₃CN)的梯度溶劑系統(0-20 分鐘；90 - 0%水溶液 CH₃CN， 20-24 分鐘；100%CH₃CN， 24-27 分鐘；0-90%水溶液 CH₃CN， 27-30 分鐘;90%水溶液 CH₃ CN)，在 0.5 毫升/分鐘的流速下，以 210 nm 的紫外線檢測，在反相 C-18 HPLC 柱中，其高壓液相色譜法(HPLC)的保留時間約 7-12 分鐘，且(d)可另外自 色桿菌菌種取得相關成份。在發明具體實施例中，該化合物可能是一種肽物質。

在特定的發明實例中，此化合物經由 ¹³C NMR 的測定，含 43 個碳、7 個甲基、10 個亞甲基碳、12 個烯基、6 個 olefinic methines 和 8 個季碳。

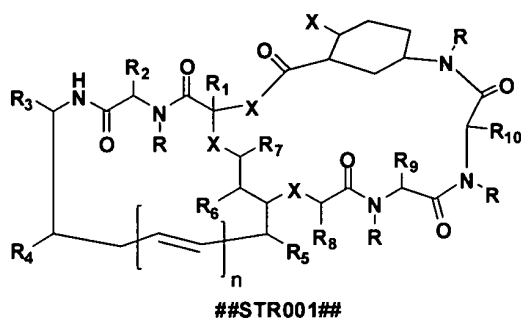
在本發明的具體實例中，此化合物 A：(a)可取自色桿菌菌種；(b)是有生物毒性的物質；(c)分子量約 840-890，光譜液相色譜/質譜(LC / MS)測定下的分子量為 860；(d)¹H NMR 的 δ 值為 8.89、8.44、8.24、8.23、7.96、7.63、6.66、5.42、5.36、5.31、5.10、4.13、4.07、4.05、3.96、3.95、3.88、3.77、3.73、3.51、3.44、3.17、2.40、2.27、2.11、2.08、2.03、2.01、1.97、1.95、1.90、1.81、1.68、1.63、1.57、1.53、1.48、1.43、1.35、1.24、1.07、1.02、0.96、0.89、0.88、0.87、0.80，而 ¹³CNMR 的 δ 值為 173.62、172.92、172.25、172.17、171.66、171.28、

170.45、132.13、130.04、129.98、129.69、129.69、125.48、98.05、70.11、69.75、68.30、68.25、64.34、60.94、54.54、52.82、49.72、48.57、45.68、40.38、39.90、38.18、36.60、31.98、31.62、31.58、29.53、28.83、27.78、24.41、23.06、22.09、20.56、19.31、18.78、17.66、15.80；(e)高壓液相色譜儀(HPLC)的保留時間約 7-12 分鐘，更確切來說，使用水：乙腈(CH₃CN)的梯度溶劑系統(0-20 分鐘；90-0%水溶液 CH₃CN，20-24 分鐘；100%CH₃CN，24-27 分鐘；0-90%水溶液 CH₃CN，27-30 分鐘；90%水溶液 CH₃CN)，在 0.5 毫升/分鐘的流速下，以 210 nm 的紫外線檢測，在反相 C-18 HPLC 柱(Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) 中，其高壓液相色譜法(HPLC)的保留時間約 9 分鐘。特別是 ¹³C-NMR 質譜顯示的訊號中，含 43 個碳、7 個甲基、10 個亞甲基碳、12 個烯基、6 個 olefinic methine、8 個季碳，和/或 ¹H NMR 質譜顯示，其特徵含 1 個典型的肽、5 個醯胺的 NH 基訊號 [δ_H : 8.89、8.44、8.23、8.22、7.96]，胺的 NH₂ 基訊號 [δ_H : 7.64、6.65]、6 個 α -氨基質子 [δ_H : 4.07、4.06、3.96、3.95、3.88、3.72]，而在 ¹³C - NMR 質譜中，有 6 個/7 個醯胺或酯共振訊號 [δ_c : 173.62、172.92、172.25、172.17、171.66、171.28、170.45]。在另一個具體的專利實例中，化合物 B 具有下列特徵：(a)可取自色桿菌菌種成份；(b)對害蟲具有毒性；(3)分子量約 840-890，更確切來說，光譜液相色譜 / 質譜(LC / MS)測定下的分子量為 874；(d)高壓液相色譜儀(HPLC)的保留時間約 7-12 分鐘，更確切來說，使用水：乙腈(CH₃CN)的梯度溶劑系統(0-20 分鐘；90-0%水溶液 CH₃CN，20-24 分鐘；100% CH₃CN、24-27 分鐘；0-90%水溶液 CH₃CN、27-30 分鐘；90%水溶液 CH₃CN)，在 0.5 毫升/分鐘的流速下，以 210 nm 的紫外線檢測，在反相 C-18 HPLC 柱(Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) 中，其高壓液相色譜法(HPLC)的保留時間約 9.54 分鐘。

在更明確具體的專利實例中，提供的化合物含有但不限

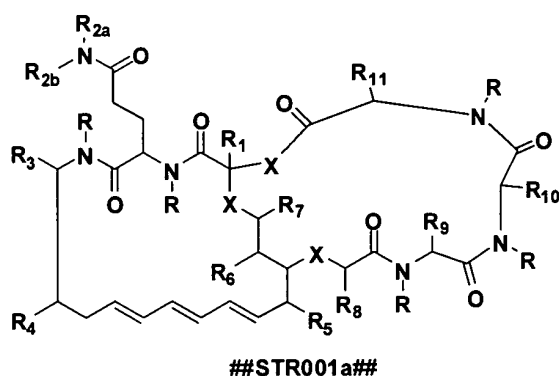
於：

(A)如下圖##STR001##結構的化合物，



或殺蟲劑成份中，可接受的鹽類或立體異構物，其中的 R 是-H 基，較低鍊的烷基，含 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 個烷基團，取代較低鍊的烷基，X 是 O、NH、NR 或 S 基，n 是 0、1、2、3、4、5、6、7、8 或 9；R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀ 和 R₁₁ 是各個獨立的 H 基，相同或不同於各個獨立的氨基酸側鏈基團或氨基酸側鏈的衍生物、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、取代炔基、芳基、取代芳基、異芳基、取代異芳基、雜環基、取代雜環基、環烷基、烷氧取代基、取代烷氧基、硫代烷基、取代硫代烷基、羥基、鹵素、氨基胺基、羧基、-C(O)H、鹽基、oxyacyl 基、氨基甲酸酯類、磺鹽、磺胺類藥或硫基物質；

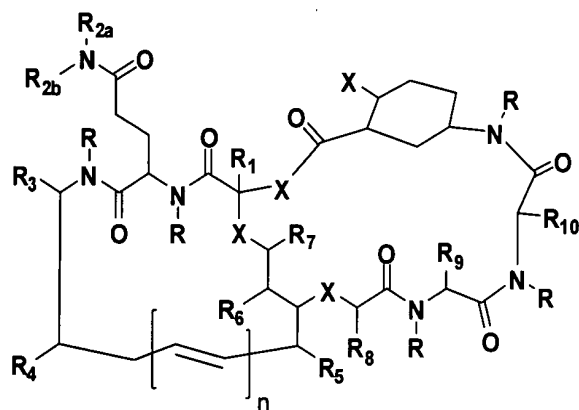
(B)化合物具有如圖##STR001##的結構，



其中的 R 是-H 基，較低鍊的烷基，含 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 個烷基團，取代較低鍊的烷基，X 是 O、NH、NR 或 S 基，R_{2a} 和 R_{2b} 各別選自含-H 基、低鍊烷基、取代烷基和取代低鍊烷基的物質中，R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀、

R_{11} 是各個獨立的 H 基，相同或不同於各個獨立的氨基酸側鏈基團或氨基酸側鏈的衍生物、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、取代炔基、芳基、取代芳基、異芳基、取代異芳基、雜環基、取代雜環基、環烷基、取代烷氧基、硫代烷基、取代硫代烷基、羥基、鹵素、氨基氨基、羧基、 $-C(O)H$ 、鹽基、oxyacyl 基、氨基甲酸酯類、磺鹽、磺胺類藥或硫基物質。

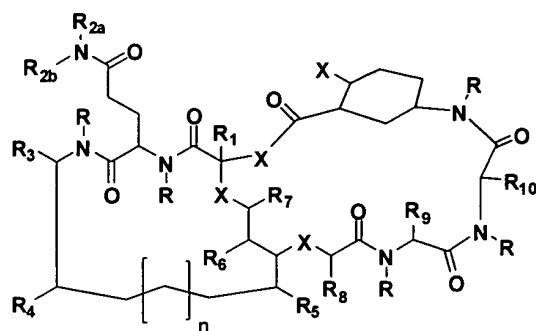
(C) 化合物具有如圖##STR001b##的結構，



##STR001b##

其中的 R 是-H 基，較低鍊的烷基，含 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 個烷基團、基或烷基芳基團、取代較低鍊的烷基，X 是 O、NH、NR 或 S 基，R2a 和 R2b 各別選自含-H 基、低鍊烷基、取代烷基和取代低鍊烷基的物質中， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 和 R_{11} 是各個獨立的 H 基，相同或不同於各個獨立的氨基酸側鏈基團或氨基酸側鏈衍生物、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、取代炔基、異芳基、取代異芳基、雜環基、取代雜環基、環烷基、取代環烷基、硫代烷基、取代硫代烷基、羥基、鹵素、氨基、羧基、 $-C(O)H$ 、鹽基、oxyacyl、氨基甲酸酯類、磺鹽、磺胺類或硫基物質。

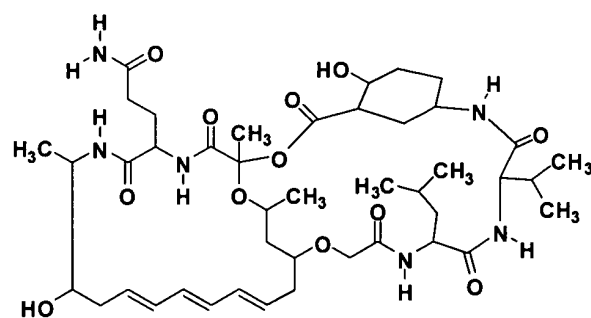
(D) 化合物具有如圖##STR001c##的結構，



##STR001c##

其中的 R 是-H 基，較低鍊的烷基、芳基或烷基芳基團，含 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 個烷基團、X 是 O、NH、NR 或 S 基，R_{2a} 和 R_{2b} 各別選自含-H 基、低鏈烷基、取代烷基和取代低鏈烷基的物質中，R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀ 和 R₁₁ 是各個獨立的 H 基，相同或不同於各個獨立的氨基酸側鏈基團或氨基酸側鏈衍生物、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、取代炔基、異芳基、取代異芳基、雜環基、取代雜環基、環烷基、取代環烷基、硫代烷基、取代硫代烷基、羥基、鹵素、氨基、羧基、-C(O)H、鹽基、oxyacyl、氨基甲酸酯類、磺醯、磺胺類或硫基物質。

在更明確具體的專利實例中，此化合物即氯醛甲醯胺 A (1)。



Chromamide A (1)

這些化合物可得自色桿菌菌種的培養基，其培養條件足以產生此化合物，而藉此取得色桿菌的培養基，在細胞培養液中，析離此化合物。特別是步驟(b)中的化合物，(i)可自細胞培養液中，使用至少其中之一的離子交換柱、體積排阻柱或反相 HPLC 層析柱，得到層析餾分物；(ii)進行殺蟲活性的化驗和(iii)

濃縮(ii)中的樣本分液，而得到析出的化合物。

本發明進一步提供的成份中，特別是殺蟲劑的農藥成份，含上述的化合物，以及其他取自色桿菌菌種，而具有具有殺蟲活性的成份。這些其他的化合物中，含下列特性：(a)液相色譜/質譜儀(LC / MS)測定下，分子量約 315-360；(b)使用高壓液相色譜儀 (HPLC)，使用水：乙腈(CH₃CN)溶劑系統(0-20 分鐘；90-0 % 水溶液 CH₃CN、20-24 分鐘；100% CH₃CN、24-27 分鐘；0 - 90 %水溶液 CH₃CN、27-30 分鐘；90%水溶液 CH₃CN)，在反相 C-18 HPLC 柱中，在 0.5 mL/ min 的流速下，使用 210 nm 紫外線測定下，其保留時間約為 8-15 分鐘。可自色桿菌菌種的培養基中取得相關的成份。在培養基中，新發現的菌種足以自色桿菌中，生成此化合物的成份。新發現的菌種和(B)成份，可在(A)的細胞培養液中，析出此化合物。

在具體的專利實例中，化合物 C 可用於上述的成份中，而具有下列特徵：(a)可取自 色桿菌菌種成份；(b)對害蟲具有毒性；(3)分子量約 325-360，更確切來說，光譜液相色譜 / 質譜(LC / MS)測定下的分子量為 343；(d)高壓液相色譜儀(HPLC)的保留時間約 8-14 分鐘，更確切來說約為 10 分鐘，而更確切的情況下，使用水：乙腈(CH₃CN)的梯度溶劑系統(0-20 分鐘；90-0 %水溶液 CH₃CN，20-24 分鐘；100% CH₃CN，24-27 分鐘；0 - 90 %水溶液 CH₃CN，27-30 分鐘；90%水溶液 CH₃CN)，在 0.5 毫升/分鐘的流速下，以 210 nm 的紫外線檢測，在反相 C-18 HPLC 柱(Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) 中，其高壓液相色譜法(HPLC)的保留時間為 10.88 分鐘。在具體的專利實例中，化合物 C 可為紫色桿菌素(2)，如上所述，取自紫色色桿菌成份。

在另一個具體的專利實例中，另一個上述的化合物 D 中，具有下列特徵：(a)可取自色桿菌菌種成份；(b)對害蟲具有毒性；(3)分子量約 315-350，更確切來說，光譜液相色譜 / 質譜(LC / MS)測定下的分子量為 327；(d)高壓液相色譜儀(HPLC)

的保留時間約 12 分鐘，更確切來說，乙腈(CH_3CN)的梯度溶劑系統 (0-20 分鐘； 90-0%水溶液 CH_3CN 、20-24 分鐘；100% CH_3CN 、24-27 分鐘；0 - 90 %水溶液 CH_3CN 、27-30 分鐘；90%水溶液 CH_3CN)，在 0.5 毫升/分鐘的流速下，以 210 nm 的紫外線檢測，在反相 C-18 HPLC 柱(Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) 中，其高壓液相色譜法(HPLC)的保留時間約為 12 分鐘。在具體的專利實例中，化合物 D 可為去氧紫色桿菌素的成份(3)，如上所述，取自紫色色桿菌成份。

上述的成份可再含有第二種物質，其中所謂的第二種物質，可為化學性或生物性的殺蟲劑農藥，和/或至少含一種的載體、稀釋劑、表面活性劑或輔助劑成份。

如本發明方法中使用的化合物(如化合物 A、B、C 和 D)，以及上述的成份，即用於害蟲的防治，尤其是植物中非蚊蟲害和線蟲的蟲害，此化合物和成份的有效用量下，可再添加第二種化學性或生物性的殺蟲劑農藥成份，用於蟲害的防治。本發明提供的方法，即使用上述的化合物配方，用於植物蟲害上的防治。

【實施方式】

上述發明的成份和方法，可採用不同的變化和方法，在此詳細說明本發明的具體實例。但應瞭解的是，本發明並未意圖限制已揭露的特定發明形式，但相反的是，本發明旨在涵蓋所有的修改、同等和替代的事物，仍無違本專利申請範圍中的定義和精神。

在本文提供的許多數值中，應瞭解到，除非本文內容另有詳細說明者，在上下限範圍內，各個相關值為其下限單位的十分之一，而有另外說明者，或在該範圍內，均屬該範圍內所及，而較小的範圍也包括在內。這些較小範圍的上下，也列入其中，明確排除在任何規定範圍以外。

除非另有說明者，否則本文使用的所有技術和科學術語，

即屬本發明所屬工藝中，一般熟知的相同語義內容。雖然任何與本文類似或同等的方法和材料，皆可用於本發明的實作和測試中，本文提出的方法和材料，仍屬首選。

需注意到，除非另有明確說明者，否則本文和本專利申請範圍中，使用「此」和「該」字，可為複數的意義。

如本文定義，「取自」為指直從某個特定來源，所析離或得到，或來自特定來源，所析離的物質或微生物，而有相同的語義內容。一旦本文「來源」屬有機體的微生物時，「取自」為來自機微生物、或使用媒介物或微生物的生長中，所析離或得到的有機微生物。

如本文定義，「完整的培養液」為含有細胞和媒介物的培養基液體。若在培養盤上，培養細菌時，可在水中或其他液體中，於完整的培養基中，取得培養的細胞。

「上清液」為細胞培養液中的液體，或來自其他瓊脂培養板中的液體，而藉由離心、過濾、沉澱或其他已知工藝的方法來去除。

如本文定義，「過濾」為穿透過濾薄膜的培養液。

如本文定義，「提取物」為藉由溶劑(水、洗滌劑、緩衝劑)，以離心、過濾或其他方法，自細胞析離的物質。

如本文定義，「代謝物」為某種的化合物、物質或副產物，屬微生物發酵、上清液、濾液或特別是取自害蟲的有機微生物所產生者。如本文定義，「析離的化合物」本質上無其他化合物或物質，由分析方法測定下，至少有 20%的純度，最好大約 40%的純度，更好的是約 60%的純度或約 80%、90%，甚至最好約為 95%的純度，測定方法包括但不限於色譜法和電泳法。

如本文定義，「載體」為某種惰性、有機或無機的物質，可用於混合活性成份，或製作配方，用於植物或其他物體的防治，或用於儲存、運輸和/或處理。

「防治」為改變蟲害的數量或傳播速度。

如本文定義，「蟲害」為害蟲的出現數量，已導致嚴重的損害，包括宿主族群的疾病和感染，或生長系統出現不必要的雜草。

如本文定義，「殺蟲劑農藥」為某種物質，取自生物的產或化學物，可增加植物病蟲的死亡率，或抑制植物病蟲害的生長率，包括但不僅限於殺線蟲劑、殺蟲劑、植物殺菌劑和植物殺病毒劑。

如本文定義，「烷基」為單價直鏈或支鏈烴團，具有 1 個到約 12 個的碳原子，包括甲基、乙基、正丙基、異丙基、N-丁基、異丁基、叔丁基和 N 己基等。

如本文定義，「取代烷基」為某個烷基，可再含有 1 個或多個羥基、巰基、環烷基、烷氧基、取代環烷基、雜環基、取代雜環基、芳基、取代芳基、雜環基、取代雜環基、芳氧基、取代芳氧基、鹵素、氰基、硝基、氨基、醯胺基、- C(O)H、醯基、oxyacyl 基、羧基、磺醯、磺胺和硫基等。

如本文定義，「烯」為直鏈或支鏈含 1 個或多個碳-碳雙鍵的烴基，約有 2 至 12 個碳原子，而「取代烯基」為烯基，可再含有 1 個或多個上述的取代基。

如本文定義，「烯基」為直鏈或支鏈含 1 個或多個碳-碳雙鍵的烴基，約含 2 至 12 個碳原子，而「取代烯基」為某個烯基，可再含上述的 1 個或多個取代基。

如本文定義，「芳基」為含 6 到 14 個碳原子的芳基，「取代芳基」為芳基可再含有 1 個或多個上述的取代基。

如本文定義，「雜環基」為某個原子環，含 1 個或多個雜原子(如 N、O、S 等)，成為環狀結構的一部份，含 3 到 14 個碳原子，而「雜環基」為某個雜環基可再含上述的 1 個或多個取代基。

如本文定義，「烷氧基」為某個--O-alkyl-的基團，其中的烷基定義如上，而「取代烷氧基」為某個烷氧基，可再含上述的 1 個或多個取代基。

如本文定義，「硫代烷基」為某個--S-alkyl-的基團，其中的烷基定義如上，而「取代硫代烷基」為某個硫代烷基可再含上述的 1 個或多個取代基。

如本文定義，「環烷基」為某個環烷基，含 3 到 8 個碳原子，而「取代環烷基」為某個環烷基可再含上述的 1 個或多個取代基。

如本文定義，「雜環基」為某個雜環基含 1 個或多個雜原子(如 N、O、S 等)成為雜環基結構的一部份，此雜環基含 3 至 14 個碳原子，而「取代雜環基」為某個雜環基，可再含上述的 1 個或多個取代基。

製造方法

如上所述，為可由色桿菌相同的有機微生物，而取得的化合物或代謝物，更確切來說，該有機微生物與色桿菌具有相同的特徵，為色桿菌的菌種，其特徵相同於 NRRL B-30655，或可來自其他的有機微生物。本發明的方法，包括培養這些微生物的方法，而藉由本發明中的微生物培養基，析離取得這些化合物和/或成份。

特別是這些微生物，使用本發明工藝的方法，以營養媒介物來進行培養。此微生物可使用燒瓶培養，可進行小規模或大規模的發酵(包括但不限於連續、批量、補料或固態形式的發酵)，在合適的介質中，進行實驗室或工業條件下的發酵作用，可讓細胞生長。可在含碳、氮和無機鹽的適當營養媒介物中，使用本發明已知的工藝中進行培養。可自市面或自行依據研究內容，使用或製作合適的培養媒介物。

在培養後，則生成某種含有色桿菌的上清液、濾液和/或提取物，可用於調配殺蟲劑農藥的成份。

另外，在培養後，可自培養液提取化合物和/或代謝物。

可使用色譜法來提取出提取物。色譜餾分可使用本發明已知工藝的方法，進行害蟲的毒性測定，如粉紋夜蛾(*Trichoplusia*)或甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)。可使用相同或

不同的色譜法，重複此過程一次或多次。

成份

成份可能包括完整的培養液、液態培養液或懸浮液,而取自色桿菌(*Chromobacterium*)具有與色桿菌(*Chromobacterium substugae nov*)相同特徵的菌種。更確切來說，具有相同於 NRRL B - 30655 的識別特徵(見美國專利 7244607)，以及取自色桿菌的上清液、濾液或提取物，例如與色桿菌(*Chromobacterium substugae nov*)具有相同特徵的菌種，而更確切來說，具有與 NRRL B - 30655 相同的識別特徵(見美國專利 7244607)，為含 1 種或多種色桿菌成份的上清液、濾液和/或提取物，或上述的成份組合，而具有撲殺線蟲的活性。

可使用任何的方法，製作上述的成份。配方實例無任何限制，包括但不限於乳油(EC)、可濕性粉劑(WP)、水溶性液體(SL)、噴霧劑、超低容量的濃縮液(ULV)、可溶性粉末(SP)、微膠囊、水分解顆粒、可流動物質(FL)、微乳劑(ME)後，奈米乳劑(NE)等，本文中的任何配方，其活性成份含量介於 0.01% 到 99.99% 的範圍內。

此成份可為液態、凝膠或固體。

可藉由將含活性成份的溶液，懸浮乾燥製備固體成份，如室溫下蒸發，或在 65°C 或更低的溫度下，進行真空蒸發處理。

此成份含凝膠膠囊的活性成份，此凝膠物可將培養液混合有凝膠形成劑(如明膠、纖維素、木質素)、活體培養液懸浮、滅活色桿菌、或無細胞濾液、或色桿菌培養液細胞餾分、或噴霧或冷凍乾燥培養液、細胞餾分或殺蟲劑農藥化合物溶液，使用本發明的方法進行製備，成份也含凝膠劑。

此成份可含表面活性劑，而用於乳化、分散、潤濕、擴散、整合後、控制分解物、穩定活性成份、改善流動性或抑制銹斑。在具體的專利實例中，表面活性劑是無植物毒性的非離子性表面活性劑，最好是屬 EPA List 4B 中的物質。在另一個具體實例中，非離子性的表面活性劑為聚氧乙烯(20)月桂酸成份。配

方中的表面活性劑的濃度介於 0.1-35%，首選範圍是 5-25%。分散劑或乳化劑的選擇，如非離子型、陰離子型、兩性和陽離子分散劑和乳化劑，而用量取決於成份特性和作用，而有助於本發明的成份散佈。

上述成份可混合有其他的微生物和/或殺蟲劑農藥(如殺線蟲劑、殺菌劑和殺蟲劑)。微生物提供的藥劑成份，其來源可能包括但不僅限於枯草桿菌 (*Bacillus* sp.), 假單胞菌 (*Pseudomonas* sp.), 短芽孢桿菌 (*Brevibacillus* sp.), 蠟蚧輪枝菌 (*Lecanicillium* sp.), 非白粉寄生菌 (*non-Ampelomyces* sp.), 二形性酵母菌 (*Pseudozyma* sp.), 鏈黴菌 (*Streptomyces* sp), 伯克霍爾德氏菌 (*Burkholderia* sp), 木黴菌 (*Trichoderma* sp), 黏帚黴菌 (*Gliocladium* sp.)。另外，藥劑成份可能是天然油脂或石油產物，含殺菌和/或殺蟲的活性成份(如石蠟油、茶樹油、香茅油、丁香油、桂皮油、柑橘油、迷迭香油和除蟲菊)。此外，此殺蟲劑成份可能是單方藥劑，成份包括但不限於苯並咪唑 (benzimidazole)、脫甲基(demethylation)抑製劑 (DMI) (如咪唑 (imidazole)、哌嗪 (piperazine)、嘧啶 (pyrimidine)、三唑 (triazole))、嗎啉(morpholine)、羥基嘧啶(hydroxypyrimidine)、苯氨基嘧啶 (anilinopyrimidine)、硫代磷酸酯 (phosphorothiolate)、醌(quinine)外抑劑、喹啉(quinoline)、二甲醯亞胺(dicarboximide)、酸亞醯(carboximide)、phenylamide、苯氨基嘧啶(anilinopyrimidine)、苯基吡咯(phenylpyrrole)、芳烴 (aromatic hydrocarbon)、肉桂酸(cinnamic acid)、羥基苯胺 (hydroxyanilide)、抗生素、多抗黴素 (polyoxin)、丙烯醯 (acylamine)、鄰苯二甲醯亞胺(phthalimide)、苯 (benzenoid) (xylylalanine)，某種脫甲基(demethylation)抑製劑選自咪唑 (imidazole)、哌嗪 (piperazine)、嘧啶 (pyrimidine) and 三唑 (triazole) (如聯苯三唑醇(bitertanol)、腈菌唑(myclobutanil)、戊菌唑 (penconazole)、丙環唑 (propiconazole)、三唑酮 (triadimefon)、糠菌唑 (bromuconazole)、環唑醇

(cyproconazole)、烯唑醇(diniconazole)、氟苯唑(fenbuconazole)、己唑醇(hexaconazole)、戊唑醇(tebuconazole)、四氟醚唑(tetraconazole)、腈菌唑(myclobutanil)、鄰甲醯氨基苯甲醯胺(anthranilic diamide)(如氯虫酰胺)和醌外抑劑(如甲氧基丙烯酸酯(strobilurin))。甲氧基丙烯酸酯(strobilurin)成份可能包括但不限於嘧菌酯、醚菌酯-甲基或三氟(trifloxystrobin)。在另一個具體實例中，抗真菌劑可為醌的成份，如快諾芬(quinoxyfen) (5,7-dichloro-4-quinolyl 4-fluorophenyl ether)。抗真菌劑也可能取自虎杖的提取物。

殺菌劑也可以是複方的非無機化學殺菌劑，取自含四氯異苯(chloronitrile)、喹啉、磺醯胺、膦酸、磷酸、二硫代氨基甲酸、chloralkythios、phenylpyridin 和氰基乙醯胺的成份物。

此成份如上所述，可再含殺蟲劑農藥成份。此殺蟲劑農藥成份可能包括但不限於阿巴汀(ivermectin), Bt (如蘇力菌 *kurstaki* 變種)、印楝油、多殺菌素和博扣氏菌(*Burkholderia* sp., 悉如 WO2011/106491, 昆蟲病原真菌如白僵菌(*Beauveria bassiana*), 而化學殺蟲劑成份包括但不限於有機氯化物、有機磷化合物、氨基甲酸酯、菊酯類農藥、除蟲菊酯和新菸鹼類(neonicotinoids)。

如上所述，此成份可再含殺線蟲劑成份。此殺線蟲劑包括但不限於阿維菌素的微生物產物，如 Biome (枯草桿菌(*Bacillus* sp.) *firmus*)、線蟲寄生性放射線菌(*Pasteuria* spp)和有機產物如皂甙。

此成份組合可使用本發明工藝的方法製作。更確切來說，此成份適用於植物或植物的各部份。本文內容中的植物和植群，為如預期栽種和不受歡迎的野生植物或作物(包括自然生成的作物)是所有的植物和植群。作物可為植物，藉由傳統的植物育種和優化方法或生物技術和基因工程的方法或這些方法的組合，所取得的植物，包括轉基因植物，以及受到植物育種者保護或不保護的植物品種。上述的植物的各部分和器官，

如地上和地下的芽、葉、花和根，實例中可為樹葉、針葉、莖、花、果實、塊莖及根莖等。植物的各部分，還包括已收成、營養生長和生成的材料，如扦插、塊莖、根莖、樹枝和種子等。

上文所列的植物和植物各部份的成份中，可直接作用或讓該成份作用在栽種的周圍區域、棲息地或存儲空間中，如浸泡、噴灑、蒸發、霧化、噴灑、塗佈和注射。成份用於種子時，可在栽種 種子前，使用一個或多個的工藝方法，進行一層或多層的種皮塗佈。

用途

上述的成份、培養基、懸浮液、代謝物後，殺蟲劑化合物，可用作為殺蟲劑的農藥。尤其是上述的成份、培養基、上清液、代謝物和殺蟲劑化合物，可用作為殺蟲劑和殺線蟲劑，可單獨或混合上述 1 種或多種的殺蟲物質。

具體來說，線蟲的防治可使用上述的方法，包括但不限於根結線蟲和胞囊，線蟲的損害包括但不限於根結線蟲 (*Meloidogyne* sp.)、矮化線蟲(*Tylenchorhynchus* sp.)、矛形線蟲 (*Hoplolaimus* sp.)、螺旋線蟲(*Helicotylenchus* sp.)、腐線蟲 (*Pratylenchus* sp.)、包囊線蟲(*Heterodera* sp.)、黃金線蟲 (*Globodera* sp.)、肥短線蟲 (*Trichodorus* sp.)、釘線蟲 (*Paratrichodorus* sp.)、劍線蟲 (*Xiphinema* sp.)和環紋線蟲 (*Criconema* sp.)；特別是根結線蟲(*Meloidogyne incognita*)，以及黃金線蟲(*Globodera rostochiensis*) 和馬鈴薯囊腫線蟲 (*globodera pailida*)、大豆胞囊線蟲(*Heterodera glycines*)、甜菜胞囊線蟲(*Heterodera schachtii*)和穀物胞囊線蟲(*Heterodera avenae*)。

使用上述方法防治的抗病昆蟲，包括但不局限於非蚊昆蟲，依序為(a)鱗翅目，如長翅卷蛾(*Accleris* spp.)、茶姬捲葉蛾 (*Adoxophyes* spp.)、透翅蛾(*Aegeria* spp.)、切根蟲 (*Agrotis* spp.)、棉葉蟲(*Alabama argillaceae*)、(*Amylois* spp.)、黎豆夜蛾 (*Anticarsia gemmatilis*)、黃卷蛾 (*Archips* spp.)、帶卷蛾

(*Argyrotaenia* spp.)、銀紋夜蛾(*Autographa* spp.)、螟蟲(*Busseola fusca*)、粉斑螟蛾(*Cadra cautella*)、桃小食心蟲(*Carposina nipponensis*)、螟蟲(*Chilo* spp.)、色卷蛾(*Choristoneura* spp.)、葡萄果蠹蛾(*Clysia ambiguella*)、野螟蛾(*Cnaphalocrocis* spp.)、捲(葉)蛾(*Cnephasia* spp.)、辦紋蛾(*Cochylis* spp.)、鞘蛾(*Coleophora* spp.)、大菜螟(*Crocidolomia binotalis*)、蘋果異形小卷蛾(*Cryptophlebia leucotreta*)、小卷蛾(*Cydia* spp.)、螟蛾(*Diatraea* spp.)、(*Diparopsis castanea*)、金剛鑽(*Earias* spp.)、粉斑螟(*Ephestia* spp.)、捲葉蛾(*Eucosma* spp.)、環針單紋蛾(*Eupoecilia ambiguella*)、黃毒蛾(*Euproctis* spp.)、夜蛾(*Euxoa* spp.)、食心蟲(*Grapholita* spp.)、(*Hedya nubiferana*)、棉花實夜蛾(*Heliothis* spp.)、菜心野螟蛾(*Hellula undalis*)、美國白蛾(*Hyphantria cunea*)、番茄蠹蛾(*Keiferia lycopersicella*)、旋紋潛葉蛾(*Leucoptera scitella*)、細蛾(*Lithocollethis* spp.)、葡萄花翅小卷蛾(*Lobesia botrana*)、毒蛾(*Lymantria* spp.)、潛葉蛾(*Lyonetia* spp.)、天幕毛蟲(*Malacosoma* spp.)、甘藍夜蛾(*Mamestra brassicae*)、煙草天蛾(*Manduca sexta*)、蠖蛾(*Operophtera* spp.)、玉米螟蛾(*Ostrinia nubilalis*)、超小卷蛾(*Pammene* spp.)、卷蛾(*Pandemis* spp.)、松夜蛾(*Panolis flammea*)、棉紅鈴蟲(*Pectinophora gossypiella*)、馬鈴薯蠹蛾(*Phthorimaea operculella*)、紋白蝶(*Pieris rapae*, *Pieris* spp.)、小菜蛾(*Plutella xylostella*)、巢蛾(*Prays* spp.)、螟蛾(*Scirpophaga* spp.)、夜蛾(*Sesamia* spp.)、長須卷蛾(*Sparganothis* spp.)、粘蟲(*Spodoptera* spp.)、透翅蛾(*Synanthedon* spp.)、帶蛾(*Thaumetopoea* spp.)、捲葉蛾(*Tortrix* spp.)、粉斑夜蛾(*Trichoplusia ni*)和巢蛾(*Yponomeuta* spp.); (b)鞘翅目如金針蟲叩甲(*griotes* spp.)、棉鈴象甲(*Anthonomus* spp.)、穀類蚜蟲(*Atomaria linearis*)、甜菜脛跳甲(*Chaetocnema tibialis*)、球莖象鼻蟲(*Cosmopolites* spp.)、果實象鼻(*Curculio* spp.)、皮蠹(*Dermestes* spp.)、玉米根蟲(*Diabrotica* spp.)、瓢蟲(*Epilachna* spp.)、(*Eremnus* spp.)、科羅

拉多金花蟲(*Leptinotarsa decemlineata*)、象甲(*Lissorhoptrus* spp.)、歐洲鰓金龜(*Melolontha* spp.)、鋸穀盜(*Oryzaephilus* spp.)、耳象(*Otiorhynchus* spp.)、(Phlyctinus spp.)、金龜甲(*Popillia* spp.)、蚤跳甲(*Psylliodes* spp.)、穀蠹(*Rhizopertha* spp.)、金龜子(*Scarabeidae*)、米象(*Sitophilus* spp.)、麥蛾(*Sitotroga* spp.)、穀盜(*Tenebrio* spp., *Tribolium* spp.)和斑皮蠹(*Trogoderma* spp.)；(c) 直翅目如蠊(*Blatta* spp.)、小蠊(*Blattella* spp.)、螻蛄(*Gryllotalpa* spp.)、馬德拉蜚蠊(*Leucophaea maderae*)、飛蝗(*Locusta* spp.)、大蠊(*Periplaneta* spp.)和蝗(*Schistocerca* spp.)；(d) 等翅目如散白蟻(*Reticulitermes* spp.)；(e) 齧蟲目如書虱(*Liposcelis* spp.)；(f) 虱目如血虱(*Haematopinus* spp.)、山羊虱(*Linognathus* spp.)、蝨(*Pediculus* spp.)、根瘤蚜(*Pemphigus* spp., *Phylloxera* spp.)、(g) 食毛目如Damalinae spp. 和食毛虱(*Trichodectes* spp.)；(h) 纓翅目如薊馬(*Frankliniella* spp., *Hercinotrips* spp., *Taeniothrips* spp.)、南黃薊馬(*Thrips palmi*)、蔥薊馬(*Thrips tabaci*)和橘硬薊馬(*Scirtothrips aurantii*)；(i) 半翅目如臭蟲(*Cimex* spp.)、可哥瘤盲蝽(*Distantiella theobroma*)、棉紅蝽(*Dysdercus* spp.)、(Euchistus spp.)、扁盾蝽(*Eurygaster* spp.)、稻緣蝽(*Leptocorisa* spp.)、蛛緣蝽(*Nezara* spp.)、皮蝽(*Piesma* spp.)、錐蝽(*Rhodnius* spp.)、可哥褐盲蝽(*Sahlbergella singularis*)、黑椿象(*Scotinophara* spp.)和錐鼻蟲(*Tniatoma* spp.)；(j) 同翅目如捲毛粉蝨(*Aleurothrixus floccosus*)、菜粉虱(*Aleyrodes brassicae*)、介殼蟲(*Aonidiella* spp.)、蚜蟲(*Aphididae*, *Aphis* spp.)、蚧(*Aspidiotus* spp.)、煙草粉蝨(*Bemisia tabaci*)、(Ceroplaster spp.)、褐圓盾介殼蟲(*Chrysomphalus aonidium*)、橙褐圓盾介殼蟲(*Chrysomphalus dictyospermi*)、褐軟蠟蚧(*Coccus hesperidum*)、葉蟬(*Empoasca* spp.)、蘋果綿蚧(*Eriosoma larigerum*)、赤楊斑葉蟬(*Erythroneura* spp.)、(Gascardia spp.)、飛虱(*Laodelphax* spp.)、李蠟蚧(*Lecanium corni*)、蠟蚧(*Lepidosaphes* spp.)、長管

蚜(*Macrosiphus* spp.)、蚜蟲(*Myzus* spp.)、黑尾葉蟬(*Nephotettix* spp.)、褐飛虱(*Nilaparvata* spp.)、(Paratoria spp.)、根瘤蚜(*Pemphigus* spp.)、粉介殼蟲(*Planococcus* spp.)、白盾蚧(*Pseudaulacaspis* spp.)、粉蚧(*Pseudococcus* spp.)、木虱(*Psylla* spp.)、(*Pulvinaria aethiopica*)、圓蚧(*Quadraspidiotus* spp.)、縊管蚜(*Rhopalosiphum* spp.)、硬介殼蟲(*Saissetia* spp.)、帶葉蟬(*Scaphoideus* spp.)、蚜蟲(*Schizaphis* spp.)、長管蚜(*Sitobion* spp.)、溫室粉虱(*Trialeurodes vaporariorum*)、非洲木虱(*Trioza erytrae*)和矢盾介殼蟲(*Unaspis citri*)；(k)膜翅目如切葉蟻(*Acromyrmex*, *Atta* spp.)、麥莖蜂(*Cephus* spp.)、松葉蜂(*Diprion* spp., *Diprionidae*, *Gilpinia polytoma*)、葉蜂(*Hoplocampa* spp.)、毛蟻(*Lasius* spp.)、小黃家蟻(*Monomorium pharaonis*)、葉蜂(*Neodiprion* spp.)、紅火蟻(*Solenopsis* spp.)和虎頭蜂(*Vespa* spp.)；(l)雙翅目如伊蚊(*Aedes* spp.)、高粱稈蠅(*Antherigona soccata*)、全北毛蚊(*Bibio hortulanus*)、紅頭麗蠅(*Calliphora erythrocephala*)、蠟實蠅(*Ceratitis* spp.)、金蠅(*Chrysomyia* spp.)、家蚊(*Culex* spp.)、黃蠅(*Cuterebra* spp.)、寡毛實蠅(*Dacus* spp.)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)、廁蠅(*Fannia* spp.)、馬胃蠅(*Gastrophilus* spp.)、采采蠅(*Glossina* spp.)、牛皮蠅(*Hypoderma* spp.)、(*Hyppobosca* spp.)、斑潛蠅(*Liriomyza* spp.)、綠蠅(*Lucilia* spp.)、黑潛蠅(*Melanagromyza* spp.)、家蠅(*Musca* spp.)、狂蠅(*Oestrus* spp.)、癭蠅(*Orseolia* spp.)、稈蠅(*Oscinella frit*)、甜菜潛葉蠅(*Pegomyia hyoscyami*)、草種蠅(*Phorbia* spp.)、蘋果果實蠅(*Rhagoletis pomonella*)、菌蚊(*Sciara* spp.)、螫蠅(*Stomoxys* spp.)、虻(*Tabanus* spp.)、(*Tannia* spp.)和大蚊(*Tipula* spp.)；(m)蚤目如鼠蚤(*Ceratophyllus* spp.)和印鼠客蚤(*Xenopsylla cheopis*)，以及(n)纓尾亞目如蠹魚(*Lepisma saccharina*)。依據本發明的活性成份，可用於防治十字花科跳蚤甲蟲(*Phyllotreta* spp.)、根蛆(*Delia* spp.)、白菜象鼻蟲(*Ceutorhynchus* spp.)，和油籽作物，如蚜蟲(rape)、芥菜種子、

雜交油菜籽、水稻和玉米。在具體的專利實例中，這些昆蟲可為灰翅夜蛾屬、尤其是桃蚜、甜菜夜蛾、小菜蛾或 *Euschistus* sp 的成員。

有效防治量的上清液、濾液或提取物中，含有殺蟲活性的代謝物，或自色桿菌析出的化合物殺蟲成份，或是上述的成份組合。上述菌種的上清液、濾液或提取物、代謝物和/或化合物，可單方或複方混合有其他的物質，可有效防治或提供有效的防治量。有效的防治用量定義為某個有機微生物細胞、上清液、濾液或提取物、代謝物和/或化合物的數量，可單方或複方提供有殺蟲劑成份，而足以防治蟲害。有效的防治率受害蟲物種、害蟲生長、害蟲群聚密度、環境因素，如每天和每季的氣溫、風速或雨量所影響。實驗室或現地測試，所判定的有效用量為特例。

發明實例

上述的成份和方法再說明如下，其範圍不限於本實例中。本說明實例僅為說明用，而不限於本專利申請範圍中，其相關的各種材料、條件、重量比、工藝參數和引述內容。

例 1：來自色桿菌的提取物

下列步驟用於純化色桿菌培養基中的提取物：

培養液取用 10-L 的色桿菌發酵液，使用 Amberlite XAD-7 樹脂 (Asolkar et al., 2006)，搖晃細胞懸浮液，在室溫下，轉速 225rpm 持續搖晃 2 小時，而進行製備。紗布過濾收集樹脂和細胞團，使用去離子水洗淨，然後去掉鹽份。再使用丙酮/甲醇(50/50)浸泡樹脂、細胞團和紗布，持續 2 小時，然後使用丙酮/甲醇過濾，使用旋轉蒸發儀粗提取物真空下乾燥後，得到粗提取物。粗提物再使 Sephadex LH 20 的排阻色譜法餾分 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$; 50/50)，而給出 7 個餾分(圖 1)。這些餾分物再審議旋轉蒸發儀濃縮乾燥，然後使用裝有粉紋夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 或甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*)，篩出乾燥的殺蟲活性殘留物成份。有殺蟲活性的餾分物放入反相高效液相色

譜法儀器 (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) 中，使用上述的生物測定法找到/確定具有活性的化合物。為能夠識別確認該化合物，可使用其他的儀器如 LC/ MS 和 NMR 光譜計進行記錄。

氯醛甲醯胺 A(1)和化合物 B 分別取自餾分物 1 和 2，而紫色桿菌素(2)及去氧紫色桿菌素(3)使用 Sephadex LH 20 的色譜儀自餾分物 5 中純化。

化合物的純化

氯醛甲醯胺 A 的純化(1)使用 HPLC C-18 柱(Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 10)，以水：乙腈梯度溶劑系統 (0-10 分鐘；80-75% CH₃CN； 10-45 分鐘；75-60%CH₃CN； 45-55 分鐘；60-50%CH₃CN； 55-65 分鐘；50-100%水溶液 CH₃CN；65-70 分鐘；100% CH₃CN；55-70 分鐘；0-80%水溶液的 CH₃CN)，在 2.5 mL / min 的流速下，為 210 nm 紫外檢測。活性化合物氯醛甲醯胺 A (1)的保留時間為 23.19 分鐘。

發明化合物 B 的純化是使用高效液相色譜法的 C -18 柱 (Phenomenex, Luna 10U C18(2)100A, 250× 10)，水：乙腈梯度溶劑體系(0-10 分鐘，80-75%水溶液 CH₃CN;10-45 分鐘，75-60%的水溶液 CH₃CN;45-55 分鐘，60 - 50%水溶液 CH₃CN;55-65 分鐘，50 - 100%的水溶液 CH₃CN;65-70 分鐘，100%的 CH₃CN；55-70 分鐘，0-80%的水溶液 CH₃CN)2.5 毫升/分鐘的流量為 210 nm 紫外檢測，活性化合物 B，保留時間為 26.39 分鐘(見圖 6)。其他的化合物中，含下列特性：(a)液相色譜 /質譜儀(LC / MS)測定下，分子量約 315-360；(b)使用高壓液相色譜儀 (HPLC)，使用水：乙腈(CH₃CN)溶劑系統(0-20 分鐘；90-0 %水溶液 CH₃CN，20-24 分鐘；100% CH₃CN、24-27 分鐘；0 - 90 %水溶液 CH₃CN、27-30 分鐘； 90%水溶液 CH₃CN，在反相 C-18 HPLC 柱中，在 0.5 mL/分鐘的流速下，使用 210 nm 紫外線測定，化合物的保留時間約為 26.39 分鐘。

紫色桿菌素 (2) 和去氧紫色桿菌素 (3)的純化，使用高效

液相色譜法的 C-18 柱(Phenomenex, Luna10U C18(2)100A, 250× 10), 以水: 乙腈梯度溶劑系統(0-10 分鐘; 70-60%水溶液 CH₃CN; 10-40 分鐘; 60 - 20%水溶液 CH₃CN; 40-60 分鐘; 20 - 0%水溶液 CH₃CN; 60-65 分鐘; 100%CH₃CN; 65-75 分鐘; 0-70%水溶液 CH₃CN), 在 2.5 毫升/分鐘的流速下, 使用 210 nm 紫外線測定, 活性化合物紫色桿菌素(2)的保留時間為 7.86 分鐘, 而去氧紫色桿菌素(3)的保留時間為 12.45 分鐘。

化合物的質譜分析

主動峰值的質譜分析使用 Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus 的電噴灑儀器(ESI), 同時使用正電和負電的電離全掃描模式(M / Z100-1500 DA), 在 LCQ DECA XP^{plus} 的質譜儀中掃描(Thermo Electron Corp., San Jose, CA)。熱高效液相色譜法(HPLC)儀器配備有 Finnigan Surveyor PDA Plus 檢測器、自動進樣器、MS 泵和 1 組 4.6mm × 100mm 的 Luna C18 5μ 100A 柱分析儀(Phenomenex)。溶劑系統含有水(溶劑 A)和乙腈(溶劑 B)。流動相開始於 10%的溶劑中, 在 20 分鐘期間, 線性增加到 100%的溶劑量後停留 4 分鐘, 最後在 3 分鐘期間, 回到 10%的溶劑量, 再停留 3 分鐘, 流速為 0.5mL/分鐘。注射量為 10μL, 而樣本存放在室溫下的自動採樣器中。該化合物的 LC-MS, 即使用液相色譜和反相色譜儀進行分析。本化合物的質譜分析, 在下列條件下進行: 護套和輔助/掃描的氮氣流速固定在 30 和 15 個 arb。噴灑電壓設定為 5000 V, 而毛細管電壓設定為 35.0V, 進行電噴霧離子化的處理, 溫度設定在 400℃。在 Xcalibur 軟體中, 進行資料分析。正離子化模式下, 氯醛甲醯胺 A(1)的分子量為 860(見圖 2)。另 1 個活性化合物 B 的 LC-MS 色譜, 顯示在正離子模式下的分子量為 874。紫色桿菌素(2)和去氧紫色桿菌素(3)正離子模式下的分子量為 313 和 327。

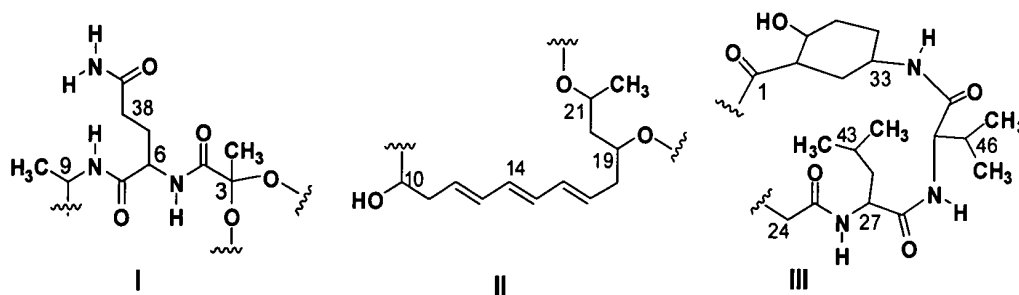
化合物的 NMR 核磁共振分析

NMR 核磁共振光譜在 Bruker 600 MHz 梯度的場譜儀上測量, 參考值設定為內部標準的四甲基矽烷(TMS, 0.00 ppm), 使

用日立 8800 的氨基酸分析儀，進行氨基酸的分析。

關於結構的鑑定，純化的氯醛甲醯胺 A 使用 600 MHz NMR 的儀器分析，其分子量是 860，而 ^1H NMR 的 δ 值是 8.89、8.44、8.24、8.23、7.96、7.63、6.66、5.42、5.36、5.31、5.10、4.13、4.07、4.05、3.96、3.95、3.88、3.77、3.73、3.51、3.44、3.17、2.40、2.27、2.11、2.08、2.03、2.01、1.97、1.95、1.90、1.81，而 1.68、1.63、1.57、1.53、1.48、1.43、1.35、1.24、1.07、1.02、0.96、0.89、0.88、0.87、0.80(見圖 4)，而 ^{13}C -NMR 值是 173.62、172.92、172.25、172.17、171.66、171.28、170.45、132.13、130.04、129.98、129.69、129.69、125.48、98.05、70.11、69.75、68.30、68.25、64.34、60.94、54.54、52.82、49.72、48.57、45.68、40.38、39.90、38.18、36.60、31.98、31.62、31.58、29.53、28.83、27.78、24.41、23.06、22.09、20.56、19.31、18.78、17.66、15.80(見圖 5)。氯醛甲醯胺 A 為白色的析出固體物，使用 ESI 高解析度質譜儀 (obsd M^+ m/z 861.5376, calcd M^+ m/z 861.5343) 分析其分子式為 $\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_{12}$ (不飽和度為 13 度)。 ^1H NMR 核磁共振光譜中，氯醛甲醯胺 A 在 $\text{DMSO}-\text{D}_6$ 儀器中，有 68 個質子訊號，其中 9 個質子 [δ_{H} : 8.89, 8.44, 8.23, 8.22, 7.96, 7.64, 6.65, 5.10, 4.13] 不是 NH 就是 OH，因為缺乏異核 NMR(HMQC) 分析的碳相關分析，而無從判別。 ^{13}C -NMR 頻譜中，顯示有 7 個羰基訊號 [δ_{C} : 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45]，而 ^1H NMR 核磁共振譜中，有 6 個 α - 氨基質子訊號 [δ_{H} : 4.07、4.06、3.96、3.95、3.88, 3.72]，依據觀察結果，即顯示氯醛甲醯胺 A 是一種肽類。

2D NMR 核磁共振資料中，即可說明有 3 個氨基酸單元，是由 1 個亮氨酸(LEU)、1 個纈氨酸(VAL)和 1 個穀氨醯胺(Gln)所構成。氨基酸分析結果證實這些氨基酸的存在，也表示出現上述 3 種的氨基酸。DEPT 和 2D NMR(COSY、HSQC 和 HMBC) 進一步的質譜資料中，即證明下列 3 個結構 I、II 和 III 的存在，如下所示。



藉由例行的 HMBC NMR 分析中，使用 α -氨基質子和/或二級醯胺質子，以及羰基碳共振和化學位移的相關性，證明在 1 中的 3 個子結構的連結。藉由 CH_3 -40 [δ_{H} : 1.00] 和丙氨酸 α -氨基質子 [δ_{H} : 3.42] 與 C-10 碳原子 [δ_{C} : 70.11] 的 HMBC 相關性，即可證明 C-9 子結構與 C-10 子結構 II 的連結。可藉由羥基 [δ_{H} : 5.10]，對應 C-9 在 [δ_{C} : 49.78] 的相關性，而證明 HMBC-3 鍵連結的相關性。亞甲基在 [δ_{H} : 3.50] 的子結構 III 中，即有 3 鍵的 HMBC 對應 C-19 [δ_{C} : 68.31]，而連結子結構 I 和 II。在 C-3 的季碳 [δ_{C} : 98.09]，藉由 H-21 [δ_{H} : 3.95] 和其化學位移值的若連結，而形成環形結構，而連結 C-21 [δ_{C} : 64.40]。最後，環形的封閉連結，由 3 鍵的 HMBC 連結，自 H_3 -36 [δ_{H} : 1.43] 接到 C-1 [δ_{C} : 172.17]，可讓氯醛甲醯胺 A(1) 形成平面的結構。

化合物 B 的分子量是 874。具有類似的 NMR 核磁共振和 UV 數據資料，即顯示化合物 B 也屬於肽類。

紫色桿菌素(2)和去氧紫色桿菌素(3)的結構，可藉由研究文獻的數據資料，進行這些化合物的比較。氯醛甲醯胺 A、紫色桿菌素和去氧紫色桿菌素的結構如圖 7。

例 2：氯醛甲醯胺 A 的氨基酸分析

氯醛甲醯胺 A(0.05mg)即進行液相水解(6N 鹽酸、1% 苯酚在 110°C 的 24 小時真空環境中)。冷卻後，將反應混合物乾燥，而水解產物溶於 Norleu 的稀釋緩衝液中，體積為 1.0 mL。50 μL 的樣本放入離子交換柱中進行分析。

關於校準的標準，在 Na-based Hitachi 8800 的氨基酸分析

儀(Sigma A -9906)中，使用氨基酸的標準溶液，來判定反應因數，可藉此在日立 8800 的分析儀中，對所有的氨基酸進行校準。各注射液含 NorLeucine 作為內部標準，可進行樣本量和層析變量的結果修正。系統則採用 Pickering Na 緩衝液、Pierce Sequanal 鹽酸(水解)、Transgenomic 離子交換柱、加州大學戴維斯分校分子結構基金組織(MSF)開發的優化方法，記錄樣本中的各個氨基酸成份。樣本中的氨基酸 (氯醛甲醯胺 A) 經發現為 Glx (穀氨醯胺/谷氨酸)、leu (氨酸)和 Val (Valine)。

例 3：確認粉紋夜蛾的毒性

在餾分物(F1)中的化合物毒性，使用粉紋夜蛾幼蟲作為測試樣本，進行體外的生物實驗。

在 96 孔的樣本培養板中，每孔放有 200 微升的市售粉紋夜蛾樣本。進行樣本凝固後，使用含 50 μ L 提取物的 100 μ L 溶液(在餾分物 1 中，發現到 4 個峰值； H1 - H4)，使用吸管在各孔放有 350 μ L EtOH 和 600 μ L 的無菌去離子水，然後培養板使用掌上型風扇進行乾燥。各培養孔的提取物容量為 10 微克，每個處理動作重複 8 次，而純乙醇和水的混合物，作為陰性對照組使用。

1 隻測試用的昆蟲(中齡粉紋夜蛾幼蟲)放入培養孔中，而培養板以黏膠密封。將黏膠打孔透氣，而密封的培養板在 26 $^{\circ}$ C 進行孵育 4 天。

結果如下列表 1 所示，顯示峰值 H1 的化合物，具有良好的活性(>60%的死亡率)。此特別的峰值含氯醛甲醯胺 A 成份(1)(圖 1)。

表 1：10 ug/孔下的粉紋夜蛾死亡率(%)

F1 H1	66.7
F1 H2	11.1
F1 H3	33.3
F1 H4	11.1

例 4 - 粉紋夜蛾紫色桿菌素的 LC₅₀ 測定

如上例，96 孔的培養板，用於判定純紫色桿菌素的濃度，是否可殺死 50% 的中齡粉紋夜蛾幼蟲。在 26°C 下，4 天潛伏期後的死亡率，如下表 2 所示。根據數據資料內容，紫色桿菌素是烈性殺蟲劑，預估 LC₅₀ 數值為每孔 7×10^{-6} 微克，用於粉紋夜蛾幼蟲的體外飲食覆蓋化驗分析中。

表 2 粉紋夜蛾的紫色桿菌素防治效果

紫色桿菌素 ug/孔	%死亡率 第 4 天
10	100
1	100
0.1	100
0.01	100
0.001	100
0.0001	100
0.00001	71.4
0.000001	14.2
1E-07	0

例 5 - 色桿菌培養液對根結線蟲幼蟲的毒性

為評估經過濾滅菌的色桿菌對根結線蟲幼蟲 (*Meloidogyne incognita*)(J2) 根結線蟲的毒性，即使用時，孔的塑膠培養板進行下列的測試：

各測試溶液有 300μL 等分(1 倍或 0.1 倍過濾消毒培養液)，加入各個培養孔後，然後放入 15 隻線蟲，使用 10μL 的純水加入各個培養孔中，培養板上蓋，在 25°C 下持續培養 24 小時。水和 Avid(阿維菌素)以 20,000 倍的稀釋比例，分別作為陰性和陽性的實驗對照組。各種化合物對線蟲活動力的影響，在 24 小時後，使用針來檢測每隻線蟲，各次處理中，無活動力的線蟲，以百分比值加以記錄。為評估每次處理後的線蟲活動力，各培養孔移除 200μL 的培養液，而各個培養孔剩餘的培

養液，加入 2mL 的純水來吉軒稀釋。培養板再次如上所述，孵育 24 小時，然後進行第 2 次的評估(48 小時)。

其結果如圖 8 和 9 中，即顯示未稀釋而過濾滅菌的培養液，對於原本有活動力的根結線蟲幼蟲，可抑制其活動力。此效果持續 48 小時，即表示色桿菌的培養液具有殺線蟲活性。

例 6：色桿菌 (MBI-203)培養液對黃瓜根系的影響

MBI-203 進行對根結線蟲(*Meloidogyne* sp.)其內在活動力影響上，進行了兩次的微浸濕測試。

材料和方法

具體來說，MBI-203 是在 45mL 的盆中，進行溫室檢測。黃瓜種子直接在培養盆中栽種，盆中裝滿砂壤土。10 天後，培養盆各加入 5ml 的懸浮液，然後培養盆中，再加入 3000 個 *M. incognita* 的蟲卵，依據各個不同的處理用量，重複 4 次的檢測。14 天後，經應用和接種試驗後，將作物收成。根系的損傷根據 Zeck 的損傷指數(Zeck 1971)進行評估。特定條件載於下列表 3 中。

進行控制組的比較，進行黃瓜種子生長的藥害量測。

表 3	
	MBI-203 福賽絕(Fosthiazate) (Standard, EC 150)
測試菌種	根結線蟲(<i>Meloidogyne</i> sp.) 每個微浸濕培養盆使用 3000 個蟲卵(2ml)
測試植物	黃瓜 (cucumber cv. Toschka)
測試配方	MBI-203 = 96% 液體配方
MBI-203 測試濃度	最低浸濕測試#1: 100, 50 ml/L
MBI-203	最低浸濕測試#2: 50, 25, 12.5, 6, 3, 1.5 ml/L
測試應用	浸濕應用

結果

最低浸濕測試編號 1

處理活性非常高，使用 50 ml/L (MBI- 203)的濃縮液後，其殺蟲率約 100%。觀察 MBI - 203 的輕微藥害。福賽絕 (Fosthiazate)的性能一如往常(20 ppm 下 100%防治率)。

最低浸濕測試編號 2

50 和 25ml 最高濃縮液的 MBI-203 施用下，出現有藥害，在這些濃度下無法進行評估。

12.5 ml/L 濃度的線蟲防治率超過 95%，而 3 ml/L 濃度的防治率降到 33%。1.5ml/L 的濃度，無任何防治效果。

福賽絕(Fosthiazate)的相關一如往常(20 ppm 下 100%的防治率)。

例 8：色桿菌 (MBI-203)培養液的協同作用影響的相關研究。

在 96 孔的培養板中，藉由線蟲幼蟲的人工餵養，來吉軒協同作用的測試。將 100 μ L 的處理液滴入各個培養孔中，MBI-203(細胞培養液濃縮至 7.6%的乾重比值)，使用預設的餵分物 LC₅₀ 濃度，進行市售殺蟲劑和兩種混合劑的測試。使用風扇除去多餘的水份，甜菜夜蛾的幼蟲、斜紋夜蛾或粉紋夜蛾、粉紋夜蛾放入各個培養孔中，放有幼蟲的培養板覆蓋有膠粘劑，每個黏膠上戳有 1 個小孔，讓每個孔通氣。培養板存放在 26℃，16 小時燈照/8 小時黑暗下，為期 3 天。放入幼蟲後，在第 3 和第 4 天記錄死亡率。

關於協同作用、對抗作用或加成的交互作用，則使用 (Colby 1967)的方法進行測定。由於在生物檢測上的變化，數值 0 到 0.9 之間，即視為具有對抗作用，數值 0.9-1.1 具有加成作用，數值超過 1.1 為具有協同作用的關係。

檢測出含殺蟲劑的 MBI-203，對甜菜粘蟲(BAW)具有殺蟲的對抗作用。氯虫酰胺 (市售產品名稱為 Coragen，Dupont 生產)、蘇力菌 kurstaki 變種 (Dipel，Valent Biosciences)、多殺菌素 (市售產品名稱為 Entrust，Dow Agro Sciences)、螺蟲乙酯 (spirotetramet) (市售產品名稱為 Movento，Bayer 公司生產)和除蟲菊 (市售產品名稱為 Pyganic，Arbico Organics 公司)，使用 MBI-203 進行測試。如上所述，除非另有說明者，否則 MBI-203 和殺蟲劑的 LC₅₀ 濃度值。結果顯示如表 4。蘇力菌

kurstaki 變種除外，所有的藥劑和一實例的 LC_{50} 濃度，出現有協同作用。

表 4：MBI-203 + 殺蟲劑：對粉紋夜蛾的防治效果

產品	MBI-203 單方殺蟲率%	產品單 方殺蟲率	預期複方 殺蟲率	實際複 方殺蟲率	比值	定義相 關性
氯虫酰胺	21	3	23.4	33.3	1.42	syn
蘇力菌 kurstaki 變種	61.7	89.6	96	100	1.04	添加
多殺菌素	41.5	54.3	72.99	100.00	1.37	syn
螺蟲乙酯	87.9	23.8	86.34	89.87	1.04	添加
螺蟲乙酯 (0.5X LC_{50}) ; MBI-203 (0.3X LC_{50})	90.6	41.5	91.90	94.94	1.03	添加
除蟲菊	19.7	2.8	21.93	55.37	2.53	syn

MBI-203 含抗甜菜粘蟲(BAW)殺蟲劑成份進行測試。氯虫酰胺 (市售產品名稱為 Coragen, Dupont 生產)、蘇力菌 kurstaki 變種 (Dipel, Valent Biosciences), Spinosad (市售產品名稱為 Entrust, Dow Agro Sciences)、螺蟲乙酯 (市售產品名稱為 Movento, Bayer Crop Science)和除蟲菊 (市售產品名稱為 Pyganic, Arbico Organics 公司), 使用 MBI-203 進行測試。如上所述, 除非另有說明者, 否則 MBI-203 和殺蟲劑即採用 LC_{50} 的濃度值。結果顯示於表 5。MBI-203 和氯虫酰胺具有加成交互作用, 但蘇力菌 kurstaki 變種和多殺菌素, 加有 MBI-203, 對 BAW 的防治具有協同作用。含 MBI-203 的除蟲菊成份組合具有防治效果, 螺蟲乙酯和 MBI-203 組合, 主要對甜菜夜蛾具有對抗性的防治效果。

表 5：MBI-203 + 殺蟲劑：對甜菜夜蛾的防治效果

產品	MBI-203 單方殺蟲率%	產品單 方殺蟲率	預期複方 殺蟲率	實際複 方殺蟲率	比值	定義相 關性
氯虫酰胺	11.6	9.1	19.69	19.9	1.01	添加
蘇力菌 kurstaki 變種	24.5	19.8	39.4	68.3	1.73	syn
多殺菌素	23.8	68.7	83.33	100	1.2	syn
螺蟲乙酯	0	21.6	36.10	27.60	0.76	antag
螺蟲乙酯 (0.53X LC_{50}) ; MBI-203 (0.7X LC_{50})	0	42.9	38.55	41.67	1.08	添加

螺蟲乙酯	21.4	53.3	60.57	53.70	0.89	antag
螺蟲乙酯 (1.4X LC ₅₀) ; MBI-203 (1.2X LC ₅₀)	10	77.5	78.22	41.23	0.53	antag
除蟲菊	14.4	74.5	78.17	12.16	0.16	antag
除蟲菊	70.7	11.1	73.97	27.78	0.38	antag

雖然本發明已提供具體的參考圖說內容，但本發明的詳細說明內容概無限制其他可能的應用，顯然，也可利用各種的同等事物、變更和修改內容，但仍屬本發明範圍內。

本文說明提及的許多參考內容中，即構成本文完整的說明內容。

参考文献

- Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. 2006. Daryamides A-C, Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of the Genus *Streptomyces* strain CNQ-085 J. Nat. Prod. 69:1756-1759.
- Arena, J. P., K. K. Liu, et al. (1995). "The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans* - correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding and biological activity." *Journal of Parasitology* **81**: 286-294.
- Balibar, C.J. and C.T. Welsh (2006). "In Vitro Biosynthesis of Violacein from L-Tryptophan by the Enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*." *Biochemistry* **45**: 15444-15457.
- Chalvet-Monfray, K., P. Sabatier, et al. (1996). "Synergy between deltamethrin and prochloraz in bees: Modeling approach." *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(4): 525-534.
- Chitwood, D. J. (2003). Nematicides. *Encyclopedia of Agrochemicals*, vol 3. J. R. Plimmer. New York, John Wiley & Sons. **3**: 1104-1115.
- Colby, S. R. (1967). "Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations." *Weeds* **15**(1): 20-22.
- Durán, N., G. Z. Justo, et al. (2007). "Minireview. Violacein: properties and biological activities." *Biotechnol. Appl. Biochem.* **48**: 127-133.
- Durán, N. and C. F. M. Menck (2001). "Chromobacterium violaceum: a review of pharmacological and industrial perspectives." *Crit. Rev. Microbiol.* **27**: 201-222.
- Farenhorst, M., B. G. J. Knols, et al. (2010). "Synergy in Efficacy of Fungal Entomopathogens and Permethrin against West African Insecticide-Resistant *Anopheles gambiae*"

Mosquitoes." PLoS ONE **5**(8): e12081.

Hoshino, T., T. Takano, et al. (1987). "Biosynthesis of violacein: origins of the hydrogen, nitrogen and oxygen atoms in the 2-pyrrolidone nucleus." Agric. Biol. Chem. **51**: 2733-2741.

Hummelbrunner, L. A. and M. B. Isman (2001). "Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(2): 715-720.

Hungria, M., S. Astolfi-Filho, et al. (2005). "Genetic characterization of *Chromobacterium* isolates from black water environments in the Brazilian Amazon." Lett. Appl. Microbiol. **41**: 17-23.

Krieg, A., A. M. Huger, et al. (1983). "*Bacillus* sp. *thuringiensis* var. *tenebrionis*: Ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp." Z. Angew. Entomol. **96**: 500-508.

Kämpfer, P., H.-J. Busse, et al. (2009). "*Chromobacterium piscinae* sp. nov. and *Chromobacterium pseudoviolaceum* sp. nov., from environmental samples." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **59**: 2486-2490.

Martin, P. A. W., D. Gundersen-Rindal, et al. (2007a). "*Chromobacterium substugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 993-999.

Martin, P.A., A.D.S. Shropshire, et al., (2007b). "*Chromobacterium substugae* sp. nov for control of insect pests" U.S. Patent No. 7244607 B2.

Martin, P.A.W., Hirose, E., and Aldrich, J.R. 2007c. " Toxicity of *Chromobacterium substugae* to southern green stink bug (Heteroptera:Pentatomidae) and corn rootworm

- (Coleoptera:Chrysomelidae)". J. Econ. Entomol. 100: 680-684.
- Martin, P. A. W. (2004). "A freeze-dried diet to test pathogens of Colorado potato beetle." *Biological Control* **29**(1): 109-114.
- McClean, K. H., M. K. Winson, et al. (1997). "Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones" *Microbiology* **143**: 3703-3711.
- Meunier, L., P. Carubel, et al. (1999). Insecticidal combinations including an insecticide from the family chloronicotinyl family and an insecticide having pyrazole, pyrrole, or phenylimidazole group. U. States. United States, Rhone-Poulenc Agrochimie: 6.
- Pederson, M. and H. S. Woldum. Synergistic Combination of Glutamate-and-Gaba-Gated Chloride Against Pesticide and at Least One Vitamin E, Niacin, or Derivatives Thereof, US 2009/0111579, published April 30 2009..
- Puritch, G. and G. Salloum. Environmentally Safe Insecticide, US 5047424, issued September 10, 1991..
- Shapiro-Ilan, D. I., T. E. Cottrell, et al. (2011). "Effects of combining microbial and chemical insecticides on mortality of the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae)." *J Econ Entomol* **104**(1): 14-20.
- Ryan, K. S. and C. L. Drennan (2009). "Divergent pathways in the biosynthesis of bisindole natural products." *Chemistry&Biology* **16**: 351-364.
- Shapiro-Ilan, D. I., T. E. Cottrell, et al. (2011). "Effects of combining microbial and chemical insecticides on mortality of the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae)." *J Econ Entomol* **104**(1): 14-20.
- Thompson, G. D., R. Dutton, et al. (2000). "Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme."

Pest Management Science **56**: 696-702.

Whitehead, A. G. (1998). Plant nematode control. Wallingford, UK, CAB International.

Wirth, M. C., J. A. Jiannino, et al. (2004). "Synergy between Toxins of *Bacillus* sp. thuringiensis subsp. israelensis and *Bacillus* sp. sphaericus." *Journal of Medical Entomology* **41**: 935-941.

Young, C.-C., A. B. Arun, et al. (2008). "Chromobacterium aquaticum sp. nov., isolated from spring water samples." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 877-880.

Zeck W.M. (1971) Ein Bonitierungsschema zur Felddauswertung von Wurzelgallenbefall. *Pflanzenschutznachrichten Bayer* 24,1: 144-147.

【圖式簡單說明】

圖 1 是淨化流程圖，用於自培養基中析出本發明的化合物。

圖 2 說明氯醛甲醯胺 A (1) 的 ESI-LCMS 色譜。

圖 3 說明氯醛甲醯胺 A (1) 的 HRMS 數據資料。

圖 4 說明氯醛甲醯胺 A (1) 在 DMSO-d₆ 600 MHz 下的 ¹H NMR 值分佈。

圖 5 說明氯醛甲醯胺 A (1) 在 DMSO-d₆ 600 MHz 下的 ¹³C NMR 值分佈。

圖 6 說明化合物 B (MW 874) 的 HPLC 色譜。

圖 7 說明氯醛甲醯胺 A (1) 紫色桿菌素(2)和去氧紫色桿菌素(3)的化學結構。

圖 8 為色桿菌培養液經過過濾消毒處理 24 小時後的線蟲後活動力百分比值(1x – 未稀釋；0.1x – 稀釋 10 倍)。

圖 9 為色桿菌培養液經過過濾消毒處理 48 小時後的線蟲後活動力百分比值(1x – 未稀釋；0.1x – 稀釋 10 倍)。

【主要元件符號說明】

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100138032

A01N 63/02(2006.01)

※申請日：100.12.20

※IPC 分類：A01N 61/00(2006.01)

A01P 5/00(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

色桿菌之活性組成份與代謝物/CHROMOBACTERIUM
BIOACTIVE COMPOSITIONS AND METABOLITES

二、中文發明摘要：

本發明揭露一種源自色桿菌的生物活性成分和代謝物，尤其是色桿菌的培養物，可用作為控制蟲害的方法。

三、英文發明摘要：

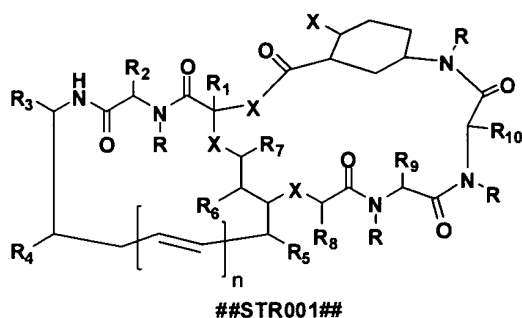
Provided are bioactive compounds and metabolites derived from *Chromobacterium* species culture responsible for controlling pests, compositions containing these compounds, methods for obtaining these compounds and methods of using these compounds and 5 compositions for controlling pests.

七、申請專利範圍：

- 1.一種化合物，其具備有以下特徵：(a)具有殺蟲活性；(b)液相色譜/質譜(LC/MS)測定的分子量約 840-900；(c)使用水：乙腈(CH₃CN)的梯度溶劑系統(0-20 分鐘；90-0%水溶液 CH₃CN，20-24 分鐘；100%CH₃CN，24-27 分鐘；0-90%水溶液 CH₃CN，27-30 分鐘；90%水溶液 CH₃CN)，在 0.5 毫升/分鐘的流速下，以 210 nm 的紫外線檢測，在反相 C-18 HPLC 柱中，其高壓液相色譜法(HPLC)的保留時間約 7-12 分鐘，且(d)可另外自色桿菌菌種取得相關成份。
- 2.依據申請專利範圍第 1 項所述之化合物，在反相 C-18 HPLC 柱中的保留時間為 9 分鐘。
- 3.依據申請專利範圍第 1 項所述之化合物，在 ¹³C NMR 的測定下，含 43 個碳、7 個甲基、10 個亞甲基碳、12 個烯基、6 個 olefinic methines 和 8 個季碳。
- 4.依據申請專利範圍第 1 至 3 項所述之化合物，(i)在液相色譜/質譜法(LC/MS)測定下，其分子量約為 840-890；(ii)¹H NMR 的 δ 值約為 8.89、8.44、8.24、8.23、7.96、7.63、6.66、5.42、5.36、5.31、5.10、4.13、4.07、4.05、3.96、3.95、3.88、3.77、3.73、3.51、3.44、3.17、2.40、2.27、2.11、2.08、2.03、2.01、1.97、1.95、1.90、1.81、1.68、1.63、1.57、1.53、1.48、1.43、1.35、1.24、1.07、1.02、0.96、0.89、0.88、0.87、0.80，而(iii)¹³C NMR 的 δ 值約為 173.62、172.92、172.25、172.17、171.66、171.28、170.45、132.13、130.04、129.98、129.69、129.69、125.48、98.05、70.11、69.75、68.30、68.25、64.34、60.94、54.54、52.82、49.72、48.57、45.68、40.38、39.90、38.18、36.60、31.98、31.62、31.58、29.53、28.83、27.78、24.41、23.06、22.09、20.56、19.31、18.78、17.66、15.80。
- 5.依據申請專利範圍第 4 項所述之化合物，具有下列至少一個條件：(a)在反相 C-18 HPLC 柱中的保留時間為 9.08 分鐘，和(b)液相色譜/質譜法(LC/MS)測定的分子量約為 860。

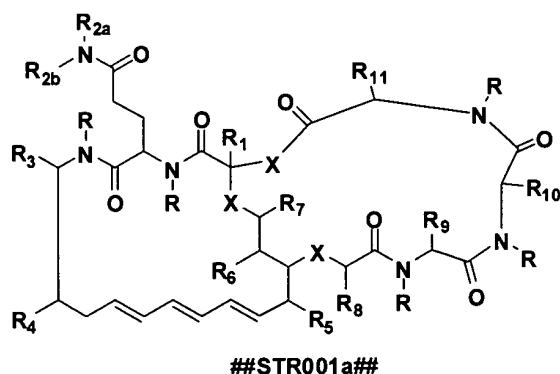
6.依據申請專利範圍第 1 項所述之化合物，係選自某種功能，而含有：

(A)如下圖##STR001##結構的化合物，



或殺蟲劑成份中，可接受的鹽類或立體異構物，其中的 R 是-H 基，較低鍊的烷基，含 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 個烷基團，取代較低鍊的烷基，n 是 0、1、2、3、4、5、6、7、8 或 9；X 是 O、NH、NR 或 S 基，R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9 和 R10 是各個獨立的 H 基，相同或不同於各個獨立的氨基酸側鏈基團或氨基酸側鏈的衍生物、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、取代炔基、芳基、取代芳基、異芳基、取代異芳基、雜環基、取代雜環基、環烷基、烷氧取代基、取代烷氧基、硫代烷基、取代硫代烷基、羥基、鹵素、氨基胺基、羧基，-C(O)H、醯基、oxyacyl、氨基甲酸酯類、磺醯、磺胺類藥或硫基物質；

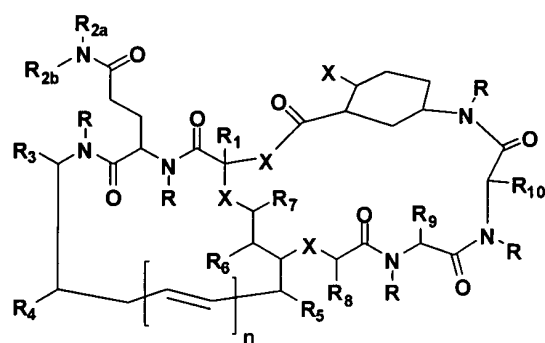
(B)化合物具有如圖##STR001##的結構，



其中的 R 是-H 基，較低鍊的烷基，含 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 個烷基團，取代較低鍊的烷基，X 是 O、NH、NR 或 S 基，R2a 和 R2b 各別選自含-H 基、低鍊烷基、取代烷基和取代

低鏈烷基的物質中， $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}$ 是各個獨立的 H 基，相同或不同於各個獨立的氨基酸側鏈基團或氨基酸側鏈的衍生物、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、取代炔基、芳基、取代芳基、異芳基、取代異芳基、雜環基、取代雜環基、環烷基、取代烷氧基、硫代烷基、取代硫代烷基、羥基、鹵素、氨基氨基、羧基、 $-C(O)H$ 、醯基、oxyacyl、氨基甲酸酯類、磺醯、磺胺類藥或硫基物質；

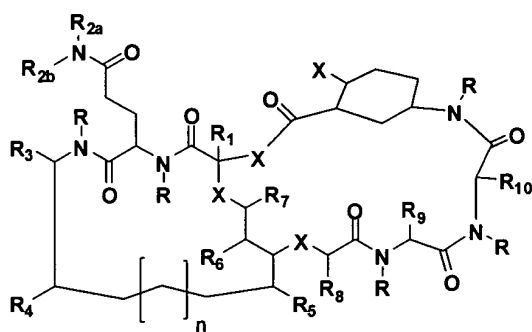
(C) 化合物具有如圖##STR001b##的結構，



##STR001b##

其中的 R 是-H 基，較低鍊的烷基、芳基或烷基芳基團，X 是 O、NH、NR 或 S 基，n 是 0、1、2、3、4、5、6、7、8 或 9，R2a 和 R2b 各別選自含-H 基、低鏈烷基、取代烷基和取代低鏈烷基的物質中， $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}$ 和 R_{11} 是各個獨立的 H 基，相同或不同於各個獨立的氨基酸側鏈基團或氨基酸側鏈衍生物、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、取代炔基、異芳基、取代異芳基、雜環基、取代雜環基、環烷基、取代環烷基、硫代烷基、取代硫代烷基、羥基、鹵素、氨基、羧基、 $-C(O)H$ 、醯基、oxyacyl、氨基甲酸酯類、磺醯、磺胺類或硫基物質；

(D) 化合物具有如圖##STR001c##的結構，



##STR001c##

其中的 R 是 -H 基，較低鍊的烷基、芳基或烷基芳基團，含 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 個烷基團，X 是 O、NH、NR 或 S 基，n 是 0、1、2、3、4、5、6、7、8 或 9，R_{2a} 和 R_{2b} 各別選自含 -H 基、低鍊烷基、取代烷基和取代低鍊烷基的物質中，R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀ 和 R₁₁ 是各個獨立的 H 基，相同或不同於各個獨立的氨基酸側鏈基團或氨基酸側鏈衍生物、烷基、取代烷基、烯基、取代烯基、炔基、取代炔基、異芳基、取代異芳基、雜環基、取代雜環基、環烷基、取代環烷基、硫代烷基、取代硫代烷基、羥基、鹵素、氨基、羧基、-C(O)H、醯基、oxyacyl、氨基甲酸酯類、磺醯、磺胺類或硫基物質。

7. 依據申請專利範圍第 1 至 2 項所述之化合物，具有下列至少一個條件：(a) 在反相 C-18 HPLC 柱中的保留時間為 9.54 分鐘，和 (b) 液相色譜/質譜法 (LC/MS) 測定的分子量約為 874。

8. 一種組成物，係包含 (a) 申請專利範圍第 1 項中的化合物；(b) 殺蟲劑中可接受的載體和 (c) 可含有第 2 種物質，其中所謂的 2 種物質，可為化學性或生物性的殺蟲劑農藥，和/或至少含 1 種的載體、稀釋劑、表面活性劑或輔助劑成份。

9. 一種如申請專利範圍第 1 項所述之化合物之取得方法，包括有：

(a) 在培養基中，新發現的菌種足以自色桿菌中，生成此化合物的成份；

(b) 在 (a) 的完整培養液中，可析離製造此化合物。

10. 一種取得化合物之方法，其係含有 (i) 申請專利範圍第 1 項中

的化合物，而且(ii)此化合物含下列特性：(a)具有殺蟲毒性；(b)液相色譜/質譜(LC/MS)測定的分子量約 315-360，(c)使用水：乙腈(CH₃CN)的梯度溶劑系統(0-20 分鐘；90-0%水溶液 CH₃CN，20-24 分鐘；100%CH₃CN，24-27 分鐘；0-90%水溶液 CH₃CN，27-30 分鐘；90%水溶液 CH₃CN)，在 0.5 毫升/分鐘的流速下，以 210nm 的紫外線檢測，在反相 C-18 HPLC 柱中，其高壓液相色譜法(HPLC)的保留時間約 8-15 分鐘，包含：

(A)在培養基中，新發現的菌種足以自色桿菌中，生成此化合物的成份；

(B)在(A)的完整培養液中，可析離製造此化合物。

11.依據申請專利範圍第 9 至 10 項所述之化合物，在步驟(A)中，由(a)使用完整的培養液中，使用至少其中之一的離子交換柱、體積排阻柱或反相 HPLC 層析柱，得到層析餾分物；(b)進行殺蟲活性的餾分物化驗，和(c)濃縮(b)中的餾分物，以得到析離的化合物。

12.一種植物蟲害的防治方法，用於植物生長中的植物、種子和/或基質中，此(A)成份的用量中，含下列至少其中之一的(i)申請專利範圍第 1 項中的化合物，且(ii)此化合物具有下列特性：(a)有殺蟲毒性；(b)液相色譜/質譜(LC/MS)測定的分子量約 315-360，(c)使用水：乙腈(CH₃CN)的梯度溶劑系統(0-20 分鐘；90-0%水溶液 CH₃CN，20-24 分鐘；100%CH₃CN，24-27 分鐘；0-90%水溶液 CH₃CN，27-30 分鐘；90%水溶液 CH₃CN)，在 0.5 毫升/分鐘的流速下，以 210nm 的紫外線檢測，在反相 C-18 HPLC 柱中，其高壓液相色譜法(HPLC)的保留時間約 8-15 分鐘，且(d)可另外自色桿菌菌種取得相關成份。

13.依據申請專利範圍第 12 項所述之方法，其所使用之化合物含至少其中之一的特性：(a)在液相色譜/質譜法(LC/MS)測定下，其分子量約為 343；(b)在 C-18 反相 HPLC 層析柱中的 HPLC 保留時間約 10 分鐘。

14.依據申請專利範圍第 12 項所述之方法，其所使用之化合物

含至少其中之一特性：(a)在液相色譜/質譜法(LC/MS)測定下，其分子量約為 327；(b)在 C-18 反相 HPLC 層析柱中的 HPLC 保留時間約 12 分鐘。

15.依據申請專利範圍第 12 項所述之方法，其中所謂的化合物選自含氯醛甲醯胺 A、紫色桿菌素和去氧紫色桿菌素的成份物質中。

16.一種植物線蟲的防治方法，用於植物、種子和/或植物生長的基質，為色桿菌菌種的上清液、濾液和/或提取物，和/或 1 個或多個代謝物，可含有效數量的其他殺線蟲劑物質，而用於防治線蟲。

17.一種殺蟲劑成份組合，其協同作用可用於某種害蟲的防治，其活性成份為：(a)某種上清液、濾液和/或色桿菌菌種的提取物，和/或 1 個或更多的代謝物，其成份來自色桿菌菌種的上清液、濾液和/或提取物，其中(a)和(b)的成份同時出現在發揮協同作用的用量中。

18.依據申請專利範圍第 17 項所述之成份組合，其中所謂的害蟲，為昆蟲或線蟲。

19.依據申請專利範圍第 17 項所述之成份組合，其中所謂的殺蟲物質，即(a)來自有機微生物；(b)天然產物或(c)化學產物。

20.依據申請專利範圍第 17 項所述之成份組合，其中所謂的殺蟲物質，即來自有機微生物，選自含枯草桿菌(*Bacillus sp.*)和多殺菌素的微生物群中。

21.依據申請專利範圍第 17 項所述之成份組合，其中所謂的殺蟲物質，為蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)的微生物。

22.依據申請專利範圍第 17 項所述之成份組合，其中所謂的微生物為蘇力菌 *kurstaki* 變種。

23.依據申請專利範圍第 17 項所述之成份組合，其中所謂的殺蟲物質，為化學殺蟲劑成份，選自含來自有機微生物，選自含 pyrethrins、螺蟲乙酯和鄰甲醯氨基苯甲醯胺(anthranilic diamide)的微生物群中。

24.依據申請專利範圍第 17 項所述之成份組合，其中所謂的殺蟲物質，為天然產物，此天然產物為除蟲菊。

25.依據申請專利範圍第 17 項所述之成份組合，其中所謂的成份組合，為複方成份物。

26.一種方法，為用於至少 1 種或多種植物害蟲的協同作用防治方法，用於上述植物、種子和/或生長基質的防治方法，申請專利範圍第 17 項的用量，其成份組合的用量，可用於防治至少 1 種的植物蟲害。

27.一種化合物，具有以下特性：(a)具有殺蟲活性；(b)液相色譜/質譜(LC/MS)測定的分子量約 315-360，(c)使用水：乙腈(CH₃CN)的梯度溶劑系統(0-20 分鐘；90-0%水溶液 CH₃CN，20-24 分鐘；100%CH₃CN，24-27 分鐘；0-90%水溶液 CH₃CN，27-30 分鐘；90%水溶液 CH₃CN)，在 0.5 毫升/分鐘的流速下，以 210 nm 的紫外線檢測，在反相 C-18 HPLC 柱中，其高壓液相色譜法(HPLC)的保留時間約 8-15 分鐘，且(d)可另外自色桿菌菌種取得相關成份。

28.一種此方法取得的化合物，選自的成份群中，含有(i)申請專利範圍第 1 項中的化合物，而且(ii)此化合物含下列特性：(a)具有殺蟲毒性；(b)液相色譜/質譜(LC/MS)測定的分子量約 315-360，(c)使用水：乙腈(CH₃CN)的梯度溶劑系統(0-20 分鐘；90-0%水溶液 CH₃CN，20-24 分鐘；100%CH₃CN，24-27 分鐘；0-90%水溶液 CH₃CN，27-30 分鐘；90%水溶液 CH₃CN)，在 0.5 毫升/分鐘的流速下，以 210 nm 的紫外線檢測，在反相 C-18 HPLC 柱中，其高壓液相色譜法(HPLC)的保留時間約 8-15 分鐘，且(d)可另外自色桿菌菌種取得相關成份。

八、圖式：

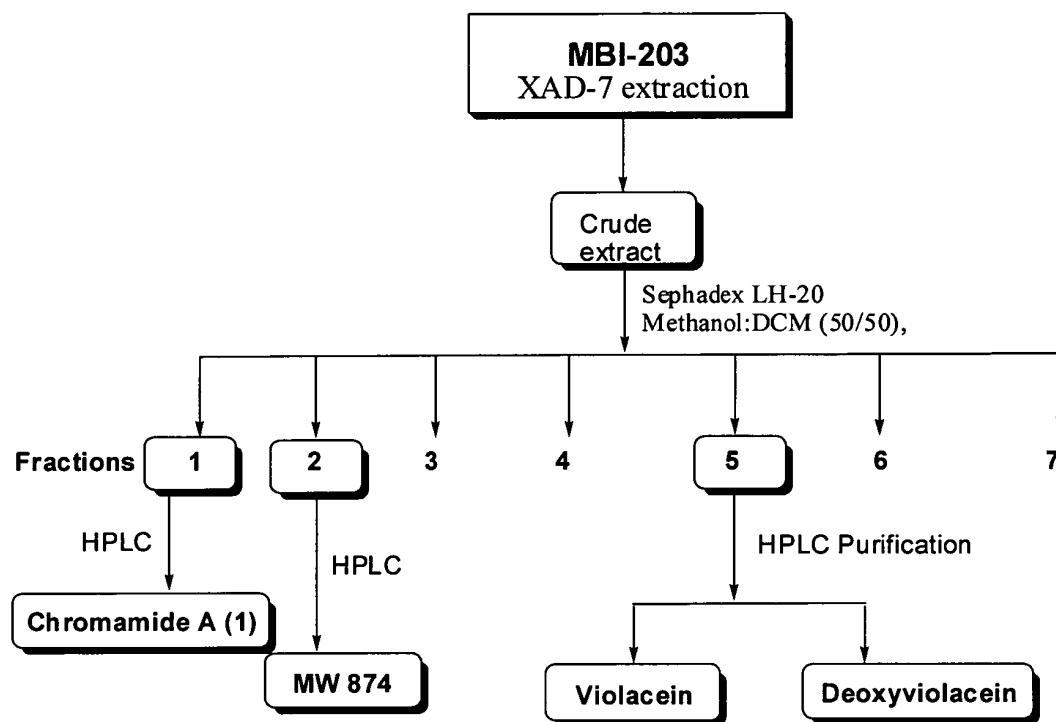


圖 1

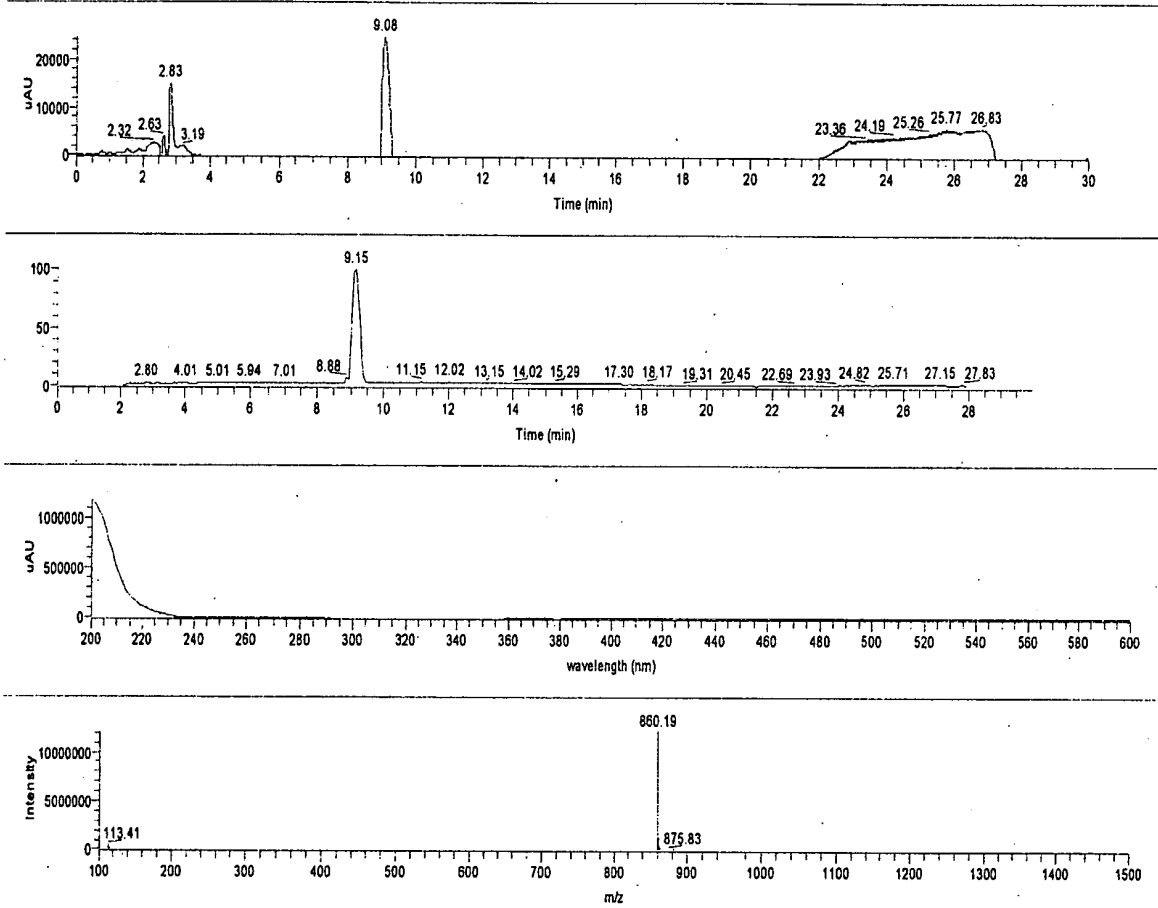


圖 2

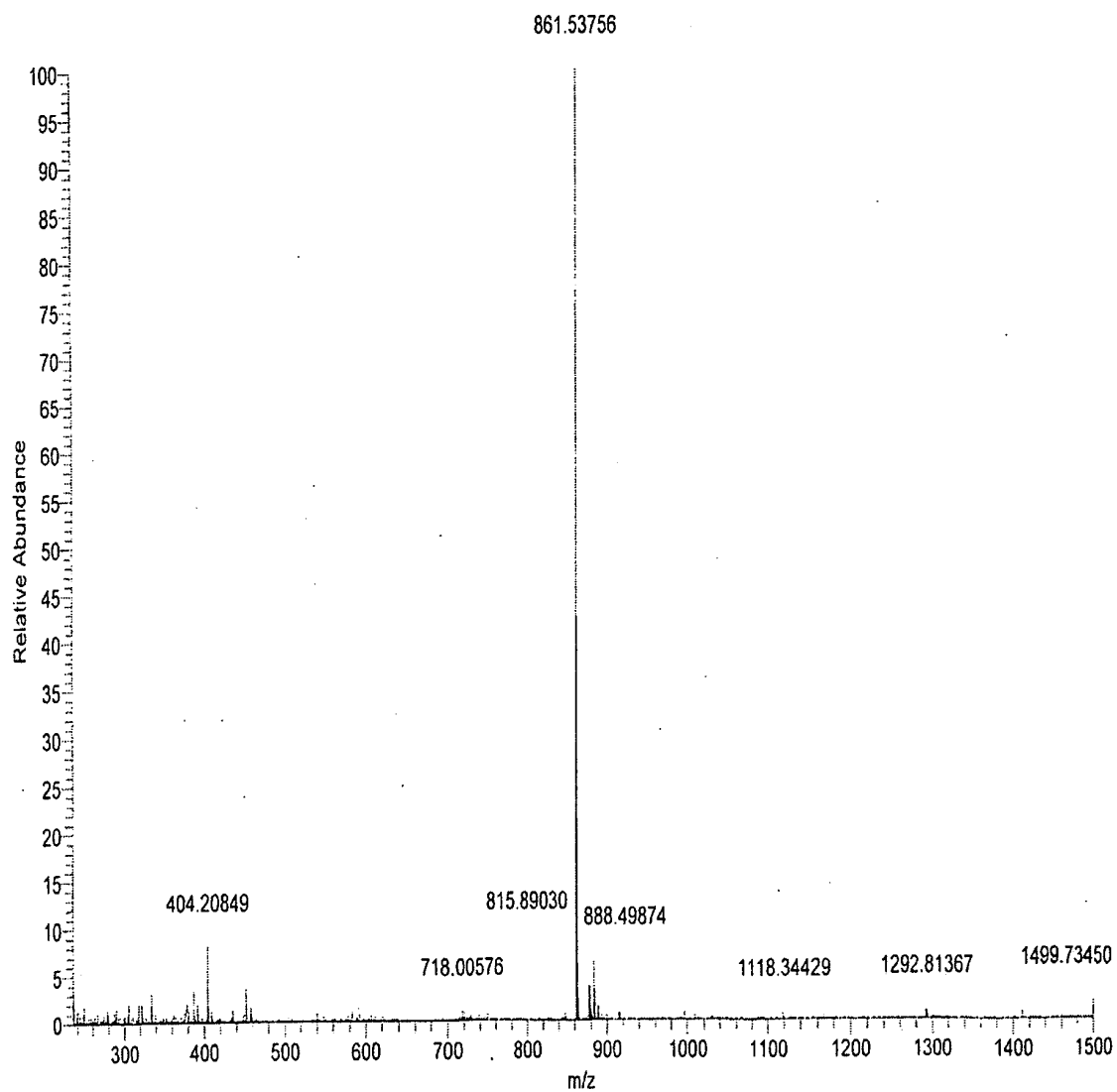


圖 3

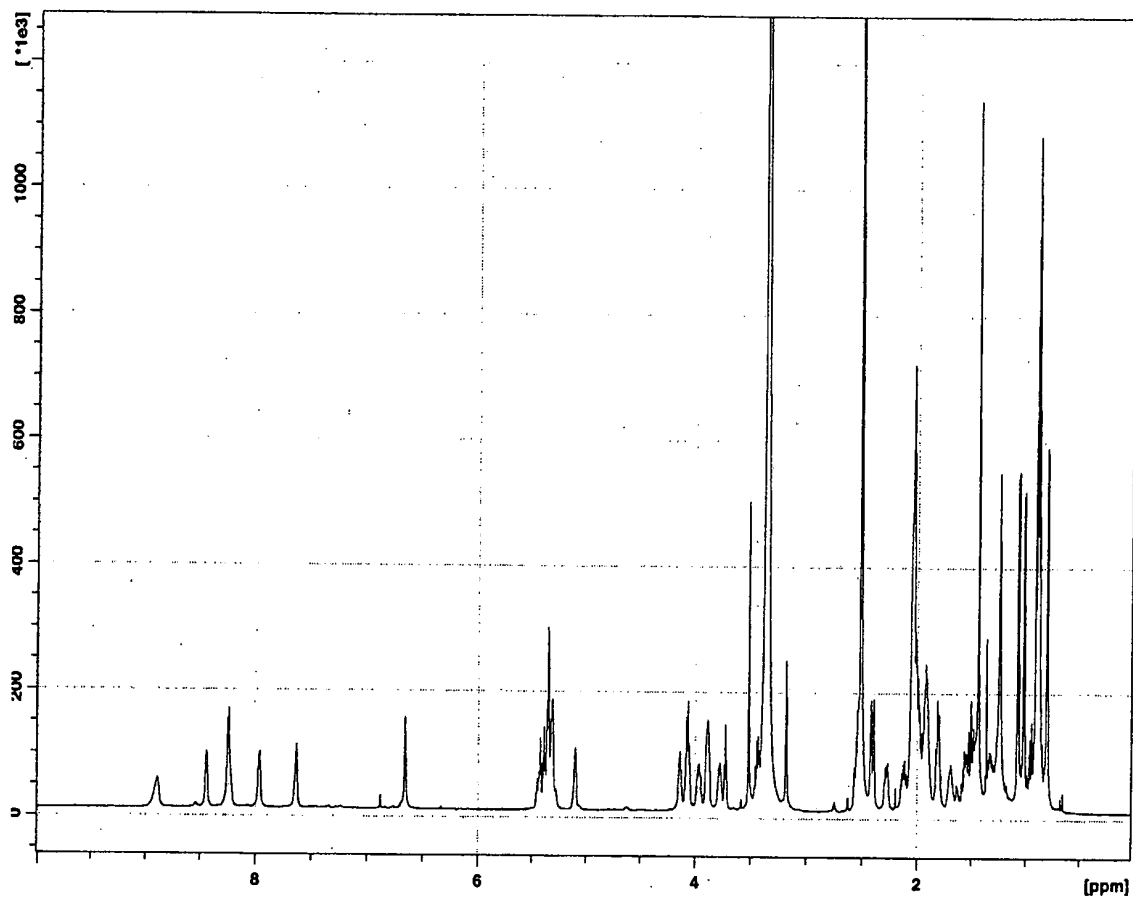


圖 4

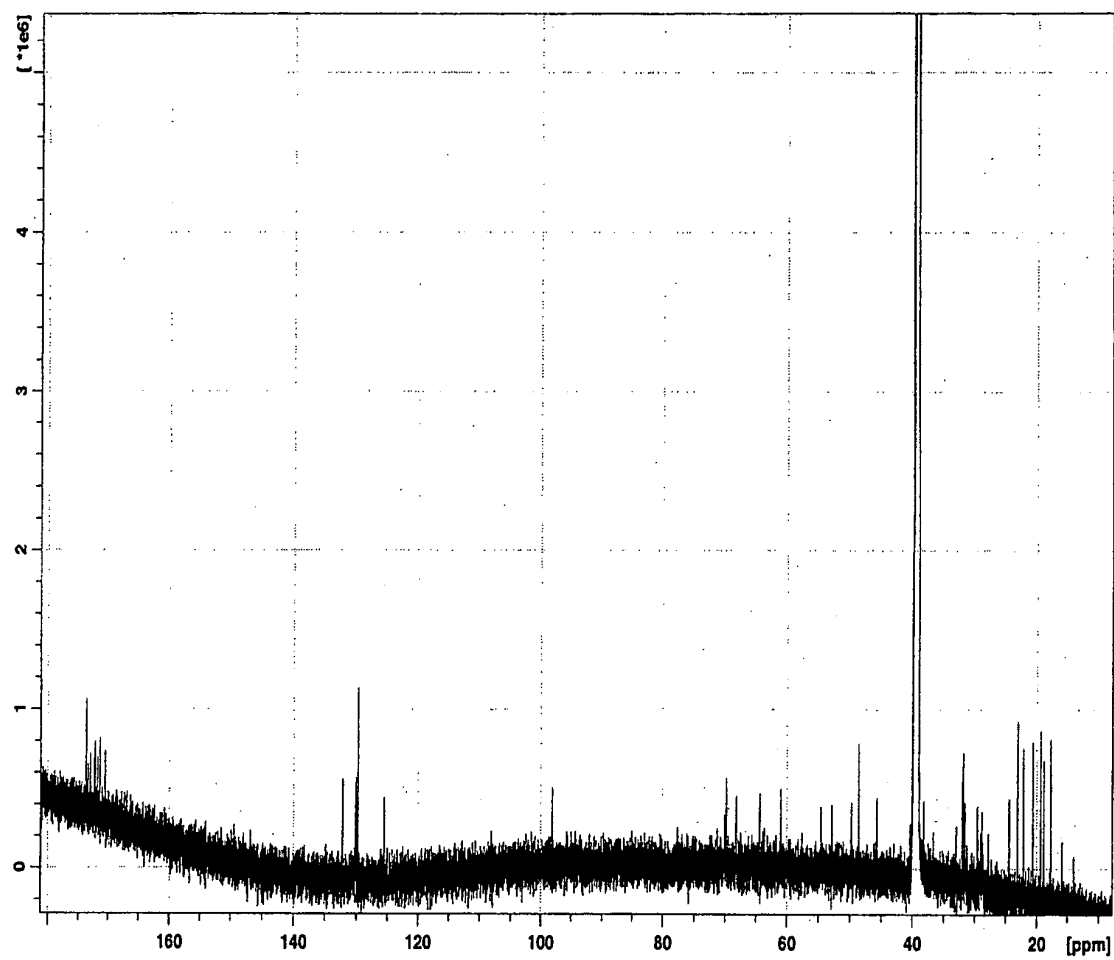


圖 5

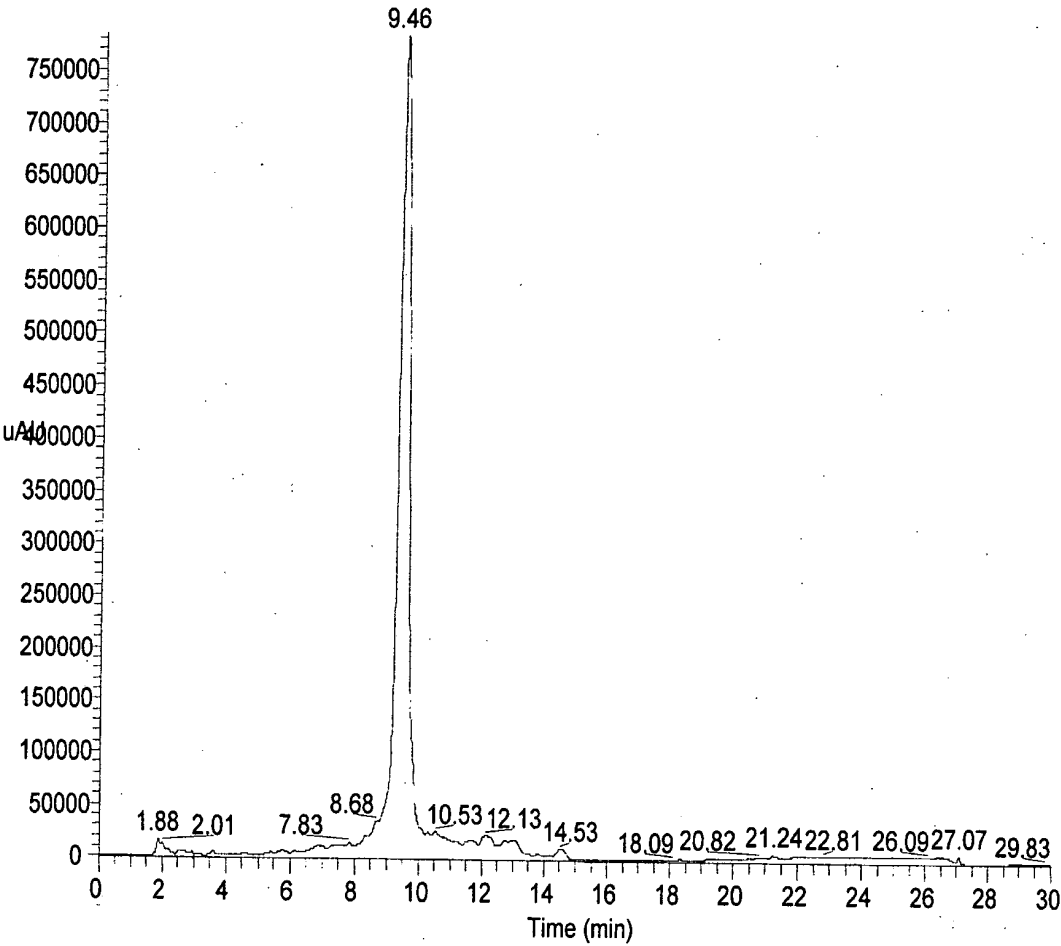
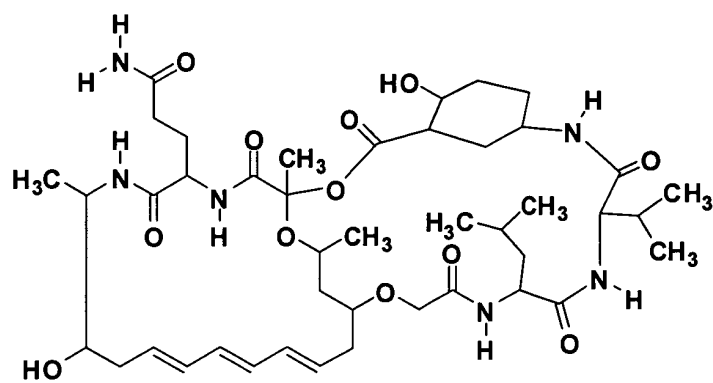
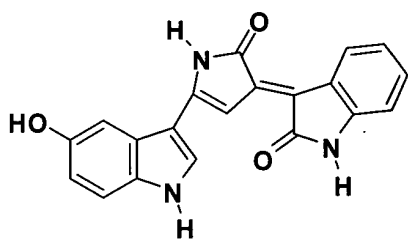


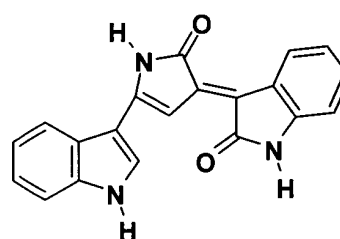
圖 6



Chromamide A (1)



Violacein (2)



Deoxyviolacein (3)

圖 7

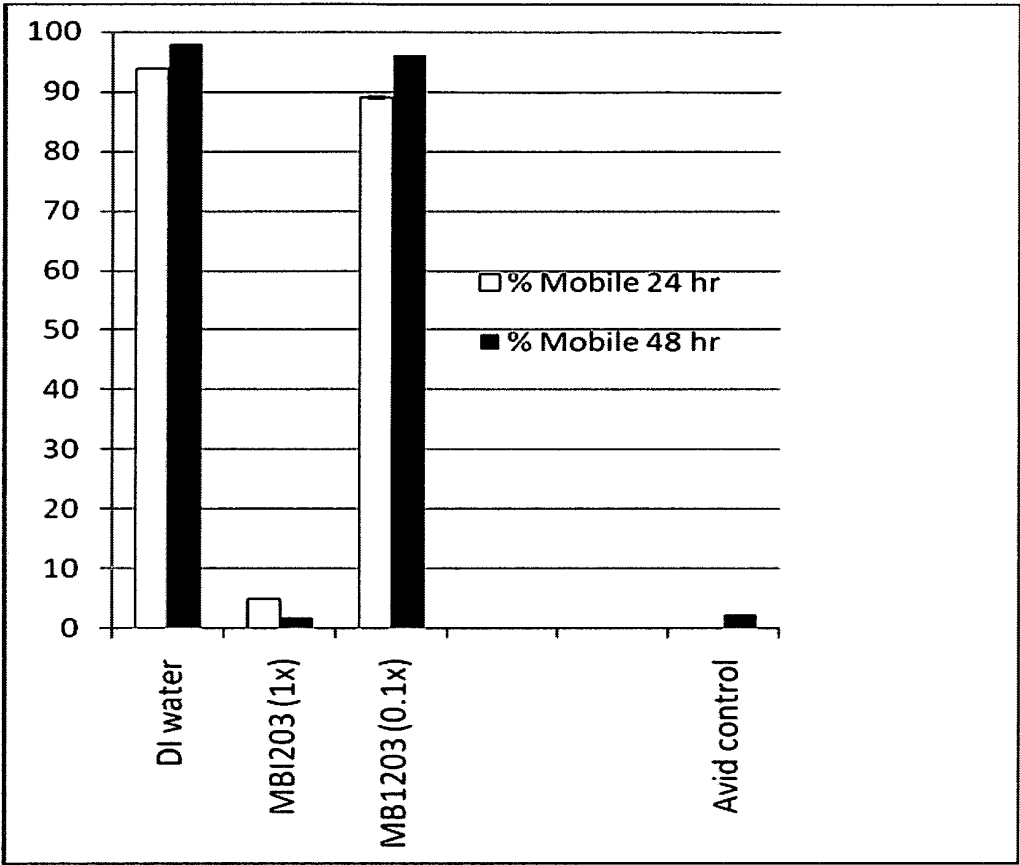


圖 8

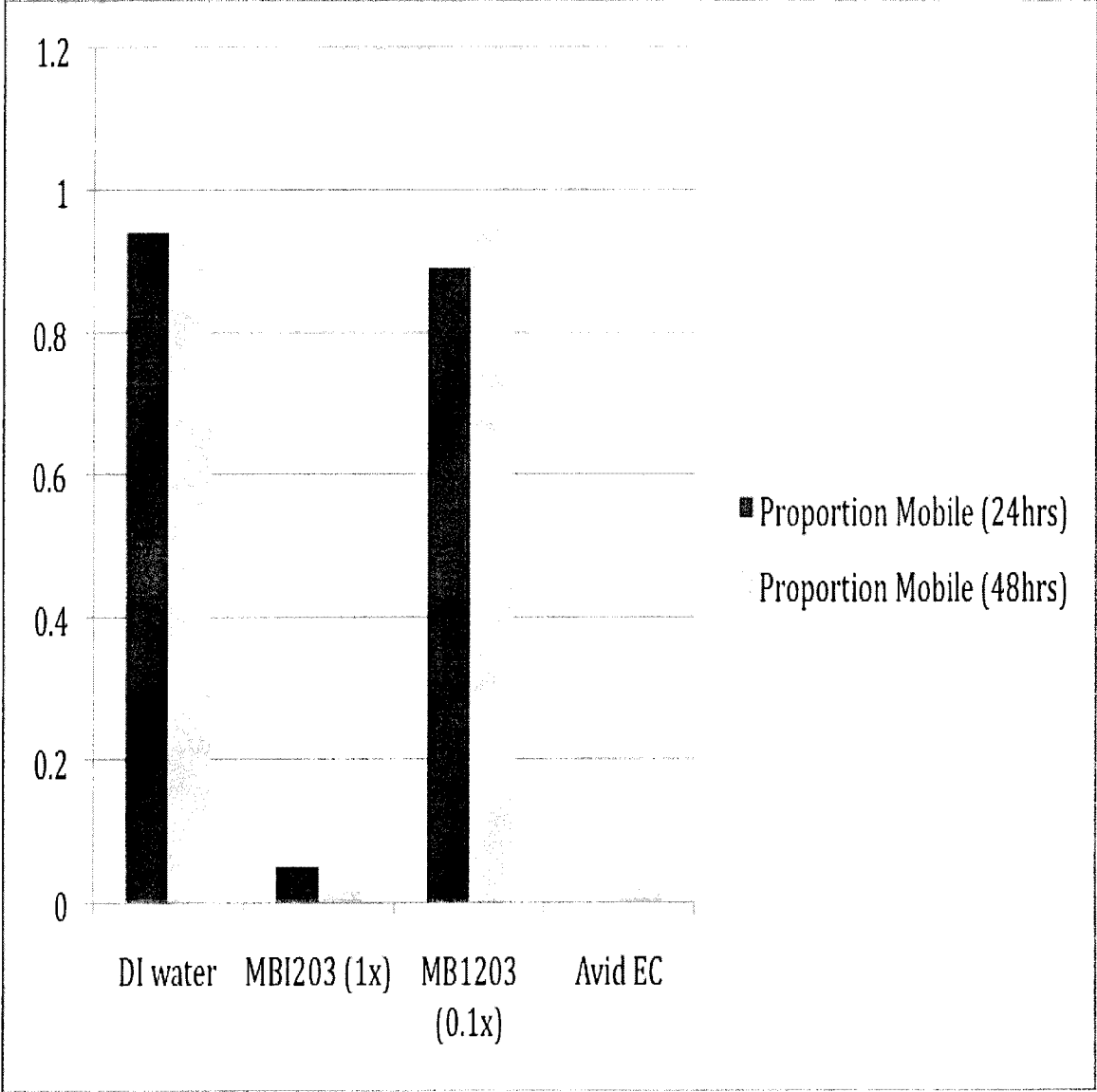


圖 9

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖 1。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：