

证书号第 1218771 号



发明专利证书

发明名称：一种拮抗害虫的新颖苏云金杆菌菌株

发明人：曾经洲；郭雪；高穗生

专利号：ZL 2009 1 0210143.4

专利申请日：2009 年 10 月 27 日

专利权人：行政院农业委员会农业药物毒物试验所

授权公告日：2013 年 06 月 19 日

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发本证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年，自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年 10 月 27 日前缴纳。未按照规定缴纳年费的，专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长

田力普





发明专利证书

Certificate of Invention Patent

中华人民共和国国家知识产权局

STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA



发明专利证书

Certificate of Invention Patent

中华人民共和国国家知识产权局

STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102051337 B

(45) 授权公告日 2013.06.19

(21) 申请号 200910210143.4

US 6177615 B1, 2001.01.23, 全文.

(22) 申请日 2009.10.27

M. S. Li. Isolation Characterization of a Strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* Containing a New δ -Endotoxin Gene. 《CURRENT MICROBIOLOGY》. 2002, 第 45 卷 第 299-302 页.

(83) 生物保藏信息

DSM 22750 2009.07.10

(73) 专利权人 行政院农业委员会农业药物毒物试验所

苏旭东等. 苏云金芽孢杆菌及其 δ -内毒素基因的分类与鉴定. 《植物保护》. 2006, 第 32 卷 (第 2 期), 全文.

地址 中国台湾台中县

(72) 发明人 曾经洲 郭雪 高穗生

审查员 王航

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 韩蕾

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 47/44 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1302866 A, 2001.07.11, 全文.

CN 1337461 A, 2002.02.27, 全文.

权利要求书1页 说明书13页 附图2页

(54) 发明名称

一种拮抗害虫的新颖苏云金杆菌菌株

(57) 摘要

本发明提供了一种拮抗害虫的新颖苏云金杆菌菌株,应用于生物性控制虫害的技术领域,利用一PCR筛选方式鉴定出含 cry1Ab、cry1Ac、cry1D、cry1E 基因的该菌株,该菌株可制成一种用于控制害虫的组合物,该组合物包括可接受的载体及杀虫有效剂量的 δ -内毒素,对受害虫侵袭的区域或预防害虫寄生的区域施加有效剂量的该组合物,可有效防治害虫的生长。

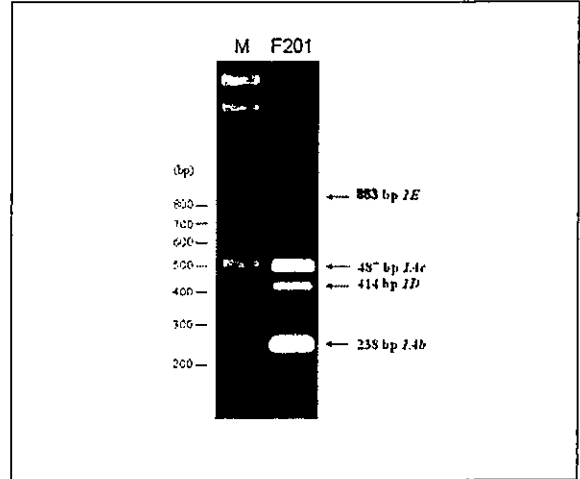
CN 102051337 B



通知日期：2013/7/2

41358 台中市霧峰區舊正里光明路 11 號
行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

曾經洲 博士



本所卷號：CFP00851

客戶卷號：

案件名稱：一種拮抗害蟲的新穎蘇云金杆菌菌株

實際申請日：2009/10/27

案件性質：發明 一般申請案

申請案號：200910210143.4

國別：中國

權利生效日：2013/6/19

權利終止日：2029/10/27

年費繳至：4

年費有效期限：2013/10/27

最早優先日：

曾經洲 博士 先生/小姐您好：

首先，非常感謝 貴公司/台端委託本所辦理上述的案件。

其次，謹函知本案已收到：發明專利證書

並立即轉知 貴公司/台端，請詳閱附件。

本函件為一般通知函件，謹請存查！

以上如有任何相關疑問，請隨時來電洽詢，本所將竭盡全力為 貴公司/台端 服務。

您的服務人員：曾景晃

台北所：

台北市 220 板橋市長安街 277 號
TEL:(02)29515260
FAX:(02)29519846

台中所：

台中市西區 403 台中港路一段 160 號 10 樓之 2
TEL:(04)23291826
FAX:(04)23295037

1. 一种拮抗害虫的苏云金杆菌菌株, 该苏云金杆菌菌株具有 cry1Ab、cry1Ac、cry1D、cry1E 和 cry2A 基因片段, 且所述苏云金杆菌菌株的保藏编号为 DSM 22750, 其中所述苏云金杆菌菌株具有拮抗夜蛾科、螟蛾科以及菜蛾科害虫的能力。

2. 一种用于控制害虫的组合物, 该组合物包括可接受的载体及杀虫有效剂量的 δ -内毒素, 所述内毒素得自具有 cry1Ab、cry1Ac、cry1D、cry1E 和 cry2A 基因片段的苏云金杆菌菌株, 且所述苏云金杆菌菌株的保藏编号为 DSM 22750, 其中所述苏云金杆菌菌株具有拮抗夜蛾科、螟蛾科以及菜蛾科害虫的能力。

3. 一种控制害虫的方法, 该方法包括:

对受害虫侵袭的区域或预防害虫寄生的区域施加有效剂量的苏云金杆菌菌株和 / 或其内毒素的组合物, 其特征在于所述苏云金杆菌菌株为具有 cry1Ab、cry1Ac、cry1D、cry1E 和 cry2A 基因片段的苏云金杆菌菌株, 且所述苏云金杆菌菌株的保藏编号为 DSM 22750, 其中所述苏云金杆菌菌株具有拮抗夜蛾科、螟蛾科以及菜蛾科害虫的能力。

4. 如权利要求 3 所述的方法, 其中所述苏云金杆菌菌株的内毒素为 δ -内毒素。

5. 一种利用苏云金杆菌菌株和 / 或其内毒素防治害虫的方法, 该方法包括:

对受害虫侵袭的区域或预防害虫寄生的区域施加有效剂量的所述苏云金杆菌菌株和 / 或其内毒素的组合物, 其特征在于所述苏云金杆菌菌株为具有 cry1Ab、cry1Ac、cry1D、cry1E 和 cry2A 基因片段的苏云金杆菌菌株, 且所述苏云金杆菌菌株的保藏编号为 DSM 22750, 其中所述苏云金杆菌菌株具有拮抗夜蛾科、螟蛾科以及菜蛾科害虫的能力。

6. 如权利要求 5 所述的方法, 其中所述夜蛾科选自玉米穗虫或拟尺蠖的族群。

7. 如权利要求 5 所述的方法, 其中所述螟蛾科选自豆荚螟、大菜螟或粉斑螟蛾的族群。

8. 如权利要求 5 所述的方法, 其中所述菜蛾科选自小菜蛾的族群。

9. 如权利要求 5 所述的方法, 其中所述苏云金杆菌菌株的内毒素为 δ -内毒素。

一种拮抗害虫的新颖苏云金杆菌菌株

技术领域

[0001] 本发明是关于一种新颖的苏云金杆菌菌株,特别是关于一种具有 *ctylAb*、*cry1Ac*、*cry1D*、*cry1E* 基因片段的苏云金杆菌菌株,该菌株可用于拮抗鳞翅目的害虫。

背景技术

[0002] 随着人们对于生活质量的重视以及环保意识的兴起,目前以生物性杀虫剂取代传统农药来避免食物链的最终累积的趋势已成为主流,而且传统农药的使用已破坏生态系统平衡,并产生抗药性的问题,以致某些害虫发生猖獗,造成很大的防治困难及损失。其中,以苏云金杆菌为生物性杀虫剂中最广为应用,且使用简便又安全。

[0003] 苏云金杆菌(苏力菌,*Bacillus thuringiensis*)是一种昆虫病原细菌,为革兰氏阳性杆菌,在营养缺乏或环境不良的时候,苏云金杆菌会进入不分裂的半静止期,或是分化形成孢子和杀虫结晶蛋白,其结晶蛋白具有专一性,对特定的昆虫具有毒性,且毒性大小依昆虫的种类有所强弱,但对人类、鸟类、害虫的天敌、蜜蜂等均无害。因此,过去20年来科学家已分离出许多苏云金杆菌内的杀虫基因,并研制成重组基因产品,或是将杀虫基因直接注入植物体内而免去喷洒杀虫剂的动作等等。真正活化苏云金杆菌内孢子的是肠液的碱性环境,而非蛋白酶,肠道的高pH值不仅对苏云金杆菌结晶的溶解、消化很重要,且对毒性表现相当重要。

[0004] 苏云金杆菌的内毒素基因位于质体上,因此很容易进行转殖基因工程。早期的内毒素重组基因大多限制于单一基因片段的转殖。最近则利用多重内毒素基因或是差异性很大的基因,甚至是嵌合(chimeric)基因,以增强杀虫效果、扩大杀虫范围。

[0005] 各类苏云金杆菌毒蛋白间的类源关系,因其内含质体核酸序列的变异所产生的杀虫结晶蛋白不同,杀虫对象亦互异,主要分成六大类(Hoffe and Whiteley, 1989; Gill et al., 1992; Gleave et al., 1993; Lereclus et al., 1993; Shinet al., 1995; Kostichka et al., 1996),其中:Cry1类对鳞翅目有毒杀虫效果;Cry2类对鳞翅目及双翅目或只对双翅目有效;Cry3类只对鞘翅目有效;Cry4只对双翅目有效;Cry5不产生结晶,部分可杀鳞翅目和鞘翅目,部分则否;CytA则是无特定杀虫作用范围,但会产生细胞溶解和溶血的效果(cytolytic and hemolytic efficiency);其中以Cry1所编码(encode)的氨基酸最多,而CytA最少。

[0006] 中国台湾专利号385229揭露了一种新颖的生物杀虫组合物,其包含:一种由杀虫细菌与病毒,如苏云金杆菌结晶蛋白质或孢子或相关混合物,和核多角体病毒,从中挑选而得的活性杀虫成份;一种聚合物;及一种无机光线阻碍剂。此发明亦包含生物杀虫组合物的方法和控制昆虫的方法;中国台湾专利号385229专利与本发明的差异在于本发明的新颖苏云金杆菌菌株是利用基因片段产生的内毒素拮抗害虫,并非以结晶蛋白或孢子或相关混合物控制害虫。

[0007] 美国专利号6500617揭露了一种非天然获得抗虫基因的方法,此方法以DNA重组的方式建立重组基因库,并纯化重组抗虫基因的有效多肽,其中此对昆虫有毒性的多肽为

苏云金杆菌的 δ -内毒素;美国专利号 6500617 专利与本发明的差异在于,本发明的新颖苏云金杆菌菌株是以天然方式获得该抗虫基因片段,而非以 DNA 重组的方式获得。

[0008] 美国专利号 6177615 揭露了一种新颖合成的苏云金杆菌核酸片段,该核酸片段可以转译出 δ -内毒素,具有拮抗鳞翅目昆虫的杀虫活性,此发明也揭露此序列可转译成结晶蛋白;美国专利号 6177615 专利与本发明的差异在于,本发明的新颖苏云金杆菌菌株所含的抗虫基因片段并非合成,而是本身即具有该基因片段,经由筛选获得该新颖菌株并使用。

[0009] 美国专利号 5994266 揭示了一种杀虫组合物,其杀虫成分为 δ -内毒素或可引发杀虫活性的片段,且该 δ -内毒素或可引发杀虫活性的片段选自 cry IA, cry IB, cry IC, cry ID, cryIIA, cry IIB, cry IC, cryIIIA, cryIIIB, cryIIIC, cryIVA, cryIVB, cryIVC, cryIVD, cryV 及 cryVI,美国专利号 5994266 专利与本发明的差异在于,本发明的新颖苏云金杆菌菌株所含的抗虫基因片段并非经人工方式获得,而是本身即具有该基因片段,经由筛选得到该新颖菌株并用于拮抗昆虫。

[0010] 由上述文献可知苏云金杆菌的内毒素基因产物具拮抗昆虫效果,故目前科学家大多以遗传工程的方式筛选或合成具多种抗虫活性基因的片段。本发明的新颖苏云金杆菌菌株,为一天然菌株,具 cry1Ab、cry1Ac、cry1D、cry1E,经筛选后获得该菌株,并非由人为进行遗传工程合成,仅利用不同基因片段的引物对 (primer) 进行筛选及确认,得到具有多种抗虫活性基因片段的新颖苏云金杆菌。

发明内容

[0011] 本发明的第一目的在于提供一种苏云金杆菌菌株,应用于生物性控制虫害的技术领域,利用一 PCR 筛选方式鉴定出含 cry1Ab、cry1Ac、cry1D、cry1E 基因的菌株 (strain),该苏云金杆菌菌株可有效拮抗害虫的侵袭。

[0012] 本发明的第二目的在于提供一种苏云金杆菌菌株,应用于生物性控制虫害的技术领域,可制成一种用于控制害虫的组合物,该组合物为一可接受的载体及一杀虫有效剂量的 δ -内毒素,对受害虫侵袭的区域或预防害虫寄生的区域施加一有效剂量的该组合物,可有效防治害虫的生长,进而提升作物的产能。

[0013] 本发明的第三目的在于提供一种苏云金杆菌菌株,应用于生物性防治虫害的技术领域,利用苏云金杆菌菌株和 / 或其内毒素控制害虫的方法,所防治的害虫包含夜蛾科、螟蛾科或菜蛾科。

[0014] 本发明首先提供了一种拮抗害虫的苏云金杆菌菌株,该苏云金杆菌菌株具有 cry1Ab、cry1Ac、cry1D 和 cry1E 基因片段。

[0015] 根据上述方案,所述苏云金杆菌菌株进一步含有 cry2A 基因片段。

[0016] 本发明还提供了一种用于控制害虫的组合物,该组合物包括可接受的载体及杀虫有效剂量的 δ -内毒素,所述内毒素得自具有 cry1Ab、cry1Ac、cry1D 和 cry1E 基因片段的苏云金杆菌菌株。

[0017] 根据上述方案,其中所述苏云金杆菌菌株,进一步含有 cry2A 基因片段。

[0018] 本发明还提供了一种控制害虫的方法,该方法包括:

[0019] 对受害虫侵袭的区域或预防害虫寄生的区域施加有效剂量的苏云金杆菌菌株和 /

或其内毒素的组合物,其特征在于所述苏云金杆菌菌株为具有 cry1Ab、cry1Ac、cry1D 和 cry1E 基因片段的苏云金杆菌菌株。

[0020] 根据上述方案,其中所述苏云金杆菌菌株进一步含有 cry2A 基因片段。

[0021] 根据上述方案,其中所述苏云金杆菌菌株的内毒素为 δ -内毒素。

[0022] 本发明还提供了一种利用苏云金杆菌菌株和/或其内毒素防治害虫的方法,该方法包括:

[0023] 对受害虫侵袭的区域或预防害虫寄生的区域施加有效剂量的所述苏云金杆菌菌株和/或其内毒素的组合物,其特征在于所述苏云金杆菌菌株为具有 cry1Ab、cry1Ac、cry1D、cry1E 基因片段的苏云金杆菌菌株。

[0024] 根据上述方案,其中所述苏云金杆菌菌株进一步含有 cry2A 基因片段。

[0025] 根据上述方案,其中所述苏云金杆菌菌株可用于控制害虫。

[0026] 根据上述方案,其中所述害虫选自夜蛾科、螟蛾科或菜蛾科所组成群组的其中之一。

[0027] 根据上述方案,其中所述夜蛾科选自玉米穗虫或拟尺蠖的族群。

[0028] 根据上述方案,其中所述螟蛾科选自豆荚螟、大菜螟或粉斑螟蛾的族群。

[0029] 根据上述方案,其中所述菜蛾科选自小菜蛾的族群。

[0030] 根据上述方案,其中所述苏云金杆菌菌株的内毒素为 δ -内毒素。

[0031] 本发明还提供了一种经分离的苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 菌株 F201 及其代谢物。所述的苏云金杆菌菌株 F201 已经于 2009 年 7 月 10 日保藏在德国微生物和细胞培养物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ) (德国微生物和细胞培养物保藏中心地址: Inhoffenstr. 7B D-38124 Braunschweig), 取得的保藏编号为 DSM 22750。本发明所述的苏云金杆菌菌株 F201 亦称为苏云金杆菌 DSM22750。

附图说明

[0032] 图 1 为本发明的苏云金杆菌菌株 (F201) 以 PCR 扩增的 cry1 基因产物的电泳分析图;

[0033] 图 2 为本发明的苏云金杆菌菌株 (F201) 以 PCR 扩增的 cry2 基因产物的电泳分析图。

[0034] 用于专利程序的微生物保存:

[0035] 保藏日期: 2009 年 7 月 10 日;

[0036] 保藏单位: 德国微生物和细胞培养物保藏中心 (DSMZ);

[0037] 保藏编号: DSM 22750;

[0038] 分类命名: 苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)。

[0039] 为了易于说明, 本发明藉由下述的较佳实施例并配合附图而得到充分了解, 并使得熟悉本领域的技术人员可以据以完成本发明, 然本发明的实施型态并不限制于下列实施例中。

具体实施方式

[0040] 本发明提供一种新颖的苏云金杆菌菌株,该苏云金杆菌菌株能够抑制害虫的生长。以下为该苏云金杆菌菌株的来源、纯化与分离方式、鉴定方式以及拮抗标的害虫的效果的详细说明。

[0041] 菌种采集

[0042] 根据 Smith and Couche(1991) 的方法,选择座落于非农业区的中国台湾台北市 - 行政院农业委员会林业试验所台北植物园,以采集不同科、不同种的植物,每棵植物选取距离地面 3m 以上的分枝,以大型封口袋带携回,并保存于 4℃ 备用。

[0043] 菌种分离与鉴定

[0044] 携回植物分枝,处理前先阴干,每一分枝取 3 叶片,以灭菌过的不锈钢圆柱模型(直径 4.4cm),在一叶片上截取固定叶面积(30cm²)一片,正反面总计叶面积 120cm²/样品(sample)为量,用灭菌棉花棒沾 TritonX-100(Amresco) 稀释液(50ppm)6ml 刷洗叶面及叶背,收集洗叶水,进行离心(15,000xg,6 分钟),收集沉淀物以 0.5ml 无菌水再次悬浮(Smith and Couche,1991)。

[0045] 依据 Akiba and Katoh(1986), Travers et al. (1987), Chak and Yang(1990), Chilcott and Wigley(1993) 等四种方法进行分离。经热处理过的洗叶悬浮液,涂于 NA(nutrient agar) 平板培养基上,28℃ 培养五天,挑单一菌落,在位相差光学显微镜下,以 1,000 倍油镜进行观察,并选取含结晶及孢子的菌株,分别编号保存于 4℃ (Kao et al., 1996)。

[0046] 菌种培养

[0047] 各菌株分别以无菌水悬浮稀释,在 NA 平板培养基以划线法,再纯化 3 次并确认,挑单一菌落,分别移到 5ml LB 液体培养基(Luria-Bertani Medium:bacto-tryptone 1%, bacto-yeast extract 0.5%, NaCl 1%, pH 7.0),于恒温振荡培养箱(28℃,250rpm)隔夜培养,再取 0.5ml 继代培养 5ml 同条件 3 小时。

[0048] 菌种鉴定

[0049] 对继代培养后的菌株进行分析,挑选一菌株命名为 F201(即本发明的苏云金杆菌 DSM 22750),进行菌种型态分析与后续实验。

[0050] DNA 聚合酶链连锁反应(PCR)与载体选殖

[0051] 本发明参照 Kalman et al. (1993) 所发表的各个内毒素特异性的核苷酸引物(如下所示)的组合来确认本发明的 F201 苏云金杆菌中的内毒素基因型态。

[0052] (1)cry1Ab 基因片段的扩增

[0053] 以 cry1 专一性序列作为反向引物(SEQ ID NO. 1)以及以 cry1Ab 专一性序列作为正向引物(SEQ ID NO. 2)进行 PCR 扩增反应来确认是否有 cry1Ab 基因片段的的存在。

[0054] (2)cry1Ac 基因片段的扩增

[0055] 以 cry1 专一性序列作为反向引物(SEQ ID NO. 3)以及以 cry1Ac 专一性序列作为正向引物(SEQ ID NO. 4)进行 PCR 扩增反应来确认是否有 cry1Ac 基因片段的的存在。

[0056] (3)cry1D 基因片段的扩增

[0057] 以 cry1 专一性序列作为反向引物(SEQ ID NO. 3)以及以 cry1D 专一性序列作为正向引物(SEQ ID NO. 5)进行 PCR 扩增反应来确认是否有 cry1D 基因片段的的存在。

[0058] (4)cry1E 基因片段的扩增

[0059] 以 cry1 专一性序列作为反向引物 (SEQ ID NO. 3) 以及以 cry1E 专一性序列作为正向引物 (SEQ ID NO. 6) 进行 PCR 扩增反应来确认是否有 cry1E 基因片段的存在。

[0060] (5) cry2A 基因片段的扩增

[0061] 以 cry IIA2 专一性序列作为反向引物 (SEQ ID NO. 7) 以及以 cry IIA1 专一性序列作为正向引物 (SEQ ID NO. 8) 进行 PCR 扩增反应来确认是否有 cry2A 基因片段的存在。

[0062] F201 苏云金杆菌的内毒素基因组合

[0063] 请参阅图 1, 其为利用上述 SEQ ID NO. 1 ~ 6 引物对进行 PCR 的筛选结果。根据 Kalman et al. (1993), 已知 cry1Ab 基因片段长度为 238bp、cry1Ac 基因片段长度为 487bp、cry1D 基因片段长度为 414bp、cry1E 基因片段长度为 883bp。因此, 根据图 1 所示的片段长度可以得知本发明 F201 苏云金杆菌具有 cry1Ab、cry1Ac、cry1D、cry1E 的内毒素多重基因片段。

[0064] 请参阅图 2, 其为利用上述 SEQ ID NO. 7 和 SEQ ID NO. 8 引物对进行 PCR 的筛选结果。根据 Kalman et al. (1995), 已知 cry2A 基因片段长度为 569bp。因此, 根据图 2 所示的片段长度可以得知本发明 F201 苏云金杆菌进一步具有 cry2A 的内毒素基因片段。

[0065] F201 苏云金杆菌拮抗标的害虫的活性

[0066] 本发明更进一步提供一种具有杀虫作用的组合物, 其中该组合物包含有效剂量的 F201 苏云金杆菌菌株的培养物以及其可接受的载体。并且, 该培养物中包含有内毒素。采用有效生产杀虫内毒素的标准培养方法及发酵方式 (Yamamoto, 1990) 培养本发明的 F201 苏云金杆菌菌株或其变异株 (Yamamoto, T. 1990. Identification of entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* by high-performance liquid chromatography. Pp. 46-60. In "Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*". L. A. Hickie, and W. L. Fitch Eds. American Chemical Society, Washington, D. C.)。再取发酵后的培养沉淀物, 依发酵后的培养沉淀物中总蛋白在混拌后饲料中的质量含量 (ppm) 的不同, 进行试验以确认其拮抗标的害虫的效果。

[0067] 实施例部分, 共有三科, 分别为夜蛾科、螟蛾科及菜蛾科, 此类昆虫是蔬菜、豆科作物、纤维作物等的害虫, 会造成作物开花受影响、无法结穗等伤害, 使得农民收成受到极大的损失。以下针对此三科昆虫, 分别测试 F201 对其拮抗的效果; 对照组则使用市售 Valent BioScience 公司的见达利 (Xentari) 作为比较, 分别测试昆虫幼虫的死亡率, 以下表 1 为 F201 试验昆虫的科别总表; 表 2 为各科供试昆虫进行试验的数据总表。

[0068] 表 1 F201 试验昆虫分科

[0069]

夜蛾科	螟蛾科	菜蛾科
玉米穗虫 拟尺蠖	豆荚螟 粉班螟蛾 大菜螟	小菜蛾

[0070] 表 2 苏云金杆菌 F201 与市售苏云金杆菌菌株生物活性比较

[0071]

样品及条件	玉米穗虫	拟尺蠖	豆荚螟	大菜螟	粉斑螟蛾	小菜蛾
虫龄	L2	L2	L3	L3	L3	L3
试验浓度 (ppm)	500	12.5	100	50	100	2.5
处理时间 (hr)	120	72	72	120	336	48
实验组死亡率 (%)	80.0	100	100	100	62.5	96.7
对照组死亡率 (%)	40.0	6.7	75.0	85.7	54.9	85.0

[0072] 对照组使用 Xentari 处理

[0073] 其中夜蛾科包含玉米穗虫以及拟尺蠖。

[0074] 表 3 夜蛾科昆虫使用 F201 处理结果

[0075]

样品及条件	玉米穗虫	拟尺蠖
虫龄	L2	L2
试验浓度 (ppm)	500	12.5
处理时间 (hr)	120	72
实验组死亡率 (%)	80.0	100
对照组死亡率 (%)	40.0	6.7

[0076] 对照组使用 Xentari 处理

[0077] 实施例一:玉米穗虫 (*Helicoverpa armigera*)

[0078] 大量发酵 F201 苏云金杆菌后,取 5 升的发酵培养物进行顺序稀释后,将不同稀释浓度的发酵培养物以饲料混拌法,测试处理玉米穗虫第二龄初幼虫连续 120 小时后的生物活性(每组实验的供试虫数为 30 只,不更换饲料连续观察),纪录以苏云金杆菌处理前后的死亡虫数后,计算幼虫死亡率。

[0079] 请参阅表 4,其为 F201 苏云金杆菌对于玉米穗虫的死亡率测试数据。由此结果可以得知 F201 苏云金杆菌在处理浓度为 500ppm 时,较 Xentari(对照组)的致死率高大约两倍,且死亡率高达 80%,具有对害虫致死的效果。

[0080] 表 4 F201 苏云金杆菌发酵培养物抗玉米穗虫的活性数据

[0081]

样品	处理 F201	对照组	控制组
试验虫数(只)	30	30	30

处理浓度 (ppm)	500	500	H ₂ O
处理时间 (hr)	120	120	120
死亡率 (%)	80.0	40.0	0

[0082] 对照组使用 Xentari 处理

[0083] 实施例二:拟尺蠖 (*Trichoplusia ni*)

[0084] 试验处理方式同实施例一。将稀释浓度后的发酵培养物以饲料混拌法测试处理拟尺蠖第二龄初幼虫连续 72 小时 (每组实验的供试虫数为 50 只, 48 小时后, 更换无处理人工饲料), 纪录以苏云金杆菌处理前后的死亡虫数后, 计算幼虫死亡率。

[0085] 请参阅表 5, 其为 F201 苏云金杆菌对于拟尺蠖的死亡率测试数据。由此结果可以得知 F201 苏云金杆菌在处理浓度仅 12.5ppm 的情况下, 对于拟尺蠖即具有 100% 的杀虫效率, 比起 Xentari 的 6.7% 更是高出许多, 证实其确具有对害虫致死的效果。

[0086] 表 5 F201 苏云金杆菌发酵培养物抗拟尺蠖的活性数据

[0087]

样品	处理 F201	对照组	控制组
试验虫数 (只)	50	50	50
处理浓度 (ppm)	12.5	12.5	H ₂ O
处理时间 (hr)	72	72	72
死亡率 (%)	100	6.7	0

[0088] 对照组使用 Xentari 处理

[0089] 其中螟蛾科包含豆荚螟、粉斑螟蛾及大菜螟。

[0090] 表 6 螟蛾科昆虫使用 F201 处理结果

[0091]

样品及条件	豆荚螟	大菜螟	粉斑螟蛾
虫龄	L3	L3	L3
试验浓度 (ppm)	100	50	100
处理时间 (hr)	72	120	336
实验组死亡率 (%)	100	100	62.5
对照组死亡率 (%)	75.0	85.7	54.9

[0092] 对照组使用 Xentari 处理

[0093] 实施例三:豆荚螟 (*Maruca vitrata*)

[0094] 试验处理方式同实施例一。将不同稀释浓度的发酵培养物以饲料混拌法测试处理豆荚螟第三龄初幼虫处理 72 小时（每组实验的供试虫数为 24 只，不更换饲料连续观察），纪录 72 小时幼虫死亡率。

[0095] 参阅表 7，其为 F201 苏云金杆菌对于豆荚螟的死亡率测试数据。由此结果可以得知，在处理浓度为 100ppm 的时候，F201 苏云金杆菌较市售的 Xentari 对于豆荚螟，具有较高的致死率，且 F201 的杀虫效果可达 100%，确实具有对害虫致死效果。

[0096] 表 7 F201 苏云金杆菌发酵培养物抗豆荚螟的活性数据

[0097]

样品	处理 F201	对照组	控制组
试验虫数（只）	24	24	24
处理浓度（ppm）	100	100	H ₂ O
处理时间（hr）	72	72	72
死亡率（%）	100	75.0	0

[0098] 对照组使用 Xentari 处理

[0099] 实施例四：大菜螟 (*Crocidalomia binotalis*)

[0100] 试验处理方式同实施例一。将不同稀释浓度的发酵培养物以饲料混拌法测试大菜螟的第三龄初幼虫连续 120 小时（每个浓度 30 只幼虫，不更换饲料连续观察），纪录其 120 小时死亡虫数的情况。

[0101] 参阅表 8，其为 F201 苏云金杆菌对于大菜螟的死亡率测试数据。由此结果可以得知在处理浓度为 50ppm 时，F201 苏云金杆菌有较 Xentati 高的致死率，且达 100% 杀虫效果，确实具有对害虫致死效果。

[0102] 表 8 F201 苏云金杆菌发酵培养物对于抗大菜螟的活性数据

[0103]

样品	处理 F201	对照组	控制组
试验虫数（只）	30	28	30
处理浓度（ppm）	50	50	H ₂ O
处理时间（hr）	120	120	120
死亡率（%）	100	85.7	0

[0104] 对照组使用 Xentari 处理

[0105] 实施例五：粉斑螟蛾 (*Ephestia cautella* Walker)

[0106] 试验处理方式同实施例一。将不同稀释浓度的发酵培养物以饲料混拌法分别测试处理粉斑螟蛾第三龄初幼虫连续 336 小时（每个浓度 30 只幼虫，不更换饲料连续观察），纪录死亡虫数的情况后，计算幼虫死亡率。

[0107] 参阅表 9, 其为 F201 苏云金杆菌对于粉斑螟蛾的死亡率测试数据。由此结果可以得知 F201 苏云金杆菌相较于 Xentari, 确实具有较佳的害虫致死效果。

[0108] 表 9 F201 苏云金杆菌发酵培养物对于抗粉斑螟蛾的活性数据

[0109]

样品	处理 F201	对照组	控制组
试验虫数 (只)	30	30	30
处理浓度 (ppm)	100	100	H ₂ O
处理时间 (hr)	336	336	336
死亡率 (%)	62.5	54.9	0

[0110] 对照组使用 Xentari 处理

[0111] 其中菜蛾科包含小菜蛾。

[0112] 表 10 菜蛾科昆虫使用 F201 处理结果

[0113]

样品及条件	小菜蛾
虫龄	L3
试验浓度 (ppm)	2.5
处理时间 (hr)	48
实验组死亡率 (%)	96.7
对照组死亡率 (%)	85.0

[0114] 对照组使用 Xentari 处理

[0115] 实施例六: 小菜蛾 (*Plutella xylostella*)

[0116] 试验处理方式同实施例一。将不同稀释浓度的发酵培养物以饲料混拌法分别测试处理小菜蛾第三龄初幼虫连续 48 小时 (每个浓度 30 只幼虫, 不更换饲料连续观察), 纪录其 48 小时后死亡虫数的情况后, 计算幼虫死亡率。

[0117] 参阅表 11, 其为 F201 苏云金杆菌对于小菜蛾的死亡率测试数据。由此结果可以得知在处理浓度仅 2.5ppm 时, F201 苏云金杆菌即具有 96.7% 的高致死率; 且相较于 Xentari, 也有较佳的害虫致死效果。

[0118] 表 11 F201 苏云金杆菌发酵培养物对于抗小菜蛾的活性数据

[0119]

样品	处理 F201	对照组	控制组
试验虫数 (只)	30	30	30

处理浓度 (ppm)	2.5	2.5	H ₂ O
处理时间 (hr)	48	48	48
死亡率 (%)	96.7	85.0	0

[0120] 对照组使用 Xentari 处理

[0121] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并非用来限定本发明的实施范围。故凡依本发明内容所述的形状、构造、特征及精神所作的均等变化或修饰,均应包括于本发明的保护范围内。

[0122] 参考文献

[0123] 1. Akiba, Y., and K. Katoh. 1986. Microbial ecology of *Bacillus thuringiensis* V. Selective medium for *Bacillus thuringiensis* vegetative cells. *Appl. Entomol. Zool.* 21 :210-215.

[0124] 2. Chak, K. F., and Y. M. Yang. 1990. Characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Taiwan. *Proc. Natl. Sci. Council. B. ROC* 14 :175-182.

[0125] 3. Chilcott, C. N., and P. J. Wigley. 1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *J. Invertebr. Pathol.* 61 :244-247

[0126] 4. Gill, S. S., E. A. Cowles, and P. V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37 :615-636.

[0127] 5. Gleave A. P., R. Williams, and R. J. Hedges. 1993. Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of cry V-like insecticidal protein genes and characterization of a cry V gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 :1683-1687.

[0128] 6. Höfte, H., and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53 :242-255.

[0129] 7. Kalman, S., K. L. Kiehne, N. Cooper, M. S. Reynoso, and T. Yamamoto. 1995. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 :3063-3068.

[0130] 8. Kalman, S., K. L. Kiehne, J. L. Libs, and T. Yamamoto. 1993. Cloning of a novel cry IC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 :1131-1137.

[0131] 9. Kao, S. S., C. C. Tzeng, S. J. Tuan, and Y. S. Tsai. 1996. Isolation, characterization and cry gene typing of *Bacillus thuringiensis* isolates from stored product material samples collected around Taiwan, pp132-151. *Proceedings, The Second Pacific Rim Conference on Biotechnology of Bacillus*

thuringiensis and its Impact to the Environment. November 4-8, 1996. Chiang Mai, Thailand.

[0132] 10. Kostichka, K., G. W. Warren, M. Mullins, A. D. Mullins, J. A. Craig, M. G. Koziel, and J. J. Estruch. 1996. Cloning of a cryV-type insecticidal proteingene from *Bacillus thuringiensis*: the cryV-encoded protein is expressed early in stationary phase. *J. Bacteriol.* 178 :2141-2144.

[0133] 11. Lereclus, D., A. Delecluse, and M-M. Lecadet. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. pp. 37-69 In " *Bacillus thuringiensis*, An Enviromental Biopesticide: Theory and Practice " P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey and S. Higgs. Eds. John Wiley & Sons Ltd. Press, England.

[0134] 12. Shin, B. S., S. H. Park, S. K. Choi, B. T. Koo, S. T. Lee, and J. I. Kim. 1995. Distribution of cryV-type insecticidal protein genes in *Bacillus thuringiensis* and cloning of cryV-type genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 :2402-2407.

[0135] 13. Smith, R. A., and G. A. Couche. 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 :311-315.

[0136] 14. Travers, R. S., P. A. W. Martin, and C. F. Reichelderfer. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 :1263-1266.

[0137] 序列表

[0138] <110> 行政院农业委员会农业药物毒物试验所

[0139] <120> 一种拮抗害虫的新颖苏云金杆菌菌株

[0140] <130> GAI09TW1966C

[0141] <160> 8

[0142] <170> Patent In version 3.5

[0143] <210> 1

[0144] <211> 29

[0145] <212> DNA

[0146] <213> 人工序列

[0147] <220>

[0148] <223> cry1Ab 基因的专一性序列 (反向引物)

[0149] <400> 1

[0150] ggtcgtggct atatccttcg tgtcacagc

29

[0151] <210> 2

[0152] <211> 23

[0153] <212> DNA

[0154] <213> 人工序列

[0155] <220>

- [0156] <223>cry1Ab 基因的专一性序列 (正向引物)
 [0157] <400>2
 [0158] gaattgcttt cataggctcc gtc
 [0159] <210>3 23
 [0160] <211>33
 [0161] <212>DNA
 [0162] <213>人工序列
 [0163] <220>
 [0164] <223>cry1 基因的专一性序列 (反向引物)
 [0165] <400>3
 [0166] atcactgagt cgcttcgcat gtttgacttt ctc
 [0167] <210>4 33
 [0168] <211>22
 [0169] <212>DNA
 [0170] <213>人工序列
 [0171] <220>
 [0172] <223>cry1Ac 基因的专一性序列 (正向引物)
 [0173] <400>4
 [0174] tcacttccca tcgacatcta cc
 [0175] <210>5 22
 [0176] <211>25
 [0177] <212>DNA
 [0178] <213>人工序列
 [0179] <220>
 [0180] <223>cry1D 基因的专一性序列 (正向引物)
 [0181] <400>5
 [0182] ggtacattta gatattcaca gccac
 [0183] <210>6 25
 [0184] <211>22
 [0185] <212>DNA
 [0186] <213>人工序列
 [0187] <220>
 [0188] <223>cry1E 基因的专一性序列 (正向引物)
 [0189] <400>6
 [0190] cttaggata aatgtagtac ag
 [0191] <210>7 22
 [0192] <211>18
 [0193] <212>DNA
 [0194] <213>人工序列

[0195]	<220>	
[0196]	<223>cry2A 基因的专一性序列 (反向引物)	
[0197]	<400>7	
[0198]	aattcccat tcactgtc	18
[0199]	<210>8	
[0200]	<211>24	
[0201]	<212>DNA	
[0202]	<213>人工序列	
[0203]	<220>	
[0204]	<223>cry2A 基因的专一性序列 (正向引物)	
[0205]	<400>8	
[0206]	actattgtg atgcgtataa tgta	24