



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110214178 A

(43)申请公布日 2019.09.06

(21)申请号 201680020188.3

(22)申请日 2016.02.02

(30)优先权数据

62/110,665 2015.02.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.09.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2016/050116 2016.02.02

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2016/125153 EN 2016.08.11

(83)生物保藏信息

CBS123047 2008.06.18

(71)申请人 以色列农业和乡村发展部农业研究
机构(农业研究中心)

地址 以色列贝特达干

(72)发明人 D·埃兹拉 O·利亚兹

Y·艾拉德 T·鲁斯基

S·布朗·米雅瑞 P·布茨基

A·杰姆莱尔 A·利切特

A·多姆布若夫斯基

(74)专利代理机构 余姚德盛专利代理事务所
(普通合伙) 33239

代理人 郑洪成

(51)Int.Cl.

C12N 1/14(2006.01)

C12P 7/16(2006.01)

C12P 7/00(2006.01)

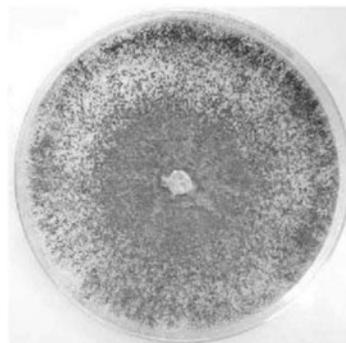
权利要求书2页 说明书39页
序列表2页 附图15页

(54)发明名称

轮层炭菌属或其衍生的挥发性有机化合物的用途

(57)摘要

提供杀灭植物病原菌或减少其生长的方法。该方法包括将植物病原菌暴露于有效量的组合物,所述组合物包含轮层炭菌属的生物学上纯的培养物或由生物学上纯的培养物产生的至少一种挥发性有机化合物(VOC),并且能够杀灭植物病原菌或减少其生长。



1. 一种杀灭植物病原菌或减少其生长的方法,该方法包括将植物病原菌暴露于有效量的组合物,所述组合物包含轮层炭菌属的生物学上纯的培养物或由生物学上纯的培养物产生的至少一种挥发性有机化合物(VOC),并且能够杀灭植物病原菌或减少其生长。

2. 一种降低由植物病原菌引起的植物或植物部分的总体损害的方法,该方法包括将植物或植物部分暴露于有效量的组合物,所述组合物包含轮层炭菌属的生物学上纯的培养物或由生物学上纯的培养物产生的至少一种挥发性有机化合物(VOC),并且能够杀灭植物病原菌或减少其生长,从而降低所述植物或植物部分的总体损害。

3. 权利要求2所述的方法,其中所述植物或植物部分是预收获的。

4. 一种存储植物或植物部分的方法,该方法包括将收获后植物或植物部分暴露于有效量的组合物,所述组合物包含轮层炭菌属的生物学上纯的培养物或由生物学上纯的培养物产生的至少一种挥发性有机化合物(VOC),并且能够杀灭植物病原菌或减少其生长,从而存储所述植物或植物部分。

5. 权利要求1所述的方法,其中所述暴露是通过浸渍、涂覆、浸渍、喷涂、蒸发、起雾、散射、喷涂和/或注射进行。

6. 一种制备挥发性有机化合物(VOC)的方法,该方法包括:

(a) 培养轮层炭菌属的生物学上纯的培养物;

(b) 并且收集由所述轮层炭菌属的菌株产生的挥发性成分。

7. 组合物,包含轮层炭菌属的纯的培养物和/或至少一种挥发性有机化合物(VOC)、和农业上可接受的载体,所述挥发性有机化合物选自:3-甲基-1-丁醇,2-甲基-1-丁醇,1-甲基-1,3-环己二烯,1-甲基-1,4-环己二烯,4-庚酮,乙酸异戊酯,4-庚炔-2-醇,顺式-2-辛烯醛,反式-2-辛烯醛,辛醛,4,4-二甲基-1,3-环戊二酮,2,2,5-三甲基环戊酮,苯乙醇, β -榄香烯,(+)- α -柏木萜烯, α -愈创木烯,2-(4-羟苯基)乙醇,萜烯, α -芹子烯, β -芹子烯, α -愈创木烯,大根香叶烯A,7-表- α -芹子烯,胡萝卜-4(11),8-二烯,藜芦酮,刺蕊草醇,3-甲氧基-2-萘酚及其混合物。

8. 组合物,包含轮层炭菌属的生物学上纯的培养物产生的多于一种挥发性有机化合物(VOC)。

9. 权利要求1所述的组合物或方法,其中所述VOC包括2-10种不同的VOC。

10. 权利要求1所述的组合物或方法,其中所述VOC包括2-8种不同的VOC。

11. 权利要求1所述的组合物或方法,其中所述VOC包括2-6种不同的VOC。

12. 权利要求1所述的组合物或方法,其中所述VOC包括2-4种不同的VOC。

13. 权利要求1所述的组合物或方法,其中所述VOC包括2-3种不同的VOC。

14. 权利要求8所述的组合物,还包含农业上可接受的载体。

15. 权利要求1所述的方法或组合物,其中所述VOC包括3-甲基-1-丁醇、(\pm)-2-甲基-1-丁醇、4-庚酮和乙酸异戊酯。

16. 权利要求15所述的方法或组合物,其中所述3-甲基-1-丁醇、(\pm)-2-甲基-1-丁醇、4-庚酮和乙酸异戊酯的比例为1:1:2:1。

17. 权利要求1所述的方法或组合物,其中所述VOC包括4-庚酮和反式-2-辛烯醛。

18. 权利要求17所述的方法或组合物,其中所述4-庚酮和反式-2-辛烯醛的比例为1:1。

19. 组合物,包含或由下列组成:4-庚酮和/或反式-2-辛烯醛、和农业上可接受的载体。

20. 权利要求7所述的组合物,还包含选自下列的试剂:肥料、抗生素、成熟抑制剂和发芽抑制剂。

21. 权利要求1所述的方法,其中所述VOC选自:3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丁醇、1-甲基-1,3-环己二烯、1-甲基-1,4-环己二烯、4-庚酮,乙酸异戊酯,4-庚炔-2-醇,顺式-2-辛烯醛,反式-2-辛烯醛,辛醛,4,4-二甲基-1,3-环戊二酮,2,2,5-三甲基环戊酮,苯乙醇, β -榄香烯,(+)- α -柏木萜烯, α -愈创木烯,2-(4-羟苯基)乙醇,萜烯, α -芹子烯, β -芹子烯, α -愈创木烯,大根香叶烯A,7-表- α -芹子烯,胡萝卜-4(11),8-二烯,藜芦酮,刺蕊草醇,3-甲氧基-2-萘酚及其混合物。

22. 权利要求1所述的方法,其中所述植物病原菌是微生物。

23. 权利要求1所述的方法,其中所述植物病原菌是昆虫或蚜虫。

24. 权利要求1所述的方法,其中所述植物病原菌是线虫。

25. 权利要求1所述的方法,其中所述植物病原菌不是线虫。

26. 权利要求25所述的方法,其中所述线虫是爪哇根结线虫。

27. 权利要求1所述的方法,其中所述植物病原菌是霉菌。

28. 权利要求1所述的方法,其中所述植物病原菌是真菌。

29. 权利要求1所述的方法,其中所述植物病原菌选自:终极腐霉菌,瓜果腐霉菌,烟草赤星病菌 pathotype tangelo,尖孢镰刀菌,*Fusarium euwallaceae*,*Fusarium mangiferae*,*Coniella* sp.,*Phoma tracheiphila*,*Colletotrichum* sp.,立枯丝核菌,烟草赤星病菌,灰葡萄孢菌,核盘菌,指状青霉菌,可可毛色二孢菌,*Neoscytalidium dimidiatum*和黑曲霉。

30. 权利要求24所述的方法,其中所述线虫是爪哇根结线虫。

31. 权利要求28所述的方法,其中所述真菌选自:*A.niger*,灰葡萄孢菌,烟草赤星病菌和指状青霉菌。

32. 权利要求23所述的方法,其中所述蚜虫选自:桃蚜、棉蚜、甘蓝蚜、*Aphis nerii*、烟粉虱和玉米蚜。

33. 权利要求4所述的方法,其中所述储存包括延缓萌芽。

34. 使用权利要求7所述的组合物涂覆的表面。

35. 药物或化妆品组合物,包含:由轮层炭菌属的生物学上纯的培养物产生的VOC、和一种或多种具有抗生素或抗微生物或发芽抑制活性的添加剂。

36. 权利要求35所述的组合物,其中所述添加剂选自:载体、着色剂、乳化剂、填料、胶凝剂、保湿剂、防腐剂、增溶剂、表面活性剂、增稠剂及其组合。

37. 权利要求35所述的药物或化妆品组合物,其用于局部或其他驱虫剂或化妆品制剂,其中添加选自载体、着色剂、乳化剂、填充剂、胶凝剂、保湿剂、防腐剂、增溶剂、表面活性剂、增稠剂及其组合的添加剂。

38. 权利要求35所述的药物或化妆品组合物,其作为引诱剂用于控制昆虫或害虫的侵袭,从而防止或减少温室环境中的有害生物繁殖。

39. 权利要求1所述的方法或组合物,其中所述轮层炭菌属包括黑轮层炭壳。

40. 权利要求1所述的方法或组合物,其中所述VOC是合成VOC。

41. 权利要求1所述的方法或组合物,其中所述VOC从所述轮层炭菌属的培养物纯化。

轮层炭菌属或由其衍生的挥发性有机化合物的用途

技术领域

[0001] 在一些实施方案中,本发明涉及轮层炭菌属或由其衍生的挥发性有机化合物的用途。

背景技术

[0002] 植物内生真菌是在植物组织中花费大部分生命周期的微生物,而不会在宿主植物中造成任何明显的损害或防御反应。已经发现许多从树上分离的内生真菌分泌从低分子量分子到复合糖蛋白的次级代谢物。次级代谢物的分泌可能有助于真菌在恶劣环境中生存。这些次生化合物可以帮助内生细胞与其他内生真菌竞争植物组织中的营养物和空间,并通过保护宿主免受病原体而同时受益。植物的内部不适合入侵者;在大多数情况下,植物通过激活防御系统(例如酚类化合物、氧化化合物、酶和其他物质)的分泌来反应入侵的微生物。

[0003] 内生真菌的一些物种已被确定为抗癌,抗糖尿病,杀虫和免疫抑制化合物的来源。内生真菌的药物用途的一个例子是从*Pestalotiopsis microspora*中分离出的抗癌药物pacolite(紫杉醇),*Pestalotiopsis microspora*是一种真菌,它们是喜马拉雅红豆杉属植物。

[0004] 美国专利7,267,975(下文'975专利)描述了一种新颖的内生真菌,其命名为*Muscodor vitigenus*,源自藤本植物*Paullinia paullinioides*。这种真菌在某些文化条件下产生了众所周知的化合物萘,用作昆虫或驱虫剂。

[0005] 美国专利7,341,862(下文'862专利)描述了另一种新颖的内生真菌*Muscodor albus*,其产生有效治疗人和动物废物的挥发性抗生素。862“专利表明,*Muscodor albus*可用于便携式厕所的一次性袋子,以解决在人类从卫生设施中移除的情况下废物的退化问题。862专利也描述了由*Muscodor albus*生产的并且类似地有效处理人和动物废物的非挥发性抑制剂。

[0006] 全球农业,特别是西方世界对天然药物有害虫控制的需求不断增加。根据“975专利”,萘衍生自天然真菌。然而,暴露于大量的这种化合物可能会损害红细胞,一种称为溶血性贫血的病症。国际癌症研究机构将萘分类为对人类和动物可能致癌[2B组],说明在怀孕后口服吸入,接触或孕产妇接触后,儿童和婴儿溶血性贫血。

[0007] 在大多数情况下,用于有害生物控制的常规乳液,含有有毒农药或杀虫剂的制备和处理可能对非熟练人员有害。此外,一些农药含有活性成分,已被证明在急性和慢性毒性研究中作为激素破坏剂,可能导致生育力丧失、致癌作用和诱变。

[0008] 农药在大多数经济作物上的广泛应用导致世界各地生态系统、含水层和水系环境中存在有害农药。

[0009] 受到相对较少关注的一个特殊方面是化学暴露对人类繁殖力(繁殖能力)的可能影响。特别是,已知食品如蔬菜和水果被合成的内分泌干扰物污染,但食物暴露于污染物的程度及其对男性和女性繁殖力的影响是未知的。

[0010] 因此,在本领域中对于用于生物学控制的独特的天然生物活性化合物是不断需要

的。本发明提供了这样的起源于内生真菌的化合物,其可以使用而没有涉及癌症可疑化合物如萘或其它有毒农药或杀虫剂的风险。

[0011] 其他背景技术包括:

[0012] 美国专利No.7,754,203、8,728,462。

[0013] 发明概述

[0014] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供一种杀灭植物病原菌或减少其生长的方法,该方法包括将植物病原菌暴露于有效量的组合物,组合物包含轮层炭菌属(*Daldinia* sp.)的生物学上纯的培养物或由生物学上纯的培养物产生的至少一种挥发性有机化合物(VOC),并且能够杀灭植物病原菌或减少其生长。

[0015] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供一种降低由植物病原菌引起的植物或植物部分的总体损害的方法,该方法包括将植物或植物部分暴露于有效量的组合物,包含轮层炭菌属的生物学上纯的培养物或由生物学上纯的培养物产生的至少一种挥发性有机化合物(VOC),并且能够杀灭植物病原菌或减少其生长,从而降低所述植物或植物部分的总体损害。

[0016] 根据本发明的一些实施方案,植物或植物部分是预收获的。

[0017] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供一种存储植物或植物部分的方法,该方法包括将收获后植物或植物部分暴露于有效量的组合物,包含轮层炭菌属的生物学上纯的培养物或由生物学上纯的培养物产生的至少一种挥发性有机化合物(VOC),并且能够杀灭植物病原菌或减少其生长,从而存储所述植物或植物部分。

[0018] 根据本发明的一些实施方案,暴露是通过浸渍、涂覆、浸渍、喷涂、蒸发、起雾、散射、喷涂和/或注射进行。

[0019] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供一种制备挥发性有机化合物(VOC)的方法,该方法包括:

[0020] (a) 培养轮层炭菌属的生物学上纯的培养物;

[0021] (b) 以及收集由轮层炭菌属的菌株产生的挥发性成分。

[0022] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供组合物,包含:轮层炭菌属的纯的培养物和/或选自下列的至少一种挥发性有机化合物(VOC):3-甲基-1-丁醇,2-甲基-1-丁醇,1-甲基-1,3-环己二烯,1-甲基-1,4-环己二烯,4-庚酮,乙酸异戊酯,4-庚炔-2-醇,顺式-2-辛烯醛,反式-2-辛烯醛,辛醛,4,4-二甲基-1,3-环戊二酮,2,2,5-三甲基环戊酮,苯乙醇, β -榄香烯,(+)- α -柏木萜烯, α -愈创木烯,2-(4-羟苯基)乙醇,萜烯, α -芹子烯, β -芹子烯, α -愈创木烯,大根香叶烯A,7-表- α -芹子烯,胡萝卜-4(11),8-二烯,藜芦酮,刺蕊草醇,3-甲氧基-2-萘酚及其混合物;以及农业上可接受的载体。

[0023] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供组合物,包含由轮层炭菌属的生物学上纯的培养物产生的多于一种挥发性有机化合物(VOC)。

[0024] 根据本发明的一些实施方案,VOC包括2-10种不同VOC。

[0025] 根据本发明的一些实施方案,VOC包括2-8种不同VOC。

[0026] 根据本发明的一些实施方案,VOC包括2-6种不同VOC。

[0027] 根据本发明的一些实施方案,VOC包括2-4种不同VOC。

[0028] 根据本发明的一些实施方案,VOC包括2-3种不同VOC。

- [0029] 根据本发明的一些实施方案,组合物还包含农业上可接受的载体。
- [0030] 根据本发明的一些实施方案,VOC包括3-甲基-1-丁醇、(±)-2-甲基-1-丁醇、4-庚酮和乙酸异戊酯。
- [0031] 根据本发明的一些实施方案,3-甲基-1-丁醇、(±)-2-甲基-1-丁醇、4-庚酮和乙酸异戊酯的比例为1:1:2:1。
- [0032] 根据本发明的一些实施方案,VOC包括4-庚酮和反式-2-辛烯醛。
- [0033] 根据本发明的一些实施方案,4-庚酮和反式-2-辛烯醛的比例为1:1。
- [0034] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供组合物,包含或由下列组成:4-庚酮和/或反式-2-辛烯醛;和农业上可接受的载体。
- [0035] 根据本发明的一些实施方案,组合物还包含试剂,选自:肥料、抗生素、成熟抑制剂和发芽抑制剂。
- [0036] 根据本发明的一些实施方案,VOC选自:3-甲基-1-丁醇,2-甲基-1-丁醇,1-甲基-1,3-环己二烯,1-甲基-1,4-环己二烯,4-庚酮,乙酸异戊酯,4-庚炔-2-醇,顺式-2-辛烯醛,反式-2-辛烯醛,辛醛,4,4-二甲基-1,3-环戊二酮,2,2,5-三甲基环戊酮,苯乙醇,β-榄香烯,(+)-α-柏木萜烯,α-愈创木烯,2-(4-羟苯基)乙醇,萜烯,α-芹子烯,β-芹子烯,α-愈创木烯,大根香叶烯A,7-表-α-芹子烯,胡萝卜-4(11),8-二烯,藜芦酮,刺蕊草醇,3-甲氧基-2-萘酚及其混合物。
- [0037] 根据本发明的一些实施方案,植物病原菌是微生物。
- [0038] 根据本发明的一些实施方案,植物病原菌是昆虫或蚜虫。
- [0039] 根据本发明的一些实施方案,植物病原菌是线虫。
- [0040] 根据本发明的一些实施方案,植物病原菌不是线虫。
- [0041] 根据本发明的一些实施方案,线虫是爪哇根结线虫。
- [0042] 根据本发明的一些实施方案,植物病原菌是霉菌。
- [0043] 根据本发明的一些实施方案,植物病原菌是真菌。
- [0044] 根据本发明的一些实施方案,植物病原菌选自:终极腐霉菌,瓜果腐霉菌,烟草赤星病菌pathotype tangelo,尖孢镰刀菌,Fusarium euwallaceae,Fusarium mangiferae,Coniella sp.,Phoma tracheiphila,Colletotrichum sp.,立枯丝核菌,烟草赤星病菌,灰葡萄孢菌,核盘菌,指状青霉菌,可可毛色二孢菌,Neoscytalidium dimidiatum和黑曲霉。
- [0045] 根据本发明的一些实施方案,线虫是爪哇根结线虫。
- [0046] 根据本发明的一些实施方案,真菌选自:A.niger,灰葡萄孢菌,烟草赤星病菌和指状青霉菌。
- [0047] 根据本发明的一些实施方案,蚜虫选自:桃蚜,棉蚜,甘蓝蚜,Aphis nerii,烟粉虱和玉米蚜。
- [0048] 根据本发明的一些实施方案,储存包括延缓萌芽。
- [0049] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供使用组合物包覆的表面。
- [0050] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供药物或化妆品组合物,包含由轮层炭菌属的生物学上纯的培养物产生的VOC、和一种或多种具有抗生素或抗微生物或发芽抑制活性的添加剂。
- [0051] 根据本发明的一些实施方案,所述添加剂选自:载体、着色剂、乳化剂、填料、胶凝

剂、保湿剂、防腐剂、增溶剂、表面活性剂、增稠剂及其组合。

[0052] 根据本发明的一些实施方案,药物或化妆品组合物,其用于局部或其他驱虫剂或化妆品制剂,其中添加选自载体、着色剂、乳化剂、填充剂、胶凝剂、保湿剂、防腐剂、增溶剂、表面活性剂、增稠剂及其组合的添加剂。

[0053] 根据本发明的一些实施方案,药物或化妆品组合物,其作为引诱剂用于控制昆虫或害虫的侵袭,从而防止或减少温室环境中的有害生物繁殖。

[0054] 根据本发明的一些实施方案,轮层炭菌属包括黑轮层炭壳 (*D.concentrica*)。

[0055] 根据本发明的一些实施方案,VOC是合成VOC。

[0056] 根据本发明的一些实施方案,VOC从轮层炭菌属的培养物纯化。

[0057] 除非另有定义,本文使用的所有技术和/或科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管类似于或等同于本文所描述的方法和材料可以用于本发明的实施例的实践或测试中,但是下面描述示例性方法和/或材料。在发生冲突的情况下,专利说明书(包括定义)将受到控制。此外,材料、方法和实施例仅是说明性的,并不意图是限制性的。

[0058] 附图简述

[0059] 这里仅通过示例的方式参照附图来描述本发明的一些实施例。现在具体参考附图,应该强调的是,所示的细节是作为示例并且为了说明性地讨论本发明的实施例的目的。在这方面,使用附图进行的描述对于本领域技术人员来说是显而易见的,可以如何实施本发明的实施例。

[0060] 在附图中:

[0061] 图1说明了黑轮层炭壳在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养皿上的生长。

[0062] 图2示出了电子扫描显微镜下黑轮层炭壳菌丝(左)和孢子(右)的图片。

[0063] 图3显示了黑轮层炭壳抗菌活性的检测。

[0064] 图4说明了黑轮层炭壳发射的VOC的GC/MS色谱图,详见表2。

[0065] 图5A-C展示了黑轮层炭壳在干杏/葡萄干和李子腐病引起病原体的抗微生物活性的效果。

[0066] 图6A-C展示了黑轮层炭壳的抗微生物活性的效果,并用指状青霉菌接种在商业番茄酱上。

[0067] 图7A-C证明了黑轮层炭壳在接种黑曲霉的花生上的抗微生物活性的效果。

[0068] 图8A-D显示了黑轮层炭壳在指状青霉菌接种的桔子上的抗微生物活性的效果。

[0069] 图9显示了黑轮层炭壳的杀线虫活性对植物致病性线虫爪哇根结线虫的J2幼虫的生存力的影响。

[0070] 图10显示了“混合物4”的抗微生物活性对各种温度下植物致病性真菌生长的影响。

[0071] 图11显示了“混合物21”的抗微生物活性对各种温度下植物致病性真菌生长的影响。

[0072] 图12显示了“混合物4”和黑轮层炭壳的杀线虫活性对植物致病性线虫爪哇根结线虫的J2幼虫的生存力的影响。

[0073] 图13A-F显示“混合物4”的抗微生物活性的效果,用微曲霉和指状青霉菌接种的花

生上。

[0074] 图14A-B展示了“混合物4”的抗微生物活性对葡萄孢菌的接种有无疾病症状的影响。

[0075] 图15A-E展示了“混合物4”对小麦籽粒的抗微生物活性的影响。

[0076] 图16A-E展示了指数青霉菌接种的橙子上“混合物4”的抗微生物活性的效果。

[0077] 图17显示了“混合物21”对各种植物蚜虫的杀虫剂活性的影响。

[0078] 图18显示了黄瓜植物(*Cucumis sativus*)中“混合物21”的杀虫剂活性的效果。

[0079] 图19A-E显示了“混合物21”对马铃薯块茎的萌芽抑制活性的影响。

[0080] 图20A-D显示暴露于黑轮层的第二阶段青少年表型炭壳培养物,合成混合物和化合物4-庚酮。线虫在25°C下在黑暗中暴露于每种条件下48小时,然后才可视化。图20A。对照-未处理的线虫。图20B。线虫暴露于三个黑轮层炭壳培养物板(直径50毫米,5毫升生长培养基),预培养4天。线虫暴露于0.25mL/L的合成混合物中,预加载到125mg珍珠岩颗粒。图20D。线虫暴露于0.05mL/L的化合物4-庚酮预加载到25mg珍珠岩颗粒。棒表示500微米。。

[0081] 图21是表示黑轮层炭壳挥发物和合成混合物对爪哇木瓜卵的影响的图。将蛋(每次处理800次蛋10次重复)暴露于三只黑轮层炭壳培养物板(直径50mm,含有5mL生长培养基)或0.25mL/L预先加载到125mg珍珠岩上的混合物粒子。对于从暴露于挥发物中48小时的卵中孵出的可能的爪哇爪哇J2幼虫计数(平均±SE)。通过Tukey-Kramer多重比较检验分析,样品之间的不同字母表示样品之间的显著性差异($P \leq 0.05$,方差分析)。实验重复三次,得到类似的结果。

[0082] 图22是表示合成混合物在壤土中的活性的图。将线虫(每个杯中的500个J2幼虫的5次重复)混合到密封的50mL杯中的60g土壤中,在计数可行的J2幼虫(平均值±SE)之前暴露于浓度增加的混合物48小时。通过Tukey-Kramer多重比较检验分析,样品之间的不同字母表示样品之间的显著性差异($P \leq 0.05$,方差分析)。重复实验两次,得到相似的结果。

[0083] 图23A-C是合成混合物在温室实验中的影响图。用合成混合物预处理接种的土壤中种植了易感番茄幼苗。对照根-根据爪哇根系所接种的土壤(相当于每个盆中根系悬浮液中的4000个鸡蛋)。混合根-土壤接种由爪哇根结线所补充的合成混合物的根。对照J2-通过直接添加爪哇爪哇J2幼虫(每个锅中的4000J1幼虫)接种土壤。混合J2-通过直接加入爪哇属J2幼虫接种并补充合成混合物。加仑指数(平均5次重复)。通过Tukey-Kramer多重比较检验分析,样品之间的不同字母表示样品之间的显著性差异($P \leq 0.05$,方差分析)。图23B。每克根茎爪哇数(平均±SE)。Tukey-Kramer检验后,单因素方差分析($F < 0.0001$)有统计学意义。图23C。根重(平均±SE)。处理间无明显差异($p > 0.01$)。重复实验两次,得到相似的结果。

[0084] 发明详述

[0085] 在一些实施方案中,本发明涉及轮层炭菌属或其衍生的挥发性有机化合物的用途。

[0086] 在详细说明本发明的至少一个实施例之前,应当理解,本发明在其应用中不一定受到以下描述中阐述或由实施例举例说明的细节的限制。本发明能够以其他实施例或以各种方式实践或执行。

[0087] 不希望受任何特定理论的束缚,这里假定,由于内生真菌是典型的,内生真菌的建立不被认为是对植物的威胁,也不会引起任何可见的防御反应。

[0088] 本发明的发明人在将本发明减少到实践的同时,发现黑轮层炭壳是内生的,具有生物活性的真菌。黑轮层炭壳真菌能够以不含萘的野生型挥发性有机化合物(VOC)发射,因此是属于有限组的生物活性VOC发射真菌的独特内生真菌,描述到目前为止。

[0089] 本发明的发明人也惊奇地发现,VOC对其它微生物、线虫、蚜虫、杂草和其它害虫具有很强的抗生素活性,如下文详述的。抗生素活性涉及产生和排放控制或抑制其他微生物生长的生物活性VOC的能力。

[0090] 因此,根据本发明的一个方面提供一种杀灭植物病原菌或减少其生长的方法,该方法包括将植物病原菌暴露于有效量的组合物,(该组合物包括轮层炭菌属的生物学上纯的培养物或由生物学上纯的培养物产生的至少一种挥发性有机化合物(VOC)(下述))以及能够杀灭植物病原菌或减少其生长。

[0091] 根据本发明的另外或可替换的方面,提供一种降低由植物病原菌引起的植物或植物部分的总体损害的方法,该方法包括将植物或植物部分暴露于有效量的组合物(该组合物包括轮层炭菌属的生物学上纯的培养物或由生物学上纯的培养物产生的至少一种挥发性有机化合物(VOC))以及能够杀灭植物病原菌或减少其生长,从而降低所述植物或植物部分的总体损害。

[0092] 根据本发明的另外或可替换的方面,提供一种存储植物或植物部分的方法,该方法包括将收获后植物或植物部分暴露于有效量的组合物(该组合物包括轮层炭菌属的生物学上纯的培养物或由生物学上纯的培养物产生的至少一种挥发性有机化合物(VOC))以及能够杀灭植物病原菌或减少其生长,从而存储所述植物或植物部分。

[0093] 如本文使用的,术语“植物病原菌”指对植物致病的生物体。

[0094] 植物病原菌生物体是指多细胞生物体、例如昆虫、真菌、动物、线虫或可引起植物病害的微生物、包括细菌、真菌以及卵菌、chytrids、藻类和线虫。

[0095] 病原体可处于任何发育阶段。例如预期是从幼年到成年阶段的四条蜕皮的线虫,例如包括蛋。

[0096] 根据特定实施方案,植物病原菌是微生物(例如细菌)。

[0097] 根据特定实施方案,植物病原菌是昆虫或蚜虫。

[0098] 根据特定实施方案,植物病原菌是线虫。

[0099] 根据特定实施方案,植物病原菌是真菌(例如霉菌)。

[0100] 具体地,可以使用上述方法控制的线虫包括但不限于寄生虫类例如:root-knot、reniform、cyst、和lesion线虫、包括但不限于Aphelenchoides spp.、Belonolaimus spp.、Bursaphelenchus spp.、Criconema spp.、Globodera spp.、Meloidogyne spp.、Tylenchorhynchus spp.、Helicotylenchus spp.、Heterodera spp.、Hoplolaimus spp.、Pratylenchus spp.、Rotylenchulus spp.、Trichodorus spp.、和Xiphinema spp.。特别地,寄生线虫可以包括但不限于seed gall线虫(*Afrina wevelli*)、bentgrass线虫(*Anguina agrostis*)、shoot gall线虫(*Anguina* spp.)、seed gall线虫(*Anguina* spp.、*A.amsinckiae*、*A.balsamophila*、*A.tritici*)、fescue leaf gall线虫(*A.graminis*)、ear-cockle(或wheat gall)线虫(*Anguina tritici*)、bud and leaf(或foliar)线虫(*Aphelenchoides* spp.、*A.subtenuis*)、begonia leaf(或fern、或spring crimp、或草莓foliar、或草莓线虫、或summer dwarf)线虫(*A.fragariae*)、fern线虫(*A.olesistus*)、rice

线虫 (*A.oryzae*)、currant 线虫 (*A.ribes*)、black currant (或 *chrysanthemum*) 线虫 (*A.ritzemabosi*)、*chrysanthemum foliar* 或 *leaf* 线虫 (*A.ritzemabosi*)、*ricewhite-tip* (或 *spring dwarf*、或 *草莓bud*) 线虫 (*A.besseyi*)、*fungus-feeding (mushroom)* 线虫 (*Aphelenchoides composticola*)、*Atalodera* spp. (*Atalodera lonicerae*、*Atalodera ucricri*)、*spine* 线虫 (*Bakernema variabile*)、*sting* 线虫 (*Belonolaimus* spp.、*B.gracilis*、*B.longicaudatus*)、*pine wood* 线虫 (*Bursaphelenchus* spp.、*B.xylophilus*、*B.mucronatus*)、*sessile* 线虫 (*Cacopaurus* spp.、*C.epacris*、*C.pestis*)、*amaranth cyst* 线虫 (*Cactodera amaranthi*)、*birch cyst* 线虫 (*C.betulae*)、*cactus cyst* 线虫 (*C.cacti*)、*estonian cyst* 线虫 (*C.estonica*)、*Thorne's cyst* 线虫 (*C.thornei*)、*knotweed cyst* 线虫 (*C.weissi*)、*ring* 线虫 (*Criconema* spp.)、*spine* 线虫 (*Criconema* spp.、*C.civellae*、*C.decalthineatum*、*C.spinalineatum*)、*ring* 线虫 (*Criconemellaaxeste*、*C.curvata*、*C.macrodora*、*C.parva*)、*ring* 线虫 (*Criconemoides* spp.、*C.citri*、*C.simile*)、*spine* 线虫 (*Crossonema fimbriatum*)、*eucalypt cystoid* 线虫 (*Cryphodera eucalypti*)、*bud, stem and bulb* 线虫 (*Ditylenchus* spp.、*D.angustus*、*D.dipsaci*、*D.destructor*、*D.intermedius*)、*Mushroom spawn* 线虫 (*D.myceliophagus*)、*awl* 线虫 (*Dolichodorus* spp.、*D.heterocephalus*、*D.heterocephalous*)、*s梨* 线虫 (*Dorylaimus* spp.)、*stunt* 线虫 (*Geocenamus superbus*)、*cyst* 线虫 (*Globodera* spp.)、*yarrow cyst* 线虫 (*G.achilleae*)、*milfoil cyst* 线虫 (*G.millefolii*)、*apple cyst* 线虫 (*G.mali*)、*white cyst* 马铃薯线虫 (*G.pallida*)、*golden* 线虫 (*G.rostochiensis*)、*tobacco cyst* 线虫 (*G.tabacum*)、*Osborne's cyst* 线虫 (*G.tabacum solanacearum*)、*horsenettle cyst* 线虫 (*G.tabacum virginiae*)、*pin* 线虫 (*Gracilacus* spp.、*G.idalimus*)、*spiral* 线虫 (*Helicotylenchus* spp.、*H.africanus*、*H.digonicus*、*H.dihystera*、*H.erythrinae*、*H.multicinctus*、*H.paragirus*、*H.pseudorobustus*、*H.solani*、*H.spicaudatus*)、*sheathoid* 线虫 (*Hemicriconemoides* spp.、*H.biformis*、*H.californianus*、*H.chitwoodi*、*H.floridensis*、*H.wessoni*)、*sheath* 线虫 (*Hemicycliophora* spp.、*H.arenaria*、*H.biosphaera*、*H.megalodiscus*、*H.parvana*、*H.poranga*、*H.sheri*、*H.similis*、*H.striatula*)、*cyst* 线虫 (*Heterodera* spp.)、*杏仁cyst* 线虫 (*H.amygdali*)、*oat (或cereal) cyst* 线虫 (*H.avenae*)、*Cajanus (或pigeon pea) cyst* 线虫 (*H.cajani*)、*Bermuda grass (或heart-shaped、或Valentine) cyst* 线虫 (*H.cardiolata*)、*胡萝卜cyst* 线虫 (*H.carotae*)、*卷心菜cyst* 线虫或 *brassica root eelworm* (*H.cruciferae*)、*nutgrass (或sedge) cyst* 线虫 (*H.cyperi*)、*Japanese cyst* 线虫 (*H.elachista*)、*无花果 (或 ficus、或rubber) cyst* 线虫 (*H.fici*)、*galeopsis cyst* 线虫 (*H.galeopsidis*)、*soybean cyst* 线虫 (*H.glycines*)、*alfalfaroot (或pea cyst) 线虫* (*H.goettingiana*)、*buckwheat cyst* 线虫 (*H.graduni*)、*barley cyst* 线虫 (*H.hordecalis*)、*hop cyst* 线虫 (*H.humuli*)、*Mediterranean cereal (或wheat) cyst* 线虫 (*H.latipons*)、*胡枝子cyst* 线虫 (*H.胡枝子e*)、*Kansas cyst* 线虫 (*H.longicolla*)、*cerealsroot eelworm 或oat cyst* 线虫 (*H.major*)、*grass cyst* 线虫 (*H.mani*)、*lucerne cyst* 线虫 (*H.medicaginis*)、*cyperus (或motha) cyst* 线虫 (*Heterodera mothi*)、*rice cyst* 线虫 (*H.oryzae*)、*Amu-Darya (或camel thorn cyst) 线虫* (*H.oxiana*)、*dock cyst* 线虫 (*H.rosii*)、*rumex cyst nemtodes* (*H.rumicis*)、*sugar甜菜 cyst* 线虫 (*H.schachtii*)、*willow cyst* 线虫 (*H.salixophila*)、*knawel cyst* 线虫

(*H. scleranthii*)、sowthistle cyst 线虫 (*H. sonchophila*)、tadzhik cyst 线虫 (*H. tadshikistanica*)、turkmencyst 线虫 (*H. turcomanica*)、clover cyst 线虫 (*H. trifolii*)、nettlecyst 线虫 (*H. urticae*)、ustinov cyst 线虫 (*H. ustinovi*)、豇豆 cyst 线虫 (*H. vigni*)、corn cyst 线虫 (*H. zea*)、rice root 线虫 (*Hirschmanniella* spp.、*H. belli*、*H. caudacrena*、*H. gracilis*、*H. oryzae*)、lance 线虫 (*Hoplolaimus* spp.)、Columbia 线虫 (*H. columbus*)、Cobb's lance 线虫 (*H. galeatus*)、crown-headed lance 线虫 (*H. tylenchiformis*)、pseudo root-knot 线虫 (*Hypsoperine graminis*)、needle 线虫 (*Longidorus* spp.、*L. africanus*、*L. sylphus*)、ring 线虫 (*Macroposthonia* (= *Mesocriconema*) *xenoplax*)、cystoid 线虫 (*Meloidodera* spp.)、pine cystoid 线虫 (*M. floridensis*)、tadzhik cystoid 线虫 (*M. tadshikistanica*)、cystoid body 线虫 (*Meloidoderita* spp.)、stunt 线虫 (*Merlinius* spp.、*M. brevidens*、*M. conicus*、*M. grandis*、*M. microdorus*)、root-knot 线虫 (*Meloidogyne* spp.、*M. acronea*、*M. arenaria*、*M. artiellia*、*M. brevicauda*、*M. camelliae*、*M. carolinensis*、*M. chitwoodi*、*M. exigua*、*M. graminicola*、*M. hapla*、*M. hispanica*、*M. incognita*、*M. incognita acrita*、*M. indica*、*M. inornata*、*M. javanica*、*M. kikuyuensis*、*M. konaensis*、*M. mali*、*M. microtyla*、*M. naasi*、*M. ovalis*、*M. platani*、*M. querciana*、*M. sasseri*、*M. tadshikistanica*、*M. thamesi*)、knapweed 线虫 (*Mesoanguina picridis*)、Douglas fir 线虫 (*Nacobdodera chitwoodi*)、false root-knot 线虫 (*Nacobbus aberrans*、*N. batatiformis*、*N. dorsalis*)、sour paste 线虫 (*Panagrellus redivivus*)、beer 线虫 (*P. silusiae*)、needle 线虫 (*Paralongidorus microlaimus*)、spiral 线虫 (*Pararotylenchus* spp.)、stubby-root 线虫 (*Paratrachodorus allius*、*P. minor*、*P. porosus*、*P. renifer*)、pin 线虫 (*Paratylenchus* spp.、*P. baldaccii*、*P. bukowinensis*、*P. curvatus*、*P. dian*因此, *P. elachistus*、*P. hamatus*、*P. holdemani*、*P. italiensis*、*P. lardus*、*P. nanus*、*P. neoamplycephalus*、*P. similis*)、lesion (或 meadow) 线虫 (*Pratylenchus* spp.、*P. alleni*、*P. brachyurus*、*P. coffeae*、*P. convallariae*、*P. crenatus*、*P. flakkensis*、*P. goodeyi*、*P. hexincisus*、*P. leiocephalus*、*P. minyus*、*P. musicola*、*P. neglectus*、*P. penetrans*、*P. pratensis*、*P. scribneri*、*P. thornei*、*P. vulnus*、*P. zea*)、stem gall 线虫 (*Pterotylenchus cecidogenus*)、grass cyst 线虫 (*Punctodera punctate*)、stunt 线虫 (*Quinisulcius acutus*、*Q. capitatus*)、burrowing 线虫 (*Radopholus* spp.)、banana-root 线虫 (*R. similis*)、rice-root 线虫 (*R. oryzae*)、redring (或 coconut、或 cocopalms) 线虫 (*Rhadinaphelenchus cocophilus*)、reniform 线虫 (*Rotylenchulus* spp.、*R. reniformis*、*R. parvus*)、spiral 线虫 (*Rotylenchus* spp.、*R. buxophilus*、*R. christiei*、*R. robustus*)、Thorne's lance 线虫 (*R. uniformis*)、Sarisodesahydrophylla、spiral 线虫 (*Scutellonema* spp.、*S. blaberum*、*S. brachyurum*、*S. bradys*、*S. clathricaudatum*、*S. christiei*、*S. conicephalum*)、grass root-gall 线虫 (*Subanguina radicecola*)、round cystoid 线虫 (*Thecavermiculatus andinus*)、stubby-root 线虫 (*Trichodorus* spp.、*T. christiei*、*T. kurumeensis*、*T. pachydermis*、*T. primitivus*)、vinegar eels (或 线虫) (*Turbatrix aceti*)、stunt (或 stylet) 线虫 (*Tylenchorhynchus* spp.、*T. agri*、*T. annulatus*、*T. aspericutis*、*T. claytoni*、*T. ebriensis*、*T. elegans*、*T. golden*、*T. graciliformis*、*T. martini*、*T. mashhoodi*、

T. microconus、T. nudus、T. oleraceae、T. penniseti、T. punensis)、citrus线虫 (Tylenchulus semipenetrans)、dagger线虫 (Xiphinema spp.、X. americanum、X. bakeri、X. brasiliense、X. brevicolle、X. chambersi、X. coxi、X. diversicaudatum、X. index、X. insigne、X. nigeriense、X. radicum、X. setariae、X. vulgariae、X. vuittenezi)。在特定实施方案中,受控的线虫是Meloidogyne spp.的成员,尤其是M. hapla或M. incognita。

[0101] 由上述方法控制的植物病原菌昆虫包括但不限于顺序(a) L表doptera中的非-Culicidae幼虫昆虫,例如,Acleris spp.、Adoxophyes spp.、Aegeria spp.、Agrotis spp.、Alabama argillaceae、Amylois spp.、Anticarsia gemmatilis、Archips spp.、Argyrotaenia spp.、Autographa spp.、Busseola fusca、Cadra cautella、Carposina nipponensis、Chilo spp.、Choristoneura spp.、Clysia ambiguella、Cnaphalocrocis spp.、Cnephasia spp.、Cochylis spp.、Coleophora spp.、Crocidolomia binotalis、Cryptophlebia leucotreta、Cydia spp.、Diatraea spp.、Diparopsis castanea、Earias spp.、Ephestia spp.、Eucosma spp.、Eupoecilia ambiguella、Euproctis spp.、Euxoa spp.、Grapholita spp.、Hedya nubiferana、Heliothis spp.、Hellula undalis、Hyphantria cunea、Keiferia lycopersicella、Leucoptera scitella、Lithocolletis spp.、Lobesia botrana、Lymantria spp.、Lyonetia spp.、Malacosoma spp.、Mamestra brassicae、Manduca sexta、Operophtera spp.、Ostrinia nubilalis、Pammene spp.、Pandemis spp.、Panolis flammea、Pectinophora gossypiella、Phthorimaea operculella、Pieris rapae、Pieris spp.、Plutella xylostella、Prays spp.、Scirpophaga spp.、Sesamia spp.、Sparganothis spp.、Spodoptera spp.、Synanthedon spp.、Thaumetopoea spp.、Tortrix spp.、Trichoplusia ni and Yponomeuta spp.; (b) Coleoptera、例如,Agriotes spp.、Alphitobius sp.、Anomala spp.、例如Anomala orientalis、Anthonomus spp.、Atomaria linearis、Chaetocnema tibialis、Cosmopolites spp.、Curculio spp.、Cyclocephala spp.、例如Cyclocephala lurida、Dermestes spp.、Diabrotica spp.、表lachna spp.、Eremnus spp.、Leptinotarsa decemlineata、Lissorhoptrus spp.、Melolontha spp.、Oryzaephilus spp.、Otiorhynchus spp.、Otiorhynchus sulcatus、Phlyctinus spp.、Popillia spp.、例如Popilla japonica、Psylliodes spp.、Rhizopertha spp.、例如Rhizotrogus majalis、Sitophilus spp.、Sitotroga spp.、Tenebrio spp.、Tribolium spp. and Trogoderma spp.; (c) Orthoptera、例如,Blatta spp.、Blattella spp.、Gryllotalpa spp.、Leucophaea maderae、Locusta spp.、Periplaneta spp. and Schistocerca spp.; (d) Isoptera、例如,Reticulitermes spp.; (e) Psocoptera、例如,Liposcelis spp.; (f) Anoplura、例如,Haematopinus spp.、Linognathus spp.、Pediculus spp.、Pemphigus spp. and Phylloxera spp.; (g) Mallophaga、例如,Damalinea spp. and Trichodectes spp.; (h) Thysanoptera、例如,Frankliniella spp.、Hercinotrips spp.、Taeniothrips spp.、Thrips palmi、Thrips tabaci and Scirtothrips aurantii; (i) Hemiptera、例如,Cimex spp.、Distantiella theobroma、Dysdercus spp.、Euchistus spp.、Euryg翠菊 spp.、Leptocorisa spp.、Nezara spp.、Piesma spp.、Rhodnius spp.、Sahlbergellasingularis、Scotinophara spp. and Tniatoma spp.; Aleurothrixus

floccosus、Aleyrodes brassicae、Aonidiella spp.、蚜虫idae、Aphis spp.、Aspidiotus spp.、Bactericera spp.、烟粉虱、Ceropl翠菊spp.、Chrysomphalus aonidium、Chrysomphalus dictyospermi、Coccus hesperidum、Empoasca spp.、Eriosoma larigerum、Erythroneura spp.、Gascardia spp.、Laodelphax spp.、Lecanium corni、L表dosaphes spp.、Macrosiphus spp.、Myzus spp.、Nephotettix spp.、Nilaparvata spp.、Paratoria spp.、Pemphigus spp.、Planococcus spp.、Pseudaulacaspis spp.、Pseudococcus spp.、Psylla spp.、Pulvinaria aethiopica、Quadraspidotus spp.、Rhopalosiphum spp.、Saissetia spp.、Scaphoideus spp.、Schizaphis spp.、Sitobion spp.、Trialeurodes vaporariorum、Trioziidae spp.、Trioza erytreae and Unaspis citri; (j) Hymenoptera、例如、Acromyrmex、Atta spp.、Cephus spp.、Diprion spp.、Diprionidae、Gilpinia polytoma、Hoplocampa spp.、Lasius spp.、Monomorium pharaonic、Neodiprion spp.、Solenopsis spp. and Vespa spp.; (k) Diptera、例如、Aedes spp.、Antherigona soccata、Bibio hortulanus、Calliphora erythrocephala、Ceratitis spp.、Chrysomyia spp.、Cuterebra spp.、Dacus spp.、Delia spp.、Delia radicum、Drosophilaspp.、例如Drosophila suzukii; Fannia spp.、Gastrophilus spp.、Glossina spp.、Hypoderma spp.、Hyppobosca spp.、Liriomyza spp.、Lucilia spp.、Melanagromyza spp.、Musca spp.、Oestrus spp.、Orseolia spp.、Oscinella frit、Pegomyia hyoscyami、Phorbia spp.、Rhagoletis pomonella、Sciara spp.、Stomoxys spp.、Tabanus spp.、Tannia spp. and Tipula spp.; (l) Siphonaptera、例如、Ceratomyza spp. and Xenopsylla cheopis; (m) from the order Thysanura、例如、L表sma saccharina。

[0102] 植物病原菌细菌包括但不限于: Agrobacterium spp. (例如Agrobacterium tumefaciens); Erwinia、Pantoea、Pectobacterium、Serratia、S. marcescens、Acidovorax、Pseudomonas、Ralstonia、Rhizobacter、Rhizomonas、Xanthomonas、Xylophilus、Agrobacterium、Rhizobium、Bacillus、Clostridium、Arthrobacter、Clavibacter、Curtobacterium、Leifsonia、Rhodococcus、Streptomyces、Xanthomonas spp. (Xanthomonas axonopodis、Xanthomonas oryzae pv. oryzae、Xanthomonas vesicatoria)。在一个具体实施方案中,植物病原菌细菌包括但不限于Clavibacter spp.、Xanthomonas spp.、Pseudomonas (例如Pseudomonas syringae)、Pectobacterium (例如Pectobacterium carotovorum)。

[0103] 植物病原菌真菌包括但不限于Alternaria spp. (例如烟草赤星病菌、Alternaria solani); Aphanomyces spp. (例如Aphanomyces euteiches); Aspergillus spp. (例如黑曲霉、Aspergillus fumigatus); Athelia spp. (例如Athelia rolfsii); Aureobasidium spp. (例如Aureobasidium pullulans); Bipolaris spp. (例如Bipolaris zeicola、Bipolaris maydis); Botrytis spp. (例如灰葡萄孢菌); Calonectria spp. (例如Calonectria kyotensis); Cephalosporium spp. (例如Cephalosporium maydis); Cercospora spp. (例如Cercospora medicaginis、Cercospora sojina、Colletotrichum coccodes、Colletotrichum fragariae、Colletotrichum graminicola); Coniella spp. (例如Coniella diplodiella); Coprinopsis spp. (例如Coprinopsis psychromorbida); Corynespora spp. (例如Corynespora cassiicola); Curvularia spp. (例如Curvularia

pallescens); *Cylindrocladium* spp. (例如 *Cylindrocladium crotalariae*); *Diplocarpon* spp. (例如 *Diplocarpon earlianum*); *Diplodia* spp. (例如 *Diplodia gossyina*); 表coccum spp. (例如表coccumnigrum); *Erysiphe* spp. (*Erysiphe cichoracearum*); *Fusarium* spp. (例如 *Fusarium graminearum*、尖孢镰刀菌f.sp.fragariae、尖孢镰刀菌f.sp.tuberosi、*Fusarium proliferatum* var.*proliferatum*、*Fusarium solani*、*Fusarium verticillioides*); *Ganoderma* spp. (例如 *Ganoderma boninense*); *Geotrichum* spp. (例如 *Geotrichum candidum*); *Glomerella* spp. (例如 *Glomerella tucumanensis*); *Guignardia* spp. (例如 *Guignardia bidwellii*); *Kabatiella* spp. (例如 *Kabatiella zeae*); *Leptosphaerulina* spp. (例如 *Leptosphaerulina briosiana*); *Leptotrochila* spp. (例如 *Leptotrochila rnedicaginis*); *Macrophomina* spp. (例如 *Macrophomina phaseolina*); *Magnaporthe* spp. (例如 *Magnaporthe grisea*、*Magnaporthe oryzae*); *Microsphaera* spp. (例如 *Microsphaera manshurica*); *Monilinia* spp. (例如 *Monilinia fructicola*); *Muc*或 spp.; *Mycosphaerella* spp. (例如 *Mycosphaerella juiensis*、*Mycosphaerella fragariae*); *Nigrospora* spp. (例如 *Nigrospora oryzae*); *Ophiostoma* spp. (例如 *Ophiostoma ulmi*); *Penicillium* spp.; *Peronospora* spp. (例如 *Peronospora manshurica*); *Phakopsora* (例如 *Phakopsora pachyrhizi*); *Phoma* spp. (例如 *Phoma foveata*、*Phoma medicaginis*); *Phomopsis* spp (例如 *Phomopsis longicolla*); *Phytophthora* spp. (例如 *Phytophthora cinnamomi*、*Phytophthora erythroseptica*、*Phytophthora fragariae*、*Phytophthora infestans*、*Phytophthora medicaginis*、*Phytophthora megasperma*、*Phytophthora palmivora*); *Podosphaera* (例如 *Podosphaera leucotricha*); *Pseudopeziza* spp. (例如 *Pseudopeziza medicaginis*); *Puccinia* spp. (例如 *Puccinia graminis* subsp.*tritici* (UG99)、*Puccinia striiformis*、*Puccinia recodita*、*Puccinia sorghi*); *Pyricularia* spp. (*Pyricularia grisea*、*Pyricularia oryzae*); *Pythium* spp. (例如终极腐霉菌); *Rhizoctonia* spp. (例如立枯丝核菌、*Rhizoctonia zeae*); *Rosellinia* spp.、*Sclerotinia* spp. (例如 *Sclerotinia minor*、核盘菌、*Sclerotinia trifoliorum*); *Sclerotium* spp. (例如 *Sclerotium rolfsii*); *Septoria* spp. (例如 *Septoria glycines*、*Septoria lycoperski*); *Setomelanomma* spp. (例如 *Setomelanomma turcica*); *Sphaerotheca* spp. (例如 *Sphaerotheca macularis*); *Spongospora* spp. (例如 *Spongospora subterranean*); *Stemphylium* spp.、*Synchytrium* spp. (例如 *Synchytrium endobioticum*)、*Verticillium* spp. (例如 *Verticillium albo-atrum*、*Verticillium dahliae*)。In a particular embodiment、the fungus is a member of the *Botrytis* spp. (例如灰葡萄孢菌)、*Sclerotinia* spp. (*Sclerotinia minor*)、*Sclerotium* spp. (例如 *Sclerotium rolfsii*)、*Macrophomina* spp. (例如 *Macrophomina phaseolina*)、*Verticillium* spp. (例如 *Verticillium dahliae*)、*Fusarium* spp. (例如尖孢镰刀菌f.sp.fragariae)、*Rhizoctonia* spp. (例如立枯丝核菌)、*Pythium* spp. (例如终极腐霉菌)。

[0104] 根据特定实施方案,线虫是*M. javanica*种。

[0105] 根据特定实施方案,线虫不是*M. javanica*种。

[0106] 根据特定实施方案,植物病原菌选自:终极腐霉菌、瓜果腐霉菌、烟草赤星病菌

pathotype tangelo、尖孢镰刀菌、*Fusarium euwallaceae*、*Fusarium mangiferae*、*Coniella* sp.、*Phoma tracheiphila*、*Colletotrichum* sp.、立枯丝核菌、烟草赤星病菌、灰葡萄孢菌、核盘菌、指状青霉菌、可可毛色二孢菌、*Neoscytalidium dimidiatum*和黑曲霉。

[0107] 根据特定实施方案,真菌选自*A.niger*、灰葡萄孢菌、烟草赤星病菌和指状青霉菌。

[0108] 根据特定实施方案,蚜虫选自:桃蚜、棉蚜、甘蓝蚜、*Aphis nerii*、烟粉虱和玉米蚜。

[0109] 如本文使用的,术语“减少”是指,与植物病原菌在给定时间内不暴露于本文所述的治疗的生长相比,在给定的时间内减少生长至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%以上或者甚至100%的逮捕增长。

[0110] 本发明组合物的效果也可以描述为杀虫剂或杀螨剂。

[0111] 如本文使用的术语“内生真菌”是指能够在植物内生活的或与其相关的生物体,否则不引起疾病或损害植物(即能够与植物共生生长)。内生菌可以占据植物组织细胞内或细胞外的空间包括叶子、茎、花、果实、种子或根部。内生菌可以是例如细菌或真菌生物体。

[0112] 如本文使用的“轮层炭菌属”是指家蚕科的一种真菌属的内生真菌。内生真菌可以是野生型的,也可以使用基因工程进行遗传修饰。

[0113] *Daldinia*属中的各种物种都是已知的,其包括但不限于、*D. angolensis*、*D. bakeri*、*D. bambusicola*、*D. brachysperma*、*D. caldariorum*、*D. childiae*、*D. clavata*、黑轮层炭壳、*D. cudonia*、*D. cuprea*、*D. dennisii*、*D. eschscholzii*、*D. fissa*、*D. gelatinosa*、*D. graminis*、*D. grandis*、*D. lloydii*、*D. loculata*、*D. macrospora*、*D. mexicana*、*D. novae-zelandiae*、*D. occidentalis*、*D. petriniae*、*D. placentiformis*、*D. sacchari*、*D. simulans*、*D. singularis*、*D. vernicosa*。

[0114] 根据特定实施方案,轮层炭菌属是黑轮层炭壳。

[0115] 根据示例性实施方案,黑轮层炭壳与至少2个基因中的每一个具有至少99%的同源性(例如ITS 5.8S rDNA区和肌动蛋白基因,SEQ ID NO:1和2)。例如2008年6月23日根据布达佩斯条约在CBS文化收藏中保藏的CBS123047轮层炭菌属OBROB1A的保藏培养物中保藏的菌株。菌株的特点是强烈的、甜的和果香。

[0116] 如本文使用的,短语“生物学上纯的培养物”是指真菌的培养物,其中培养物中至少80%(例如至少85%、90%、95%、甚至全部100%)的微生物,甚至在组合物中也有轮层炭菌属

[0117] 根据特定实施方案,组合物包含单一的*Daldinia*种。

[0118] 根据特定实施方案,组合物包含两个*Daldinia*种。

[0119] 根据特定实施方案,组合物包含两个物种例如*Daldinia*种和其他不是*Daldinia*种的物种(例如,如下文进一步描述的,在这种情况下,组合2或3个生物学上纯的培养物)。

[0120] 生物学上纯的培养物也被称为“孤种”。

[0121] 术语“孤种”旨在具体提及从其原始来源移除的纯生物(例如轮层炭菌属),并从其最初与之相关的其他成分纯化。例如,内生真菌可以被认为是从植物或植物元素中分离出来的并且从植物或植物元素中纯化出来的,以使其被分离并且不再与其源植物或植物元素相关联。应该注意,组合物可以包括全部的*Daldinia*细胞、其部分和其中的提取物。

[0122] 内生菌可能作为孢子、菌丝或菌丝体存在。

[0123] 在一个实施方案中,内生植物被储存,使其可以传播,并可以排出有效杀灭植物病原菌或减少其生长的VOC。例如,内生菌可以被干燥(例如冻干)或冷冻。在另一个实施方案中,内生真菌处于培养物中。用于繁殖内生真菌的培养基可以选自:土壤、水培装置和/或人造生长培养基。例如轮胎炭菌属PDA、PDB、玉米(长期贮藏)、小麦和稻米。

[0124] 组合物可以包含整个肉汤培养物、液体或固体培养物,或Daldinia菌株的悬浮液,特别是具有黑轮层炭壳菌株的鉴定特征中的至少一种的轮层炭菌属菌株,以及上清液、滤液和/或提取物或一种或多种,特别是多种(i)代谢物,(ii)分离的化合物(iii)衍生自Daldinia同心菌株的挥发物或(iv)同样具有杀死植物病原菌或减少其生长的活性的合成VOC或衍生物。

[0125] 通过GC/MS技术分析黑轮层炭壳排放的VOC,如图4所示。最初通过比较它们的相对保留指数和在Wiley8、Nist9、HC2205和KI数据库中发现的质谱来鉴定这些化合物。通过使用真实标准证实了由黑轮层炭壳发出的具有最高生物活性的选定化合物的GC/MS鉴定。下面的表A提供可以沿着本发明的教导使用的VOC的实例。

[0126] 表A

[0127]

保留时间 (Rt), 分	发射的 VOC	分子式
2.2	3-甲基-1-丁醇	C ₅ H ₁₂ O
2.25	2-甲基-1-丁醇	C ₅ H ₁₂ O
2.74	1-甲基-1,3-环己二烯	C ₇ H ₁₀
2.84	1-甲基-1,4-环己二烯	C ₇ H ₁₀
4.1	4-庚酮	C ₇ H ₁₄ O
4.33	乙酸异戊酯	C ₇ H ₁₄ O ₂
5.2	4-庚炔-2-醇	C ₇ H ₁₂ O
5.46	顺式-2-辛烯醛	C ₈ H ₁₄ O
6.3	辛醛	C ₈ H ₁₆ O

[0128]

7.15	4,4-二甲基-1,3-环戊二酮	$C_7H_{10}O_2$
7.7	2,2,5-三甲基环戊酮	$C_8H_{14}O$
10.45	苯乙醇	$C_8H_{10}O$
13.2	undefined alcohol	
18.16	β -榄香烯	$C_{15}H_{24}$
18.39	β -榄香烯	$C_{15}H_{24}$
19.4	(+)- α -柏木萜烯	$C_{15}H_{24}$
19.6	α -愈创木烯	$C_{15}H_{24}$
19.9	2-(4-羟苯基)乙醇	$C_8H_{10}O_2$
20.7	萜烯	$C_{10}H_{10}O_3$
21.04	β -芹子烯	$C_{15}H_{24}$
21.2	α -芹子烯	$C_{15}H_{24}$
21.35	α -愈创木烯	$C_{15}H_{24}$
21.6	大根香叶烯 A	$C_{15}H_{24}$
21.79	7-表- α -芹子烯	$C_{15}H_{24}$
22.02	胡萝卜-4(11),8-二烯	$C_{15}H_{24}$
22.9	藜芦酮	$C_{11}H_{14}O_3$
25.19	刺蕊草醇	$C_{15}H_{26}O$
25.2	3-甲氧基-2-萘酚	$C_{11}H_{10}O_2$

[0129] 根据特定实施方案,组合物不含萘。

[0130] 根据特定实施方案,组合物包含轮层炭菌属的纯的培养物和/或至少一种挥发性

有机化合物 (VOC), 选自: 3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丁醇、1-甲基-1,3-环己二烯、1-甲基-1,4-环己二烯、4-庚酮、乙酸异戊酯、4-庚炔-2-醇、顺式-2-辛烯醛、反式-2-辛烯醛, 辛醛、4,4-二甲基-1,3-环戊二酮、2,2,5-三甲基环戊酮、苯乙醇、 β -榄香烯、(+)- α -柏木萜烯、 α -愈创木烯、2-(4-羟苯基)乙醇、萜烯、 α -芹子烯、 β -芹子烯、 α -愈创木烯、大根香叶烯A、7-表- α -芹子烯、胡萝卜-4(11),8-二烯、藜芦酮、刺蕊草醇、3-甲氧基-2-萘酚及其混合物和农业上可接受的载体。

[0131] 根据特定实施方案, 组合物包含: 轮层炭菌属的纯的培养物和/或至少一种挥发性有机化合物 (VOC) 选自: 3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丁醇、1-甲基-1,3-环己二烯、4-庚酮、乙酸异戊酯、4-庚炔-2-醇、顺式-2-辛烯醛、反式-2-辛烯醛, 辛醛、4,4-二甲基-1,3-环戊二酮、2,2,5-三甲基环戊酮、 β -榄香烯、(+)- α -柏木萜烯、 α -愈创木烯、2-(4-羟苯基)乙醇、萜烯、 α -芹子烯、 β -芹子烯、 α -愈创木烯、大根香叶烯A、7-表- α -芹子烯、胡萝卜-4(11),8-二烯、藜芦酮、刺蕊草醇及其混合物和农业上可接受的载体。

[0132] 根据特定实施方案, 组合物包含多于一种由轮层炭菌属的生物学上纯的培养物产生的挥发性有机化合物 (VOC)。

[0133] 根据特定实施方案, 组合物包含VOC, 包括2-10个不同的VOC。

[0134] 根据特定实施方案, 组合物包含VOC, 包括2-8个不同的VOC。

[0135] 根据特定实施方案, 组合物包含VOC, 包括2-6个不同的VOC。

[0136] 根据特定实施方案, 组合物包含VOC, 包括2-4个不同的VOC。

[0137] 根据特定实施方案, 组合物包含VOC, 包括2-3个不同的VOC。

[0138] 根据特定实施方案, 组合物包含VOC, 包括3-甲基-1-丁醇、(\pm)-2-甲基-1-丁醇、4-庚酮和乙酸异戊酯。

[0139] 根据特定实施方案, 组合物包含的3-甲基-1-丁醇、(\pm)-2-甲基-1-丁醇、4-庚酮和乙酸异戊酯的比例为1:1:2:1。

[0140] 根据特定实施方案, 组合物包含VOC, 包括4-庚酮和反式-2-辛烯醛。

[0141] 根据特定实施方案, 组合物包含的4-庚酮和反式-2-辛烯醛的比例为1:1。

[0142] 根据特定实施方案, 组合物包含4-庚酮 (例如至少50%、60%、70%、80%、90%、100%) 和/或反式-2-辛烯醛 (例如至少50%、60%、70%、80%、90%、100%) 以及农业上可接受的载体。

[0143] 根据特定实施方案, 组合物包含VOC, 选自: 3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丁醇、1-甲基-1,3-环己二烯、1-甲基-1,4-环己二烯、4-庚酮、乙酸异戊酯、4-庚炔-2-醇、顺式-2-辛烯醛、反式-2-辛烯醛, 辛醛、4,4-二甲基-1,3-环戊二酮、2,2,5-三甲基环戊酮、苯乙醇、 β -榄香烯、(+)- α -柏木萜烯、 α -愈创木烯、2-(4-羟苯基)乙醇、萜烯、 α -芹子烯、 β -芹子烯、 α -愈创木烯、大根香叶烯A、7-表- α -芹子烯、胡萝卜-4(11),8-二烯、藜芦酮、刺蕊草醇、3-甲氧基-2-萘酚及其混合物。

[0144] 根据本发明, 发射的VOC是指“混合物4”, 包含3-甲基-1-丁醇、(\pm)-2-甲基-1-丁醇、4-庚酮和乙酸异戊酯, 比例为1:1:2:1。

[0145] 根据本发明, 发射的VOC是指“混合物21”, 包含4-庚酮和反式-2-辛烯醛, 比例为1:1。

[0146] 反式-2-辛烯醛可与顺式-2-辛烯醛互换。组合物中的VOC可以由Daldinia菌株产

生,或者可以由合成化合物生产,其可由商业供应商例如Sigma获得。

[0147] 因此,组合物中的VOC可以是由菌株产生的产物的重新混合物,或者可以是挥发性有机化合物的人造混合物。

[0148] 当考虑本发明组合物的天然来源时,VOC可以从Daldinia (例如黑轮层炭壳) 培养物中回收。

[0149] 因此,根据本发明的一个方面提供一种制备挥发性有机化合物(VOC)的方法,该方法包括:

[0150] (a) 培养轮层炭菌属的生物学上纯的培养物;

[0151] (b) 以及收集由轮层炭菌属的菌株产生的挥发性成分。

[0152] 因此,本发明的组合物可以通过在液体培养基中或在琼脂平板上生长Daldinia菌株而产生。液体介质可以是包含碳源和氮源和无机盐的任何合适的液体营养培养基。合适的液体培养基可用或可从商业来源获得或根据公开的组合物制备例如马铃薯葡萄糖液(PDB)。在一个具体实施方案中,Daldinia菌株可以在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)上生长。

[0153] 一旦由Daldinia产生,可以使用几种方法从培养基中或从生长室中的蒸气中分离/收集/回收VOC。例如,可以使用常见的分离技术从肉汤或琼脂中除去细胞,并且可以使用通常的分离程序,例如(但不限于)提取,蒸馏和碳柱捕获程序,以获得来自无细胞肉汤的VOC或琼脂。例如参见美国专利No.4,275,234、5,510,526、5,641,406、5,831,122、国际专利申请号为W0 93/00440,其各自的全部内容通过引用并入本文。

[0154] 分馏和/或吸收层析也是提取由本发明的Daldinia分离株产生的所需产物的方法的非限制性实例。分馏是将混合物分离成其组分部分或部分,例如通过将化合物的沸点加热到化合物将蒸发的几个馏分温度来分离化合物。吸收色谱法是一种物理分离方法,其中混合物的组分由两相间的分布差异分离,其中一个为静止的(固定相),而另一个(流动相)在一定方向上通过它们移动。物质必须与固定相相互作用以保持和分离。

[0155] 气相色谱法用于分级和测定含有不同挥发性化合物的混合物的样品中各种组分的相对量的公知技术。例如,将样品蒸发并将整个所得量的气体通过分析色谱柱。诸如气相色谱法的色谱方法可以快速测定多组分样品的挥发物含量,例如由本发明的真菌分离物产生的。

[0156] 在一些情况中,压力摆动吸附(PSA)可用于根据物种的分子特性和对吸附材料的亲和性,在压力下将一些气体物质与气体混合物分离。它在近乎环境温度下工作,与气体分离的低温蒸馏技术不同。特殊吸附材料(例如沸石)用作分子筛,优先在高压下吸附目标气体物质。然后,该过程摆动到低压以解吸吸附剂材料。

[0157] 组合物可以与另一种微生物和/或农药(例如杀线虫剂、杀菌剂、杀真菌剂、杀虫剂)组合或使用。微生物可以包括但不限于Bacillus spp.、Paecilomyces spp.、Pasteuria spp.、Pseudomonas spp.、Brevibacillus spp.、Lecanicillium spp.、non-Ampelomyces spp.、Pseudozyma spp.、Streptomyces spp.、Burkholderia spp.、Trichoderma spp.、Gliocladium spp.或Muscodora spp.或者,试剂可以是具有杀线虫、杀真菌、杀菌和/或杀虫活性的天然油或油产物(例如石蜡油、茶树油、柠檬草油、丁香油、肉桂油、柑橘油、迷迭香油、除虫菊)。另外的微生物、农药或试剂可以在施用Daldinia菌株和/或由其生产的VOC之前、同时或之后施用。

[0158] 此外,农药可以是单位抗真菌剂,其可以包括但不限于苯并咪唑、甲基抑制剂(DMI)(例如咪唑、嘧啶、三唑)、吗啉、羟基嘧啶、苯胺基嘧啶、硫代磷酸酯、醌外抑制剂、喹啉、二羧酰亚胺、羧酰亚胺、苯基酰胺、苯胺基嘧啶、苯基吡咯、芳炔、肉桂酸、羟基苯胺、抗生素、多氧辛、酰胺、邻苯二甲酰亚胺、苯型(甲苯丙氨酸)、甲基抑制剂选自:咪唑、嘧啶、三唑(例如bitertanol、myclobutanil、penconazole、propiconazole、triadimefon、bromuconazole、cyproconazole、diniconazole、fenbuconazole、hexaconazole、tebuconazole、tetraconazole)、myclobutanil,以及quinoneoutside抑制剂(例如strobilurin)。strobilurin可以包括但不限于azoxystrobin、kresoxim-methoyl或trifloxystrobin。在另一个具体实施方案中,抗真菌剂是醌,例如quinoxifen(5,7-二氯-4-喹啉基-4-氟苯基醚)。抗真菌剂可以衍生自Reynoutria提取物。

[0159] 杀真菌剂也可以是多位点非无机化学杀菌剂,选自:氯腈、喹啉、磺酰胺、磷酸酯、亚磷酸酯、二硫代氨基甲酸酯、氯代烷基、苯基吡啶胺和氰基乙酰胺肟。

[0160] 如上所述,组合物还可以包含杀线虫剂。这种杀线虫剂可以包括但不限于有机磷酸盐、氨基甲酸酯和熏蒸剂等化学物质,以及微生物产物如阿vermectin、Myrothecium spp.、Biome(Bacillus firmus)、Pasteuria spp.、Paecilomyces spp.以及有机产物如皂苷和植物油。

[0161] 在将组合物施用于种子的情况下,使用本领域已知的方法,可以在使用一种或多种种子包衣剂种植种子之前将组合物施用于种子作为一种或多种包衣、包括但不限于乙二醇、聚乙二醇、壳聚糖、羧甲基壳聚糖、泥炭苔、树脂和蜡或具有单一位点、多位点或未知作用模式的化学杀真菌剂或杀菌剂。

[0162] 上述组合物可以以任何方式配制。非限制性制剂实例包括但不限于干谷物如大麦、玉米、黑麦、稻、大豆和小麦、乳油(EC)、可湿性粉剂(WP)、可溶性液体(SL)、气溶胶、超低体浓缩液(ULV)、可溶性粉末(SP)、微胶囊化、水分散颗粒(WDG)、可流动性(FL)、微乳液(ME)、纳米乳液(NE)等。活性成分在本技术范围之内,例如在0.01%至99.99%的范围内。

[0163] 组合物可以是液体、凝胶、固体或生物熏蒸剂的形式。固体组合物可以通过将固体载体浸泡在活性成分溶液中并在温和条件下干燥悬浮液来制备,例如在室温下蒸发或在65℃或更低真空蒸发。固体组合物也可以是用该菌株生长的干燥谷物。该组合物可以另外包含用于乳化、分散、润湿、铺展、整合、崩解控制、活性成分稳定和改善流动性或防锈性的表面活性剂。在一个具体实施方案中,表面活性剂是非植物毒性非离子表面活性剂,其优选EPA List 4B。

[0164] 在另一个具体实施方案中,非离子表面活性剂是聚氧乙烯(20)单月桂酸酯。表面活性剂的浓度可以在总制剂的0.1-35%之间,例如范围是5-25%。分散乳化剂如非离子型、阴离子型、两性的和阳离子的分散乳化剂的选择以及所使用的量由组合物的性质和试剂促进本发明组合物分散的能力决定。

[0165] 如上所述,可以使用本领域已知的方法来应用上述组合物。具体地说,这些组合物可以应用于植物或植物部分和周围。植物或植物部分可以是收获前(植根于土壤或水培、露天、温室等)或收获后的。在目前的情况下,植物应被理解为所有植物和植物群体,如所需和不期望的野生植物或作物植物(包括天然的卷曲作物植物)。作物植物可以是可以通过常规植物育种和优化方法或通过生物技术和遗传工程方法或这些方法的组合获得的植物,包括

转基因植物,并且包括可由植物育种者的权利保护或不可保护的植物品种。植物部分应理解为意指植物高于和低于地面的植物部分和器官,如枝条、叶、花和根、可能被称为叶、针、秸秆、茎、花、果实体、果实、种子、根、块茎和根状茎的实例。植物部分还包括但不限于收获的材料,以及植物和生殖繁殖材料,例如扦插、块茎、根茎、分枝和种子。

[0166] 可以处理的植物包括但不限于:(A) 主要食用粮食作物,包括但不限于(1) 谷类(例如非洲大米、大麦、硬粒小麦、einkorn小麦、emmer小麦、finger小米、foxtail小米、hairy crabgrass、印度barnyard小米、日本barnyard小米、玉米、nance、燕麦、梨1小米、proso小米、大米、黑麦、高粱、高粱spp.、黑麦、spelt小麦);(2) 水果(例如abiou、acerola、achacha、非洲芒果山竹、高山醋栗、ambarella、美国醋栗、美国柿子、苹果、杏、araza、亚洲扇叶树棕榈(Asian palmyra palm)、梨亚洲梨、atemoya、澳大利亚沙漠葡萄干(Australian desert raisin)、鳄梨、azarole、babaco、bael、香蕉、Barbados醋栗、佛手柑、槟榔、bignay、越桔、bilimbi、binjai、biriba、苦橙、黑苦莓、黑桑、black sapote、黑莓、blue-berried honeysuckle、borojo、面包果、murmese葡萄、button芒果山竹、可可、calamondin、canistel、哈密瓜、cape醋栗、腰果、cassa香蕉、cempedak、charichuelo、cherimoya、樱桃、Rio Grande樱桃、樱桃李(cherry plum)、中国山楂、梨中国白梨、苦莓、香椽、椰子(cocona)、椰子(coconut)、可可李(cocoplum)、咖啡、咖啡Arabica、咖啡robusta、CostaRica pitahaya、黑加仑、南美洲番荔枝、date、date-plum、犬蔷薇、火龙果、榴莲、接骨木、大象苹果(elephant apple)、埃塞俄比亚茄子、欧洲荨麻树、欧洲野生苹果、feijoa、无花果、gac、genipapo、大果西番莲、醋栗、goumi、葡萄、葡萄柚、great morinda、青梅、番石榴、耐寒猕猴桃、hog plum、角瓜、horse芒果、印度无花果、印度枣、jabuticaba、jackberry、菠萝蜜、日本柿子、日本葡萄酒浆果(Japanese wineberry)、jocote、jujube、kaffir lime、karanda、kei苹果、kepel苹果、keylime、kitembilla、猕猴桃、korlan、kubal vine、kuwini芒果、kwai muk、langsai、大蔓越莓、柠檬、利比里亚咖啡、龙眼、枇杷、荔枝、malay苹果、mameysapote、mammee苹果、芒果、芒果山竹、maprang、marang、枸杞、甜瓜、Mirabelle plum、miracle fruit、monkey jack、moriche palm、木瓜(papaya)山木瓜(mountain木瓜(papaya))、山刺番荔枝(mountain soursop)、桑椹、naranjilla、natal plum、北方高灌木蓝莓(northern highbush blueberry)、橄榄、otaheite醋栗、oval kumquat、木瓜(papaya)、para番石榴、百香果、木瓜(pawpaw)、桃、peach-palm、梨、佩皮诺、凤梨、pitomba Eugenia luschnathiana、pitomba talisia esculenta、芭蕉、李子、石榴、柚子、pulasan、紫色苦莓、温梓、红毛丹、ramontchi、覆盆子、红色苦莓、红醋栗、红色桑椹、红果番石榴、rhubarb、玫瑰苹果(rose apple)、roselle、safou、salak、salmonberry、santol、sapodilla、satsuma、sea葡萄、soncoya、酸樱桃(sour cherry)、soursop、Spanish lime、西班牙罗望子、星苹果(star apple)、杨桃、草莓、草莓番石榴、草莓树、糖苹果(sugar apple)、Surinam樱桃、甜野蔷薇、甜西番莲、甜酸橙、tamarillo、罗望子、橘子、tomatillo、tucuma棕榈、越桔属、velvet苹果、黄皮、西瓜、水玫瑰苹果(水玫瑰apple)、蜡苹果(wax apple)、白醋栗、白桑椹、白色皂荚、白星苹果(white star apple)、枸杞(Lyceum barbarum、L.chinense)、yellow mombin、黄色火龙果、黄果草莓、番石榴、(3) 蔬菜(例如 ackee、玛瑙、空气马铃薯、Amaranthus spp.、美国花生、antroewa、亚美尼亚黄瓜、arracacha、arrowleaf elephant ear、竹芋、朝鲜蓟、冬瓜、芦笋、鳄梨、azuki bean、

bambara花生、竹、香蕉、Barbados醋栗、甜菜、甜菜根、苦瓜、苦藤草、bitterleaf、黑芥末、黑萝卜、黑婆罗门参、芹菜焯过的芹菜、面包果、蚕豆、西蓝花、布鲁塞尔豆芽、Buck's horn芭蕉、毛茛南瓜、冬南瓜、卷心菜、caigua、葫芦、香菜种子、角豆树、胡萝卜、cassa香蕉、木薯、短豇豆、花椰菜、块根芹、芹菜、莴苣、甜菜、佛手瓜、鹰嘴豆、菊苣、chilacayote、辣椒 (Capsicum annuum, C. baccatum, C. chinense, C. frutescens, C. pubescens)、大白菜、板栗荸荠、山药、韭菜、chufasedge、油菜作物、普通豆类、普通马齿苋、玉米沙拉、豇豆、水芹、黄瓜、南瓜、鼓槌树、eddoe、茄子、象脚山药 (elephant foot yam)、象蒜 (elephant garlic)、苦苣、enset、埃塞俄比亚茄子、佛罗伦萨茴香、凹槽葫芦 (fluted gourd)、gac、garden rocket、大蒜、geocarpa花生、Good King Henry、草豌豆、花生、瓜尔豆 (guar bean)、horse gram、辣根、hyacinth bean、ice plant、印度无花果、印度菠菜、常春藤葫芦、Jerusalem朝鲜蓊、jacamar、黄麻、羽衣甘蓝、大头菜、魔芋、kurrat、韭菜、扁豆、生菜、利马豆、莲花、luffa、maca、玉米、mangel-wurzel、mashua、moso竹、蛾豆、绿豆、napa卷心菜、neem、^oCa、秋葵、Oldham's竹、橄榄、洋葱、欧洲防风草、豌豆、木豆、芭蕉、尖葫芦 (pointed gourd)、马铃薯、南瓜、南瓜 (squashes)、quinoa、萝卜、油菜籽、红苋菜、大黄、罗纹葫芦 (ribbed gourd)、米豆、根香菜、runner bean、大头菜、西米棕榈、婆罗门参、葱、海芥兰、小葱、蛇瓜、雪豌豆、sorrel、大豆、spilanthus、菠菜、菠菜甜菜、甜马铃薯、芋头、tarwi、teasle gourd、tepari bean、tinda、番茄、块茎豌豆、芜菁、turnip-rooted chervil、urad bean、water caltrop trapa bicornis、water caltrop trapa natans、water morning glory、西洋菜、大葱、西非秋葵、西印度小黄瓜、white goosefoot、白山药、四棱豆、冬季马齿苋、雪莲果、山药、长豆、西葫芦)；(4) 粮食作物 (例如abiou、acerola、achacha、ackee、非洲山竹、非洲非洲大米、玛瑙、空气马铃薯、高山醋栗、Amaranthus spp.、Ambarrella、美国醋栗、美国花生、美国柿子、antroewa、苹果、杏、araza、亚美尼亚黄瓜、arracacha、arrowleaf elephant ear、竹芋、朝鲜蓊、冬瓜、亚洲扇叶树棕榈 (Asian palmyra palm)、亚洲梨、芦笋、atemoya、澳大利亚沙漠葡萄干 (Australian desert raisin)、鳄梨、azarole、azuki bean、babaco、bael、bambara花生、竹、香蕉、barbados醋栗、大麦、甜菜、甜菜根、佛手柑、槟榔、bignay、越桔、bilimbi、binjai、biriba、苦瓜、苦橙、苦藤草、bitterleaf、苦莓黑苦莓、black currant、桑椹黑桑、黑芥末、萝卜黑萝卜、黑婆罗门参、black sapote、黑莓、芹菜焯过的芹菜、blue-berried honeysuckle、borojo、面包果、蚕豆、西蓝花、布鲁塞尔豆芽、Buck's horn芭蕉、buck小麦、Burmese葡萄、毛茛南瓜、冬南瓜、button山竹、卷心菜、可可、caigua、葫芦、calamondin、canistel、哈密瓜、灯笼果、香菜种子、角豆树、胡萝卜、腰果、木薯、短豇豆、花椰菜、块根芹、芹菜、莴苣、cempedak、甜菜、charichuelo、佛手瓜、cherimoya、樱桃、Rio Grande樱桃、櫻桃李、鹰嘴豆、菊苣、chilacayote、辣椒 (Capsicum annuum, C. baccatum, C. chinense, C. frutescens, C. pubescens)、Chinese卷心菜、中国山楂、板栗荸荠、梨中国白梨、山药、韭菜、苦莓、chufa sedge、香橼、椰子 (cocona)、椰子 (coconut)、可可李 (cocoplum)、咖啡、咖啡 (Arabica and Robusta types)、油菜作物、普通豆类、普通马齿苋、玉米沙拉、Costa Rica pitahaya、豇豆、水芹、黄瓜、黑加仑、南瓜、南美洲番荔枝苹果、date、date-plum、犬蔷薇、火龙果、鼓槌树、榴莲、小麦硬粒小麦、eddoe、茄子、einkorn小麦、接骨木、elephant苹果、象脚山药 (elephant foot yam)、象蒜 (elephant garlic)、emmer小麦、苦苣、enset、埃塞俄比亚茄子、欧洲荨麻树、欧洲野生苹果、feijoa、无花果、finger小

米、佛罗伦萨茴香、凹槽葫芦 (fluted gourd)、foxtail 小米、gac、garden rocket、大蒜、genipapo、geocarpa 花生、大果西番莲、good king henry、醋栗、goumi、葡萄、葡萄柚、草豌豆、great morinda、青梅、花生、grumichama、瓜尔豆 (guar bean)、番石榴、hairy crabgrass、耐寒猕猴桃、hog plum、角瓜、horse gram、horse 芒果、萝卜辣根、hyacinth bean、iceplant、印度 barnyard 小米、印度无花果、印度 jujube、印度菠菜、常春藤葫芦、jabuticaba、jackalberry、菠萝蜜、jambul、日本 barnyard 小米、日本柿子、日本葡萄酒浆果、Jerusalem 朝鲜蓟、jocote、jujube、黄麻、kaffir lime、羽衣甘蓝、karanda、kei 苹果、kepel 苹果、key lime、kitebilla、奇异果、大头菜、魔芋、korlan、kubal vine、kurrat、kuwini 芒果、kwai muk、langsai、大蔓越莓、韭菜、柠檬、扁豆、生菜、Liberian 咖啡、利马豆、龙眼、枇杷、莲花、luffa、荔枝、maca、玉米、malay 苹果、mamey sapote、mammee 苹果、mangel-wurzel、芒果、芒果山竹、maprang、marang、mashua、枸杞、甜瓜、Mirabelle plum、miracle fruit、monk fruit、monkey jack、morihe palm、moso 竹、蛾豆、木瓜 (papaya) 山木瓜 (mountain 木瓜 (papaya))、山刺番荔枝 (mountain soursop)、桑椹、绿豆、蘑菇、nance、napa 卷心菜、naranjilla、natal plum、neem、北方高灌木蓝莓 (northern highbush blueberry)、燕麦、^oCa、oil palm、秋葵、old man's 竹、橄榄、洋葱、橙子、otaheite 醋栗、oval kumquat、木瓜 (papaya)、para 番石榴、欧洲防风草、百香果、木瓜 (pawpaw)、豌豆、桃、peach-palm、梨、梨 1 小米、佩皮诺、木豆、菠萝、Pitomba (*Eugenia luschnathiana*、*Talisia esculenta*)、芭蕉、plum、尖葫芦 (pointed gourd)、石榴、柚子、马铃薯、proso 小米、pulasan、南瓜 (pumpkins) 南瓜 (squashes)、紫色苦莓、温梓、quinoa、萝卜、红毛丹、ramontchi、油菜籽、覆盆子、红苋菜、红色苦莓、红醋栗、红桑椹、红果草莓番石榴、大黄、罗纹葫芦 (ribbed gourd)、大米、米豆、根香菜、玫瑰苹果、roselle、runnerbean、大头菜、黑麦、safou、西米棕榈、salak、salmonberry、salsify、santol、sapodilla、Satsuma、葱、海芥兰、sea 葡萄、小葱、蛇瓜、雪豌豆、soncoya、高粱、高粱 spp.、sorrel、sour 樱桃、soursop、大豆、Spanish lime、西班牙罗望子、spelt 小麦、spilanthus、菠菜、菠菜甜菜、星苹果、杨桃、草莓、草莓番石榴、草莓树、糖苹果、糖甜菜、甘蔗、surinam 樱桃、甜野蔷薇、甜西番莲、甜酸橙、糖马铃薯、tamarillo、tamarind、橘子、芋头、tarwi、teasle gourd、tef、tepariy bean、tinda、tomatillo、番茄、块茎豌豆、tucuma palm、萝卜、turnip-rooted chervil、urad bean、越桔属、velvet 苹果、黄皮、water caltrop (*Trapa bicornis*、*T. natans*)、water morning glory、西洋菜、西瓜、水玫瑰苹果、蜡苹果、welsh 洋葱、西非秋葵、西印度小黄瓜、小麦、白醋栗、white goosefoot、白桑椹、白色皂荚、白星苹果、白山药、四棱豆、冬季马齿苋、枸杞 (*Lycium barbarum*、*L. chinense*)、雪莲果、山药、杨梅、长豆、yellow mombin、黄色火龙果、黄果草莓番石榴、西葫芦；(B) 其他可食用作物，包括但不限于 (1) 草药 (例如 Absinthium、alexanders、basil、bay laurel、槟榔、甘菊、chervil、辣椒 (*Capsicum annum*、*C. baccatum*、*C. chinense*、*C. frutescens*、*C. pubescens*)、辣椒、韭菜、欧洲没药、普通芸香、common thyme、胡荽、水芹、culantro、卷叶欧芹、莳萝、epazote、茴香、平叶欧芹、人参、gray santolina、草本牛膝草、圣罗勒、啤酒花、茉莉花、青柠檬、薰衣草、柠檬香蜂草、柠檬罗勒、柠檬草、独活草、马郁兰、薄荷、牛至、欧芹、薄荷、紫苏、盆栽万寿菊、如意宝、迷迭香、鼠尾草、shiny-leaft 沙棘、酢浆草、留兰香、summer savory、龙蒿、那罗勒、缬草、西洋菜、野生槟榔、winter savory、马黛茶)；(2) 香料 (例如 ajowan、五香粉、茴香、月桂、黑豆蔻、

黑芥末、黑胡椒、caper、香菜种子、豆蔻果实、辣椒 (*Capsicum annuum*、*C. baccatum*、*C. chinense*、*C. frutescens*、*C. pubescens*)、辣椒、肉桂、丁香、普通杜松、胡荽、小茴香、茴香、胡芦巴、大蒜、生姜、青柠檬、甘草、肉豆蔻、牛至、香兰、欧芹、藏红花、八角茴香、姜黄、香草、白芥末藏红花)；(2) 药用植物 (例如苦艾酒、苜蓿、芦荟、茴香、朝鲜蓟、罗勒、月桂、槟榔叶、槟榔、越桔、豆蔻果实黑豆蔻、黑芥末、黑胡椒、bluegum、borojo、洋甘菊、caper、豆蔻果实、蓖麻子、辣椒、山药、韭菜、colanut、普通茉莉花、普通薰衣草、普通没药、普通芸香、香菜、小茴香、莳萝、犬蔷薇、epazote、茴香、胡芦巴、gac、大蒜、生姜、graysantolina、阿拉伯树胶、草本牛膝草、圣罗勒、萝卜辣根、香树、薰衣草、柠檬草、甘草、独活草、大麻、马郁兰、僧果、印楝、鸦片、牛至、薄荷、金盏花、奎宁、红洋槐、红醋栗、rooibos、红花、鼠尾草、闪亮叶沙棘、酢浆草、spilanthus、八角茴香、龙蒿、茶叶、姜黄、缬草、天鹅绒豆、西洋菜、白芥末、白色皂荚、野生槟榔、枸杞 (*Lycium barbarum*、*L. chinense*)、马黛茶)；(3) 兴奋剂 (例如槟榔叶、槟榔、可可、辣椒 (*Capsicum annuum*、*C. baccatum*、*C. chinense*、*C. frutescens*、*C. pubescens*)、辣椒、咖啡、咖啡 (*Arabica*、*Robusta*)、cola nut、阿拉伯茶、Liberian咖啡、茶、烟草、野生槟榔、马黛茶)；(4) 坚果 (例如杏仁、槟榔、巴西坚果、腰果、板栗、板栗荸荠、椰子 (coconut)、cola nut、普通核桃、花生、榛子、日本石橡木、澳洲坚果、肉豆蔻、天堂坚果、山核桃、开心果、核桃)；(5) 食用种子 (例如黑胡椒、巴西坚果、chilacayote、colanut、凹槽葫芦 (fluted gourd)、莲花、鸦片、藜麦、芝麻、向日葵、水菱角 (*Trapa bicornis*、*T. natans*))；(6) 植物油 (例如黑芥末、亚麻荠、蓖麻子、椰子 (coconut)、棉、亚麻籽、玉米、neem、Niger seed、油棕榈、橄榄、鸦片、油菜籽、红花、芝麻、大豆、向日葵、桐树、萝卜)；(7) 糖作物 (例如亚洲扇叶树棕榈 (Asian palmyra palm)、银枣椰子、高粱、糖甜菜、甘蔗)；(8) 准谷物 (例如 *Amaranthus* spp.、buck小麦、藜麦、红苋菜)；(9) 壮阳剂 (例如borojo、芹菜、榴莲、garden rocket、人参、maca、red acacia、天鹅绒豆)；(C) 非食品类别, 包括但不限于 (1) 饲料和饲料作物 (例如玛瑙、苜蓿、甜菜、蚕豆、亚麻荠、短豇豆、草豌豆、瓜尔豆 (guar bean)、horse gram、印度稗子、日本稗子、胡枝子、羽扇豆、玉米、mangel-wurzel、桑椹、Niger seed、油菜籽、米豆、黑麦)；(2) 纤维作物 (例如椰子 (coconut)、棉、fique、麻、龙舌兰、黄麻、kapok、kenaf、亚麻籽、马尼拉麻、新西兰亚麻、苧麻、玫瑰茄、剑麻、白桑椹)；(3) 能源作物 (例如blue gum、亚麻荠、木薯、玉米、油菜籽、高粱、大豆、苏丹草、糖甜菜、甘蔗、小麦)；(4) 酒精生产 (例如大麦、李子、马铃薯、甘蔗、小麦、高粱)；(5) 染料作物 (例如chay root、henna、indigo、old fustic、红花、藏红花、姜黄)；(6) 精油 (例如五香粉、佛手柑、苦橙、blue gum、甘菊、香茅、丁香、普通茉莉花、普通杜松、普通薰衣草、普通没药、薄荷、小苍兰、gray santolina、草本牛膝草、圣罗勒、香树、茉莉花、薰衣草、柠檬、万寿菊、薄荷、橙、薄荷、金盏花、留兰香、依兰树)；(6) 绿肥 (例如苜蓿、三叶草、lacy Phacelia、sunn hemp、三叶草、天鹅绒豆、苕子)；(7) 防腐蚀 (例如竹、可可李 (cocoplum))；(8) 土壤改良 (例如羽扇豆、苕子)；(9) 覆盖作物 (例如苜蓿、lacy Phacelia、萝卜)；(10) 植物杀虫剂 (例如豆薯、万寿菊、印楝、除虫菊)；(11) 切花 (例如康乃馨、菊花、水仙、大丽花、小苍兰、非洲菊、金盏花、玫瑰、向日葵、郁金香)；(12) 观赏植物 (例如非洲山竹、芦荟、高山醋栗、翠菊、黑苦莓、面包果、calamondin、康乃馨、cassa香蕉、蓖麻子、櫻桃李、苦莓、菊花、可可李 (cocoplum)、普通薰衣草、番红花、水仙花、大丽花、小苍兰、非洲菊、风信子、日本石橡树、茉莉花、lacy Phacelia、莲花、羽扇豆、万寿菊、新西兰亚麻、鸦片、紫色苦莓、苧麻、红苦莓、蔷薇、向日葵、郁金香、白

桑椹)；(D) 树木包括但不限于abelia、杏仁、苹果、杏、arborvitae nigra美国、侧柏、ash、白杨、杜鹃花、秃头柏树、beautybush、山毛榉、桦木、black tupelo、黑莓、蓝莓、黄杨木、七叶树、蝴蝶灌木、胡桃、山茶、楸树、雪松、樱桃、板栗、咖啡树、蟹树、海棠、紫薇、柏树、山茱萸、花旗松、乌木、elder美国、榆树、冷杉、连翘、银杏、goldenraintree、山楂、榛子、铁杉、山核桃、冬青、蜂蜜蝗虫、七叶树板栗、绣球花、杜松、丁香、菩提树、玉兰、枫树、mock橙、mountain ash、橡树、橄榄、桃、梨、山核桃、松树、阿月浑子、梧桐树、李子、杨树、猫鼬、覆盆子、紫荆花、红雪松、红木、杜鹃花、玫瑰沙龙、黄樟、红杉、紫苏、烟树、香草、酸枝、云杉、草莓树、甜灌木、美国梧桐、郁金香树、ciborium、核桃、weasel、柳树、杨梅、金缕梅、榉树；(E) 草、包括但不限于肯塔基蓝草、高羊茅、百慕大草、结缕草、多年生黑麦草、fine fescues (例如cretableng red、chewings、hard、或羊茅)。

[0167] 如上所述，植物、其一部分或植物病原菌暴露于有效量的组合物。如本文公开使用的，意味着足够数量的VOC会影响植物病原菌的杀死或减少其生长。

[0168] 将植物、其部分或植物病原菌暴露于上述组合物可以直接进行或通过使组合物通过例如浸没、涂覆、浸渍、喷雾、蒸发、雾化、散射、喷涂、注射等方式作用于其周围环境、栖息地或储存空间。

[0169] 也可以使用本领域已知的方法将组合物施用于土壤。这些包括但不限于(a) 滴灌或化学处理；(b) 土壤合并；(c) 种子处理。

[0170] 该组合物可用作杀虫剂，特别是可单独使用或与上述一种或多种杀虫剂组合使用并施用于植物、植物部分，用于种植植物或种子的底物的杀虫剂、杀线虫剂、杀真菌剂和杀菌剂。

[0171] 组合物可以与组合物的其它增强化合物组合，例如但不限于氨基酸、壳聚糖、几丁质、淀粉、激素、矿物质、协同微生物以增加功效并促进对植物的益处。

[0172] 本发明组合物的植物病原菌活性以及其发芽抑制活性使得这些组合物是增强收获的植物或植物部分的储存的最佳处理。

[0173] 因此，根据另外的方面，提供一种存储植物或植物部分的方法，该方法包括将收获后植物或植物部分暴露于有效量的组合物(组合物包括轮层炭菌属的生物学上纯的培养物或由生物学上纯的培养物产生的至少一种挥发性有机化合物(VOC))并能够杀灭植物病原菌或减少其生长，从而存储所述植物或植物部分。

[0174] 因此，由真菌产生的真菌和气体可用于抑制或杀死植物病原菌的生长，植物病原菌选自：真菌、细菌、微生物、线虫和昆虫。本文所述的真菌或VOC可用于改善收获的植物材料的储存。或者，真菌和/或VOC可用于处理人或动物废物，例如作为废水或固体废物管理的组分。它们也可用于去除人体和动物废物，例如减少或消除细菌和真菌污染。此外，真菌和/或其VOC可以用于对建筑材料和建筑物中的有毒霉菌进行处理或防止，通过接触建筑物、建筑材料或具有有效量的挥发性副产物的建筑材料之间的空间。

[0175] 根据本发明的另一实施方案，生物学上活性的生物控制剂包含可以用作昆虫或害虫的引诱剂的发射的VOC，例如在陷阱中，以检测或控制昆虫或害虫的侵染，从而防止或减少有害生物在封闭的地方如温室繁殖。

[0176] 根据本发明的一些实施方案，生物学上活性的生物控制剂包含排出的VOC的生物控制剂(可用于含有其它具有抗生素或抗微生物活性的活性化合物的药物和化妆品制剂)，

以及选自载体、着色剂、分散剂、乳化剂、填料、胶凝剂、保湿剂、防腐剂、增溶剂、表面活性剂、增稠剂及其组合。

[0177] 预计在这个应用成熟期间的专利寿命期间,许多相关的运营商将被开发,术语运营商的范围意在包括所有这些新技术a priori。

[0178] 如本文使用的,术语“约”是指 $\pm 10\%$ 。

[0179] 术语“包括”、“包含”、“含有”、“具有”以及它们的组合,意思是“包括但不限于”。

[0180] 术语“组成”是指“包括但不限于”。

[0181] 术语“基本上由...组成”是指组合物、方法或结构可以包括附加成分、步骤和/或部分,但是只有当附加成分、步骤和/或部分不实质地改变所要求保护的组合物、方法或结构的基本和新颖特征时。

[0182] 如本文使用的,除非上下文另有明确规定,单数形式“一”和“该”包括复数。例如,术语“化合物”或“至少一种化合物”可以包括多种化合物,包括其混合物。

[0183] 在本申请中,本发明的各种实施例可以以范围形式呈现。应当理解,范围格式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应被解释为对本发明的范围的僵化限制。因此,应考虑对范围的描述,以具体公开所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,从1到6的范围的描述应被认为具体公开了诸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的个别数字,例如,1、2、3、4、5和6。这适用于范围的宽度。

[0184] 无论何时在这里指出数值范围,都意味着在指定范围内包括任何引用的数字(分数或整数)。短语“第一指示号码和第二指示号码范围/范围之间”和“从第一指示号码到第二指示号码的范围/范围”在本文中可互换使用,并且意在包括第一和第二指示号码以及它们之间的所有分数和整数。

[0185] 如本文使用的术语“方法”是指完成任务的方式、手段、技术和程序,包括但不限于已知或容易从化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域从业者的已知方式开发的方式、手段、技术和程序。

[0186] 如本文使用的,术语“治疗”包括废除、基本上抑制、减缓或逆转病症的进展,基本上改善病症的临床或美学症状或基本上防止出现病症的临床或美学症状。

[0187] 当引用特定的序列表时,这样的引用将被理解为也包括基本上对应于其互补序列的序列,包括由序列错误、克隆错误或导致碱基置换、碱基缺失或碱基添加的其他改变所导致的次要序列变异,条件是这种变异的频率在50个核苷酸中小于1,或者100个核苷酸中小于1个,或者200个核苷酸中少于1个,或者500个核苷酸中少于1个,或者1000个核苷酸中小于1个,或者5,000个核苷酸中少于1个,或者10,000个核苷酸中少于1个。

[0188] 应当理解,为了清楚,在单独实施例的上下文中描述的本发明的某些特征也可以在单个实施例中组合提供。相反,为了简洁起见,在单个实施例的上下文中描述的本发明的各种特征也可以单独提供或以任何合适的子组合提供或适用于本发明的任何其它描述的实施例。在各种实施例的上下文中描述的某些特征不被认为是这些实施例的基本特征,除非该实施例在没有那些元件的情况下不起作用。

[0189] 如上所述和如下权利要求部分所要求保护的本发明的各种实施方案和方面在以下实施例中找到实验支持。

实施例

[0190] 现在参考以下实施例,其与上述描述一起以非限制性方式说明本发明。

[0191] 通常,本文使用的命名法和本发明中使用的实验室程序包括分子、生化、微生物和重组DNA技术。这些技术在文献中有详细解释。例如参见“Molecular Cloning: A laboratory Manual”Sambrook et al., (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volumes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel et al., “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 方法如美国专利No. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659和5,272,057; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Volumes I-III Cellis, J.E., ed. (1994); “Current Protocols in Immunology” Volumes I-III Coligan J.E., ed. (1994); Stites et al. (eds), “Basic and Clinical Immunology” (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W.H. Freeman and Co., New York (1980); 可用的免疫测定在专利和科学文献中广泛描述,例如参见美国专利No. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771和5,281,521; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M.J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, B.D., and Higgins S.J., Eds. (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R.I., ed. (1986); “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984) and “Methods in Enzymology” Vol. 1-317, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., “Strategies for Protein Purification and Characterization—A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996); 所有这些都通过引用并入,如同在此完全阐述一样。本文档中提供了其他一般参考。认为其中的程序在本领域中是众所周知的,并且为了读者的便利而提供。其中包含的所有信息通过引用并入本文。

[0192] 材料和方法

[0193] 真菌分离、维持和生长条件

[0194] 在本研究中使用的黑轮层炭壳分离物的培养物是从位于以色列犹太山脚下的哈埃拉谷的橄榄树 (*Olea europaea* L.) 的小肢体获得的内生植物。木片通过浸入乙醇中表面灭菌10秒,然后燃烧。将小块切割并放置在用12 μ g/mL的四环素 (Sigma, Israel) 修饰的马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA, Acumedia, USA) 上,并在25 $^{\circ}$ C下温育。5天后,将从植物材料出来的分离的真菌菌丝尖端用注射器针头取出并转移到新的PDA-四环素板上。在整个研究中使用单个孢子菌落。将培养物常规维持在PDA-四环素平板上,并在25 $^{\circ}$ C温育。将新鲜真菌菌丝体每2周转移到新的板上。真菌通过在-80 $^{\circ}$ C下在30%甘油中冷冻小琼脂菌或通过25 $^{\circ}$ C下在高压灭菌的甜玉米种子上生长真菌来储存。

[0195] 黑轮层炭壳分离株种植在不同的天然和合成培养基上。所有天然媒体:玉米粉、粉碎的小麦、扁豆、大米、玉米、鹰嘴豆和燕麦,在商店里买到,用水浸泡并高压灭菌。合成媒体:PDA、马铃薯葡萄糖肉汤(PDB)、营养琼脂(NA)、Luria-Bertani(LB)琼脂和胰蛋白酶大豆琼脂购自Acumedia、而利马豆琼脂购自Difco(Michigan,USA)、琼脂水琼脂溶液购自Romical(Be'er Sheva,Israel)。所有合成介质均按照制造商说明书准备。

[0196] 测试真菌:终极腐霉菌,瓜果腐霉菌,烟草赤星病菌pathotype tangelo,尖孢镰刀菌,Fusarium euwallaceae,Fusarium mangiferae,Coniella sp.,Phoma tracheiphila,Colletotrichum sp.,立枯丝核菌,烟草赤星病菌,灰葡萄孢菌,核盘菌,指状青霉菌,可可毛色二孢菌,Neoscytalidium dimidiatum and黑曲霉,在PDA上用12 μ g/mL四环素修饰的PDA生长,并在25 $^{\circ}$ C温育,除了在没有四环素的PDA上生长的Pythium sp.。

[0197] 真菌DNA的分离

[0198] 用无菌手术刀切割在25 $^{\circ}$ C下在PDA上生长的单孢子菌丝体培养物的7-天-醇d的正方形(0.5cm²),并从每片的底部刮下琼脂以排除尽可能多的琼脂。使用研钵和研杵在液氮中均质。然后使用GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit(Sigma)根据制造商的说明书提取DNA。内部转录间隔基-5.8S rDNA和部分肌动蛋白基因的扩增在下文进一步描述。黑轮层炭壳生物活性实验

[0199] 使用“夹心法”检查黑轮层炭壳挥发物的活性。在这种方法中,黑轮层炭壳与测试真菌之间不能直接接触。因此,前者对后者生长的影响仅仅是由黑轮层炭壳产生的挥发物自由扩散穿过板。将含有黑轮层炭壳菌丝体的PDA插头加入到含有5mL PDB或任何其它待检测生长培养基的50mm培养皿中,并在25 $^{\circ}$ C下生长3-4天。然后,将含有试验真菌菌丝体的PDA插头添加到另一个含有PDA的50mm培养皿中,将具有试验真菌的PDA培养皿放在含有培养皿的黑轮层炭壳的顶部。两种培养皿均没有使用石蜡膜连接,并在25 $^{\circ}$ C下生长。2天后,检查了黑轮层炭壳对测试真菌的影响,并与黑轮层炭壳不存在相同的测试真菌的生长进行了比较。所有实验一式三份进行。

[0200] 黑轮层炭壳对各种植物致病性真菌的抑制作用如上所述进行了检查,除了在添加测试真菌之前生长6天的黑耳壳炭壳,并且在孵化6天后检查了抑制作用。在测定结束时,通过将接种物塞转移到新鲜的PDA平板上并观察在接下来的两天内发育的生长来评估每个测试真菌的存活力。

[0201] 支持黑轮层炭壳生长和活性的温度范围如下:黑轮层炭壳在不同温度下在含有5mL PDB的50mm培养皿中生长:10、15、18、20、22和25 $^{\circ}$ C并监测生长6天。对于在15和18 $^{\circ}$ C的活性测试,黑轮层炭壳在加入黑曲霉作为试验真菌之前,在这些温度下,在含有5mL PDB的50mm培养皿中生长7天。两种真菌如上所述连接在“夹心法”中,4天后监测试验菌的生长,并与在不存在黑轮层炭壳的相同条件下生长的黑曲霉的生长进行比较。类似地进行10 $^{\circ}$ C下的活性测试,除了测试真菌是A.alternata,B.cinerea和P.digitatum而不是黑曲霉,因为即使在没有挥发物的情况下,它们也不在10 $^{\circ}$ C生长,并且黑轮层炭壳生长约1个月,然后引入测试真菌,这些真菌暴露于黑轮层炭壳挥发物13天。

[0202] 商业上购买了有机的干梅、葡萄干和杏。在密封的1L盒中进行实验(一式三份,2次生物重复)。每个盒子包含零、一个或两个50毫米培养皿、含有5毫升的PDB和一个黑轮层炭壳塞子。真菌在25 $^{\circ}$ C下在密封箱中长3-4天。然后,将每个干果的120g在室温下用过量的无

菌双蒸水温育3-4小时。接着,将膨胀的干果放入50毫升培养皿(每种类型到不同的板),并放置在包含黑轮层炭壳的盒子中或者没有真菌的控制箱中。将箱子在25℃下进行进一步温育6-9天,然后估计从膨胀的干果中的真菌外观。

[0203] 在5mL无菌双蒸水的存在下,花生在商业上购买并预先安排在50mm培养皿(每片4片花生,一式三份,2次生物学重复)中。然后,将所有花生接种为*A.niger*分生孢子悬浮液(10^6 分生孢子/mL)的滴剂(10 μ L,每花生3滴)。接下来,将每个花生培养皿转移到密封的1L盒子中,该盒子包含零、一或两个含有黑轮层炭壳的50mm培养皿,其在25℃下预生长3-5天。将箱子在25℃下进行进一步孵育10天,然后估计花生上的黑曲霉发育。

[0204] 挥发物鉴定

[0205] 黑轮层炭壳在密封的固相微萃取(SPME)20mL小瓶中在PDB(5mL)上生长。将生长的菌丝体塞插入每个小瓶中,并在25℃温育3天。将小瓶预热至40℃15分钟,然后将具有65 μ m PDMS/DVB/CAR纤维(聚二甲基硅氧烷/二乙烯基苯/羧基)(Supelco,PA)的自动HS-SPME MPS2(Gerstel,Mülheim,Germany),USA)插入样品顶部空间25分钟。将暴露的SPME注射器引入GC-MS装置的注射器端口10分钟。在装有Rxi-5 SIL MS(30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m)熔融石英毛细管柱(Restek)的GC-MSD装置(6890/5973N Agilent Technologies CA,USA)上分析挥发性化合物。使用氦气(9.1持续压力)作为载气。注射器温度为250℃,用于不分流注射。将烤箱设定为50℃1分钟,然后以5℃/min的速度将温度升至180℃,然后以25℃/min升至280℃。检测器温度为280℃。记录质量范围为41~350m/z,电子能量为70eV。在上述保留指数测定条件下,将直链烷烃(C7-C23)的混合物注入柱中。使用ChemStation软件分析GC-MS谱图。通过比较其挥发物的保留指数与文献以及比较光谱数据与标准或与W9N08和HPCH2205 GC-MS文库以及NIST Mass Spectral Library,Ver.2.0D,来识别挥发物。在仅含有PDB的SPME小瓶上进行相应的分析,并从在含有真菌的小瓶上进行的分析中减去从其得到的化合物。

[0206] 对于定量分析,通过在注射前将13g样品和5g NaCl与氯苯混合到GC-MS中来制备样品。所有样品都是重复制备的。对于化合物:3-甲基-1-丁醇、(±)-2-甲基-1-丁醇、4-庚酮、乙酸异戊酯和反式-2-辛烯醛,确证通过比较从Sigma获得的可用真实标准的GC-MS数据与真菌产品的GC-MS数据进行确认鉴定。

[0207] 化学混合物生物活性试验

[0208] 所有化合物均购自Sigma(Rehovot,Israel),纯度最高。混合物对所鉴定的VOC的生物活性测定如下:将含有15mL培养基(用12 μ g/mL四环素修饰的PDA)的培养皿(90mm,80mL空气体积)接种(一式三份,每个2个塞子)测试真菌*A.alternata*和*B.cinerea*(在同一板)、*P.digitatum*和黑曲霉(在单独的板中)。将一杯Eppendorf管放置在板的中间,加入增加体积(0-200 μ L)的混合物。然后,用石蜡膜密封板,并在室温下温育两天,然后将这些板中的测试真菌的生长与对照板在不存在混合物的情况下进行比较。如上所述测定混合物A和混合物B以控制其他植物致病性真菌的能力,除了混合物的浓度恒定(1mL/L),并且在6天后估计生长抑制率。如对黑轮层炭壳所述,检查暴露于混合物后测试真菌的活力。

[0209] 如混合物所述,分别检查混合物的每种化学成分的活性。“混合物A”体积为16、16、32,3-甲基-1-丁醇、(±)-2-甲基-1-丁醇、4-庚酮和乙酸异戊酯的体积分别为和16 μ L。对于“混合物B”,对于4-庚酮和反式-2-辛烯醛,其体积为40 μ L。

[0210] 在4, 10, 15, 18, 20, 22和25℃的温度范围内检测了混合物抑制*A. alternata*, *B. cinerea*, *P. digitatum*和*A. niger*生长的能力。实验在密封的1L箱(每个温度3箱)中进行。每个箱子包含4个PDA培养皿(每个试验真菌一个),没有盖子,混合物位于箱子的相对侧。将“混合物A”(1mL/L)沉积在小瓶(12×35mm, Fisher Scientific)中,而将“混合物B”(0.05mL/L)放置在实验室吸收纸(8×3cm)上。对于每个温度,制备了在不存在混合物的情况下含有四种测试真菌的三倍体的控制箱。在评估真菌生长之前将箱子孵育两周。

[0211] 在50毫米培养皿(每板8克小麦,一式三份,2次生物重复)中商购并预先安置小麦籽粒。每个密封的1L箱子包含一个带小麦的培养皿、一个培养皿和5mL蒸馏水,一块实验室吸收纸(8×3cm)吸收了0、0.25、0.5或1mL/L的“混合物A”或“混合物B”。将箱子在25℃下孵育10天,然后目视评估小麦籽粒的真菌外观。

[0212] 混合物对花生*A. niger*发育的影响如下:在5mL无菌双蒸水的存在下将花生(每片4片,一式三份,2次生物重复)在密封的1L盒中孵育,在室温下存在含有1mL/L“混合物A”的小瓶(12×35mm)。一半的花生用如上所述的黑曲霉分生孢子悬浮液(106分生孢子/mL)预接种。接种的或未接种的对照花生在不存在混合物的情况下在相同的条件下孵育。10天后评估黑曲霉的内在和人工发育。同样检查“混合物B”,除了孵育时间为8天,而不是小瓶将混合物沉积在浓度为0、0.05、0.25和0.5的实验室吸收纸(8×3cm)上mL/L,并且花生没有人工接种黑曲霉,而是真菌发育来自内在的来源。单个化合物对花生萌发和黑曲霉发育的影响如下:花生(在5mL蒸馏水存在下,每个50mm培养皿中的4个花生)置于密封的1L盒(2培养皿每箱)。化学化合物(3-甲基-1-丁醇、(±)-2-甲基-1-丁醇、4-庚酮(0、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25mL/L)和乙酸异戊酯)分别沉积在分开的小瓶(12×35mm)中。如上所述,将一半花生(每个盒中一个培养皿中的4个花生)人工接种为黑曲霉。将箱子在室温下孵育一周,之后估计花生萌发和黑曲霉的建立。除了化合物浓度为1mL/L,花生不接种黑曲霉以外,反式-2-辛烯醛对花生萌发的影响进行了类似的检测,孵育时间为4天。

[0213] 线虫制备

[0214] 爪哇根结线虫在温室生长的线虫易感番茄*Lycopersicon esculentum* cv上繁殖。通过蔗糖漂浮,通过0.05% (v/v) 次氯酸钠(NaOCl)从根中大量提取“Avigail 870”(Hazera, Shikmim, Israel)和线虫卵,并通过300、60和30μm尼龙网,AD Sinun Technologies, Petach Tikvah, Israel),允许在下筛中收集纯蛋溶液。对于第二阶段青年孵化,在无菌黑暗条件下,将提取的蛋放置在0.01M MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸水合物)(Sigma)缓冲液中的30μm(AD Sinun Technologies)开放筛上,孵育2h收集进一步实验。对于土壤接种试验,感染严重的番茄根cv.“Avigail 870”(Hazera)在Waring(Waring, Torrington, CT)商业搅拌机中高速加工2分钟。如上所述,使用0.05% (v/v) 次氯酸钠(NaOCl)提取来取少量的混合根来评估蛋的浓度。在以下实验中将掺合的根用于土壤接种。

[0215] 使用黑轮层炭壳培养物设置体外实验

[0216] 为了体外研究黑轮层炭壳对*M. javanica* J2的杀线虫活性,真菌的纯培养板如下制备:将黑轮层炭壳的塞子转移到含有5mL的50mm培养皿中马铃薯葡萄糖肉汤(PDB, Acumedia, USA),让其生长4-5天,用于随后的实验。如上所述获得*M. javanica*或第二阶段幼体(J2)。在密封的1L盒中进行体外试验(每次处理的重复,3次独立实验),其中没有放置其盖子的黑轮层炭壳的1-3个培养板。将每个含有300*M. javanica* J2幼虫的0.5毫升0.01M

MES的五个小瓶(12×35mm,Fisher Scientific)也经过每个密封的盒子。为了保持潮湿环境,每个密封箱装有5毫升无菌双蒸水。将5mL用黑曲霉新鲜塞子培养的PDA板加入每个密封的盒子中。以前报道了黑轮层炭壳对黑曲霉的抑制作用,并且在本系统中被用作阳性内部对照,而没有发现黑曲霉对J2活力的影响(数据未显示)。携带所述生物制剂的密封盒在计数J2活的幼虫之前孵育2天。所有孵育在 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的黑暗中进行。

[0217] 使用合成化合物混合物的体外实验

[0218] 所有化合物均购自Sigma(以色列),纯度最高。合成混合物包含以下化合物:3-甲基-1-丁醇、(±)-2-甲基-1-丁醇、4-庚酮和乙酸异戊酯,其比例为1:1:2:1。每个密封的1L盒子如上所述排列,除了将合成混合物(1mL/L)代替黑轮层炭壳培养物质板装载到一个单个小瓶(12×35mm,Fisher Scientific)中,而不使用黑曲霉培养板。将盒(每个处理的重复物,3个独立实验)密封并在计数之前如上所述进行温育。每个化合物的单个杀线虫活性的测定如合成混合物所述进行,除了每个盒(重复,3个独立实验)包含装有合成混合物中使用的化学品的相对量的一个小瓶:3-甲基-1-丁醇,(±)-2-甲基-1-丁醇,4-庚酮和乙酸异戊酯分别为161.8、163.8、326.8和175.2mg。为了测定4-庚酮的杀线虫活性,使用以下处理(326.8mg 4-庚酮,重复,3次独立实验):a)在4-庚酮存在下孵育线虫24小时,b)在不存在化合物的情况下孵育线虫24小时,c)在4-庚酮存在下孵育线虫24小时,然后在不存在化合物的情况下转移线虫以在新的盒子中回收24小时,d)在4-庚酮存在下孵育线虫48小时,e)在不存在化合物的情况下孵育线虫48小时。如上所述,用线虫和水制备盒子。所有孵育在 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的黑暗中进行。

[0219] 为了研究真菌和合成混合物对*M. javanica*卵孵化的影响,测定了如上所述使用NaOCl方法提取由卵浓度决定的*M. javanica*卵悬浮液。对于实验设置,密封的1L盒子排列如下:将含有5mL无菌双蒸水H₂O作为湿度源的控制箱,5个小瓶(12×35mm,Fisher Scientific),每个含有0.5mL中800M.*javanica*的0.01M MES,和一个具有5mL PDA和新鲜黑曲霉的未覆盖的50mm培养皿。如对于对照所述制备含有黑轮层炭壳和合成混合物的盒子,不同之处在于,没有其前盖的盖子,添加了预先生长5天的黑轮层炭壳的3个培养板,并将一个50mm培养皿制备含有125毫克含有250微升合成混合物的珍珠岩颗粒。将盒(每次处理的重复,3次独立实验)孵育2天。然后,从装有30μm过滤器(AD Sinun Technologies)的小瓶中收集*M. javanica*卵,并插入含有0.01M MES缓冲液(900μL)的15mL猎鹰管中,以便在完成对挥发物的暴露之前丢弃所有孵出的幼虫。孵育3小时后,将过滤器除去如上所述含有新鲜MES缓冲液的新的15mL猎鹰管,并另外孵育2天。使用如下所述的血细胞计数器对从卵中暴露于挥发物2天孵出的活的幼虫进行计数。所有孵育在 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的黑暗中进行。

[0220] 线虫活力-在孵化时间结束时评估第二阶段juveniles活力,所有线虫都装载在30μm过滤器(AD Sinun Technologies)上,允许活的幼虫通过。将幼虫(J2)在 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的黑暗中在过滤器上孵育3小时,并且使用线虫Precision Chambered(Chalex LLC,Portland,USA)对能够积极地过滤的活线虫计数并倒置显微镜(Wilovert Standard,Helmut Hund GmbH,Wetzlar,Germany)。

[0221] 土壤实验设置

[0222] 珍珠岩颗粒在珍珠岩颗粒和混合物之间以1:1的比例加载浓度越来越高的合成混合物(0、0.08、0.17、0.25、0.33、0.5μL/g土壤)。然后,将装载的颗粒倒入预先填充有60g

10%潮湿壤土(Givat Ada, Israel)的50mL塑料杯中。在加入*M. javanica* J2幼虫(500mL, 0.5mL, 0.01M MES)之前,将杯子(每个浓度5杯,2次独立实验)彻底摇匀到土壤顶部的小坑。将杯密封并在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 的黑暗中孵育2天。通过使用Bearnann仪器确定可行的J2线虫。

[0223] 温室实验设置

[0224] 在加入含有缓释肥料(**Osmocote[®]**, **Scotts[®]** Australia)的10%潮湿壤土(800g)之前,将合成混合物的0或400 μL (每个浓度为10个盆)的珍珠岩颗粒(400mg/罐)装载,摇匀至匀浆。然后,通过加入4000M *M. javanica*幼虫(在5mL的0.01M MES中)将10盆(5个混合物和5个混合物)幼苗接种,而另外10个盆(5个混合物,5个没有混合物)使用5毫升线虫接种根(相当于约4000M. *javanica*卵)的悬浮液进行接种。将所有的罐密封并在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 的黑暗中孵育3天。接下来,移除盖子并种植易感番茄幼苗(4周龄)“Avigail 870”(Hazera)。在症状评估之前,将幼苗在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (16/8小时日/夜)生长7周,每天灌溉20mL水。温室实验的第二次重复如上所述进行,除了在添加合成混合物之前3天用线虫(J2幼虫或线虫接种根的悬浮液)接种土壤。然后,将线虫接种的土壤和挥发性混合物混合,密封,并在黑暗在番茄种植前在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 下孵育另外3天。如上所述,将幼苗生长8周。

[0225] 在实验结束时,从盆中收获植物及其根系。为了评估根部的疾病发展,从洗涤的根系中小心地去除了土壤碎屑,并根据根重量进行肉眼评估根系的发生。为了评估根系上的线虫繁殖,从每根根中提取*M. javanica*卵,并进行计数。计算每克根的卵数比。

[0226] 实施例1

[0227] 该实施例证实黑轮层炭壳的分离。

[0228] 黑轮层炭壳作为内生植物从橄榄树(*olea europaea*L)的肢体获得。通过在乙醇中浸没10秒钟将木材片材表面灭菌,然后燃烧。将小块切割并放置在PDA板(Acomedia, Lansing, MI, USA)上。将板在 25°C 下孵育。五天后,真菌菌丝从PDA上的植物材料中出现。用注射器针头取出分离的菌丝尖,并转移到新的PDA板上。在整个研究中使用单个孢子菌落。当黑轮层炭壳分离物的培养板打开时,检测到强烈的、甜的和果香的气味。

[0229] 实施例2

[0230] 该实施例证实黑轮层炭壳的真菌DNA的分子鉴定。

[0231] 用无菌手术刀切割在 25°C 下生长在PDA上的14天龄、纯的单孢子真菌培养物菌丝体的正方形(0.5cm²),并从每片的底部刮下琼脂,以排除尽可能多的琼脂。在使用研钵和研杵的液氮存在下研磨碎片。然后根据制造商的说明书使用GenElute[™]植物基因组DNA Miniprep试剂盒(Sigma, Rehovot, Israel)提取DNA。提取的DNA样品用于PCR扩增。内部转录间隔序列(ITS)5.8SrDNA和肌动蛋白基因的扩增如下进行:使用引物为ITS1(5' TCCGTAGGTGAACCTGCGGG 3', SEQ ID NO:3)和ITS4(5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3', SEQ ID NO:4)的PCR扩增ITS区域。使用引物为ACT512F(5' ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC 3', SEQ ID NO:5)和ACT783R(5' TACGAGTCCTTCTGGCC-CAT 3', SEQ ID NO:6)的PCR扩增部分肌动蛋白基因。PCR步骤在含有从真菌培养物提取的10ng DNA、1 μL (10 μM)引物ITS1/ACT512F和1 μL (10 μM)引物ITS4/ACT783R(Sigma Genesis, Rehovot, Israel)、0.125 μL (0.625u) DreamTaq[™]DNA聚合酶(Fermentas, Vilnius, Lithuania)、补充其缓冲液(每个反应2.5 μL)、dNTP(各2.5mM)和PCR级ddH₂O(Fisher Scientific, Wembley, Western Australia)的25 μL 反应混合物中进行。PCR扩增在Biometra Personal Cycler(Goettingen, Germany)中进行。

[0232] ITS的PCR反应程序如下:96℃5分钟,然后进行35个循环,96℃45秒,55℃45秒,72℃1分钟,然后72℃步骤5分钟。肌动蛋白的PCR反应程序与ITS的PCR程序相似,除了变性温度为95℃,退火温度为61℃,循环次数为40。根据制造商的说明书,ITS和肌动蛋白的PCR产物(分别~500 bp和~200 bp)使用DNA Clean and Concentrator™Kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA, U.S.A) 纯化。将纯化的产物用于直接PCR测序 (Macrogen)。所得到的序列表明所测试的真菌是Daldinia属的成员;ITS 5.8S rDNA区域和肌动蛋白基因都显示出与GenBank中发表的黑轮层炭壳的100%同一性(99%覆盖率)。2008年6月23日,根据布达佩斯条约,在CBS123047轮层炭菌属OBROB1A的保护培养部分的CBS培养物中保藏真菌的培养物。

[0233] 实施例3

[0234] 该实施例证实使用黑轮层炭壳的定性GC/MS分析鉴定挥发性有机化合物。

[0235] 黑轮层炭壳在密封的固相微萃取 (SPME) 20mL小瓶中在PDB(5mL) 上生长。将生长的菌丝体的塞子放在每个小瓶中,并在25℃下孵育至少三天。在50℃下通过65µm PDMS/DVB/CAR纤维(聚二甲基硅氧烷/二乙烯基苯/羧基) (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA), 通过自动HS-SPME(顶空固相微萃取) 将挥发物吸附30分钟。将纤维插入到GC-MS的注入口中5分钟(不分流),用于解吸挥发物。根据表1所述的条件进行GC-MS分析。

[0236] 表1

[0237]

气相色谱仪	Agilent GC-MSD系统 (CA, USA) 型6890或GCMS-TD型7890
柱	Rxi-5sil MS (Restek Bellefonte, PA, USA)
注射器温度	250℃
烘箱温度	50℃ (1min), 5℃/min至180℃, 25℃/min至280℃
质量范围	41-350
气体	恒压9.1psi
孵育-SPME	在40℃孵育15分钟,提取25分钟
解吸时间-SPME	5min不分流
EMV型	相对, 70eV
MS源, Quad辅助温度	230℃, 150℃, 280℃

[0238] 化合物的鉴定是通过比较其相对保留指数和具有真实标准或文献中发现的和补充有Wiley8、Nist9、HC2205和KI文库的质谱来进行的。

[0239] 在仅含有PDB的SPME小瓶上进行可比较的分析,并从在含有黑轮层炭壳的小瓶中获得的化合物中减去这些化合物。通过比较真实商业标准的GC/MS数据和公布的保留指数与真菌挥发物的数据,对所选化合物进行最终确认鉴定。

[0240] 如下表2所示,鉴定了27种不同的化合物,可分为几类化学物质:醇类、二烯类、酮类、醛类和倍半萜烯。八种化合物通过GC/MS分析建议:甲基-1,4-环己二烯、苯乙醇、3-甲基-1-丁醇、(±)-2-甲基-1-丁醇、4-庚酮、3-甲基-2-萘酚、乙酸异戊酯和反式-2-辛烯醛可商购。应该注意,尽管真菌发出未知立体化学的2-辛烯醛,但反式-2-辛烯醛实际上是经过测试的,因为只有后者的异构体是可商购的。测试了这些化合物控制A.niger、B.cinerea、A.alternata和P.digitatum生长的能力。发现只有苯乙醇和3-甲氧基-2-萘酚不能抑制真

菌生长。一种化合物,甲基-1,4-环己二烯,对A.niger和P.digitatum表现出较差的生长抑制率,分别为10.8%和3.1%,因此本研究未进一步纳入。最后鉴定剩余的五种化合物:3-甲基-1-丁醇,(±)-2-甲基-1-丁醇、4-庚酮、乙酸异戊酯和反式-2-辛烯醛,通过与真实标准的比较来完成。标准只对前三种化合物的真菌产品产生的相同的保留时间和质谱,而提醒后两种化合物只是在数据库比较的基础上暂时确定。对于3-甲基-1-丁醇、(±)-2-甲基-1-丁醇和4-庚酮,验证化合物的丰度分别为5.9、2.4和0.08ppm。有趣的是,与Muscodor albus相比,另一种挥发性有机物排放内生真菌(可能的致癌萘的存在[23])在黑轮层炭壳VOCs中没有被确定

[0241] 表2

[0242]

保留时间 (min)	建议化合物*	分子式	Maine 片段 (m/z)	面积 (%)	MW
2.2	3-甲基-1-丁醇	C ₅ H ₁₂ O	42, 55 , 57, 70	1.0	88
2.25	2-甲基-1-丁醇	C ₅ H ₁₂ O	41, 56, 57 , 70	1.1	88
2.7	1-甲基-1,3-环己二烯	C ₇ H ₁₀	77, 79 , 91,	6.5	94

[0243]

			94		
2.8	1-甲基-1,4-环己二烯	C ₇ H ₁₀	77, 79 , 91, 94	3.9	94
4.1	4-庚酮	C ₇ H ₁₄ O	43 , 71 , 114	0.2	114
4.3	乙酸异戊酯	C ₇ H ₁₄ O ₂		痕迹量	130
5.2	4-庚炔-2-醇	C ₇ H ₁₂ O	45, 53, 67 68 , 97, 112	4.2	112
5.5	2-辛烯醛	C ₈ H ₁₄ O	42, 55, 57 84, 98, 126	33.3	126
6.3	辛醛	C ₈ H ₁₆ O	69, 71, 72 83, 84, 95 110, 128	4.7	128
7.2	4,4-二甲基-1,3-环戊二酮	C ₇ H ₁₀ O ₂	41, 56 , 126	4.0	126
7.7	2,2,5-三甲基环戊酮	C ₈ H ₁₄ O	41, 56 , 126	16.5	126
10.5	苯乙醇	C ₈ H ₁₀ O	65, 91 , 92, 122	1.9	122
18.2	β-榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	41, 53, 55, 67, 68, 79, 81, 93 , 107, 121, 133, 135, 147, 149, 161, 189, 204	0.06	204
18.4	β-榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	41, 53, 55, 67, 68, 79, 81, 93 , 107, 121, 133, 135, 147, 149, 161, 189, 204	1.0	204
19.4	(+)-α-柏木萜烯	C ₁₅ H ₂₄	-	痕迹量	-
19.6	α-愈创木烯	C ₁₅ H ₂₄	41, 53, 55, 67, 79, 81, 93 , 105 , 121, 133, 147, 161, 189, 204	0.1	204
19.9	2-(4-羟苯基)乙醇	C ₈ H ₁₀ O ₂	?	0.08	204

[0244]

20.7	萜烯	$C_{10}H_{10}O_3$	108, 136 , 137, 163, 178	9.0	178
21.0	β -芹子烯	$C_{15}H_{24}$	41, 53, 55, 67, 79, 81, 91, 93, 107 , 121, 133, 147, 161, 175, 189, 204	0.7	204
21.2	α -芹子烯	$C_{15}H_{24}$	41, 53, 55, 67, 79, 81, 91, 93, 107, 121, 133, 147, 161, 175, 189 , 204	0.2	204
21.4	α -愈创木烯	$C_{15}H_{24}$	41, 53, 55, 67, 79, 81, 91, 93, 107 , 121, 133, 147, 161, 189, 204	0.7	204
21.6	大根香叶烯 A	$C_{15}H_{24}$	-	痕迹量	-
21.8	7-表- α -芹子烯	$C_{15}H_{24}$	-	痕迹量	-
22.0	胡萝卜-4(11),8-二烯	$C_{15}H_{24}$	-	痕迹量	-
22.9	藜芦酮	$C_{11}H_{14}O_3$	-	痕迹量	-
25.1	3-甲氧基-2-萘酚	$C_{11}H_{10}O_2$	77, 131, 159, 174	1.6	174
25.2	刺蕊草醇	$C_{15}H_{26}O$	41, 53, 55, 71, 81, 93, 107 , 121, 131, 147, 161, 189, 204	1.2	222

[0245] *鉴定是根据NIST Mass Spectral Library, ver.2.0d进行的

[0246] 实施例4

[0247] 该实施例证实使用“夹心法”检验黑轮层炭壳及其混合物的抗菌活性。

[0248] “夹心法”允许黑轮层炭壳与测试真菌之间没有直接的联系。因此,前者对后者生长的影响仅仅是由于自由扩散穿过板的黑轮层炭壳产生的挥发物。

[0249] 将含有黑轮层炭壳菌丝体的PDA插头加入到含有5mL PDB的50mm培养皿中,并在25℃下生长三天以完全抑制黑曲霉或四天以完全抑制烟草赤星病菌,灰葡萄孢菌,指状青霉

菌。然后,将含有试验真菌菌丝体的PDA插头添加到另一个含有PDA的50mm培养皿中,将具有试验真菌的PDA培养皿放在含有培养皿的PDB的顶部。两种培养皿均不用盖子连接,使用石蜡膜,并在25℃下生长。2天后,检查了黑轮层炭壳对测试真菌的影响。类似地检查了黑轮层炭壳对各种致病真菌的抑制作用,除了在添加测试真菌之前黑黑壳炭壳生长6天,并且在孵育6天后检查抑制作用。在测定结束时,通过将接种物塞塞转移到新鲜的PDA板上,同时观察未来两天内发育的生长,来评估每个测试真菌的存活力,如表3所示。

[0250] 表3

[0251]

病原	Daldinia		"混合物 4"*		"混合物 21"*	
	生长抑制率	生活力	生长抑制率	生活力	生长抑制率	生活力
终极腐霉菌	30.80	+	96.67	-	96.67	-
瓜果腐霉菌	9.60	+	93.33	-	96.67	-
烟草赤星病菌 pathotype tangelo	100.0	-	100.0	-	100.0	-
尖孢镰刀菌	69.60	+	95.92	+	100.0	-
<i>Fusarium euwallaceae</i>	81.60	+	96.96	+	100.0	-
<i>Fusarium mangiferae</i>	100.0	+	100.0	+	100.0	-
<i>Coniella sp.</i>	100.0	+	100.0	+	100.0	-
<i>Phoma tracheiphila</i>	100.0	-	100.0	-	100.0	-
<i>Colletotrichum sp.</i>	100.0	+	100.0	+	100.0	-
立枯丝核菌	100.0	-	98.0	+	100.0	-
烟草赤星病菌	100.0	-	100.0	-	100.0	-
灰葡萄孢菌	100.0	+	100.0	-	100.0	-
核盘菌	100.0	-	100.0	-	100.0	-
指状青霉菌	100.0	-	95.0	+	100.0	-
可可毛色二孢菌	0.0	+	95.0	+	100.0	-
<i>Neoscytalidium</i>	100.0	-	94.0	+	100.0	-

[0252]

<i>dimidiatum</i>						
黑曲霉	100.0	-	98.0	+	100.0	-

[0253] “混合物4”含有包含3-甲基-1-丁醇、(±)-2-甲基-1-丁醇、4-庚酮和乙酸异戊酯的生物控制剂,其比例为1:1:2:1。

[0254] “混合物21”含有比例为1:1的4-庚酮和反式-2-辛烯醛的生物控制剂。

[0255] 实施例5

[0256] 该实施例证实检查黑轮层炭壳在各种温度下的生物活性。

[0257] 在各种温度下检查黑轮层炭壳的生物活性,以评估在温度控制储藏室中使用真菌的能力。黑轮层炭壳能够生长并完全抑制测试真菌烟草赤星病菌,灰葡萄孢菌和指状青霉菌的最低温度为10℃。

[0258] 实施例6

[0259] 该实施例证实黑轮层炭壳针对黑曲霉(*A.niger*)的生物活性。

[0260] 在不同体积的密封盒中检查黑轮层炭壳的生物活性。将含有5mL PDB的50mm培养皿和含有黑轮层炭壳菌丝体的PDA插头位于小(2.3L)、中等(7L)和大(14L)密封的盒子中,使其在25℃下无盖生长三至五天。然后,将含有黑曲霉菌丝体的PDA插头转移到含有PDA的不同的50mm培养皿中,并将PDA培养皿快速插入含有黑轮层炭壳的密封盒中,并在25℃下孵育7-10天。类似于“夹心法”,在这种测定中,黑轮层炭壳与试验菌之间没有直接的联系,只有前者的挥发性有机化合物才会影响后者的生长。

[0261] 黑轮层炭壳在一个(中小盒子)或两个(大盒子)50毫升包含在添加试验菌前四天生长的黑轮层炭壳的Petri板的条件下完全抑制黑曲霉的生长。

[0262] 实施例7

[0263] 该实施例证实黑轮层炭壳对食品扰流板的抗微生物活性的效果。

[0264] 检查黑轮层炭壳的生物活性,以防止存在微生物的有机干果。通过将果实浸泡在无菌双蒸水中3小时,然后在25℃温育6-9天,实现了有机干葡萄干和杏子上病原真菌的出现。

[0265] 结果如图5A-C所示,其中图5A表示无黑轮层炭壳的干果;图5B表示在含有在PDB上生长的黑轮层炭壳的一个50mm培养皿存在下的干果;图5C表示在含有在PDB上生长的黑轮层炭壳的两个50mm培养皿存在下的干果。

[0266] 图5A-C显示了这些水果上的病根真菌,如*Rhizopus sp.*、*Penicillium sp.*、和*Aspergillus sp.*。将膨胀的水果暴露于4天龄的在如图5B所示的或者如图5C所示的两个含有5mL消除了所有病原真菌的出现的PDB的50mm培养皿中生长的黑轮层炭壳培养物中。生物测定在密封的1L盒中进行,防止黑轮层炭壳与被检查的水果之间的直接接触。

[0267] 进一步研究了黑轮层炭壳的生物活性,反映了指状青霉菌(以下称为*P. digitatum*)在番茄酱上的生长。用4-6点*P. digitatum*菌丝接种商业番茄酱,25℃温育。

[0268] 结果如图6A-C所示,其中图6A表示在没有黑轮层炭壳的情况下接种番茄酱;图6B表示在含有在PDB上生长的黑轮层炭壳的一个50mm培养皿存在下接种的番茄酱;图6C表示在含有在PDB上生长的黑轮层炭壳的两个50mm培养皿存在下接种的番茄酱。

[0269] 三天后,如图6A所示,*P. digitatum*菌丝体覆盖番茄酱的表面。然而,在4天龄的在如图6B所示或两个如图6C所示的含有5mL PDB的50mm Petri板上生长的黑轮层炭壳培养物中未观察到病原真菌菌丝体。

[0270] 进一步研究了黑轮层炭壳的生物活性,以抵抗黑曲霉在花生上的生长。将花生置于含有5mL水的50mm培养皿中,并接种滴液(10μL;每花生3滴)分生孢子悬浮液(10^6 分生孢子/mL),并在25℃温育。

[0271] 结果如图7A-C所示,其中图7A表示在没有黑轮层炭壳的情况下接种的花生;图7B表示在含有在PDB上生长的黑轮层炭壳的一个50mm培养皿存在下的接种花生;图7C表示在两个含有在PDB上生长的黑轮层炭壳的50mm培养皿的存在下接种的花生。

[0272] 10天后,如图7A所示,所有的花生都被发芽并覆盖有黑曲霉。5天龄的的生长在如图7B所示或两个如图7C所示含有5毫升PDB的50mm培养皿中的黑轮层炭壳培养物防止了在花生上生长黑曲霉,然而,黑轮层炭壳不影响花生发芽。

[0273] 进一步研究了黑轮层炭壳的生物活性,针对橙子上的*P. digitatum*的生长。将橙子用密封的2L盒子接种,其不含黑轮层炭壳或存在在25℃下生长的4天龄的黑轮层炭壳培养物。

[0274] 参照图8A-D,其中图8A表示在没有黑轮层炭壳的情况下接种的桔子;图8B表示在含有在PDB上生长的黑轮层炭壳的一个50mm培养皿存在下接种的橙子;图8C表示在含有在PDB上生长的黑轮层炭壳的两个50mm培养皿存在下接种的橙子;图8D表示在含有在PDB上生长的黑轮层炭壳的三个50mm培养皿存在下接种的橙子。

[0275] 通过在预伤害的皮肤上沉积10 μ L孢子悬浮液(10⁴孢子/mL)并在25℃下孵育17天进行接种。如图8A-D所示,只有三个黑轮层炭壳培养皿消除了*P. digitatum*生长,而一个或两个真菌培养皿的存在导致相对于对照的症状减少。

[0276] 实施例8

[0277] 该实施例证实黑轮层炭壳对植物致病性线虫的抗微生物活性的效果。

[0278] 根据植物致病性线虫爪哇根结线虫的J2幼虫检查黑轮层炭壳的生物活性。黑轮层炭壳在25℃下在含有5mL PDB的一个、两个或三个50mm培养皿中培养5天。然后,在1L密封箱中,将300M. javanica J2幼虫引入真菌VOC中,并在25℃的黑暗中孵育。两天后,将幼虫转移到20 μ m的过滤器中,并在25℃下在黑暗中孵育3小时。这种过滤区分活的和死的幼虫-只有活的幼虫会主动通过过滤器,而死亡的幼虫会粘在过滤器上。在孵化结束时只计数活的幼虫。如图9所示,黑轮层炭壳大大减少了M. javanica幼虫数量,并在黑轮层炭壳的培养皿已经有了这一效果。

[0279] 实施例9

[0280] 该实施例证实了发射的VOC与农业病原体和害虫如真菌和线虫的混合物的抗微生物活性的效果。

[0281] 如表3所示,对“混合物4”的抗菌活性进行了测试。“混合物4”的抗菌活性也在四种植物致病性真菌的各种温度下进行了检验:*A. niger*、灰葡萄孢菌、烟草赤星病菌和指状青霉菌。监测真菌生长14天。该生物测定在密封的1L盒中进行,其包含四个50mm培养皿,每个包含PDA和测试真菌的塞子,并且在相对侧包含1mL“混合物4”的小瓶(10mm宽 \times 35mm高)。如图10所示,“混合物4”在所有测试温度下都能抑制或消除测试真菌的生长。

[0282] 如表3所示,对“混合物21”的抗菌活性进行了测试。与“混合物4”类似,在不同温度下测试了“混合物21”对相同的四种植物致病性菌类的抗菌活性。对于“混合物4”进行生物测定,除了使用小瓶含有混合物之外,将50 μ L的“混合物21”装载在吸墨纸上并放入密封盒中。如图11所示,14天后,在所有测试的温度下,“混合物21”都没有测试真菌生长。

[0283] 对“混合物4”的生物活性进行了进一步的检验,针对植物致病性线虫爪哇根结线虫的J2幼虫进行了生物检测。每个盒子包含5个小瓶(10mm宽 \times 35mm高),每个小瓶含有0.01M MES(2-(N-morpholino)乙磺酸)中的300个J2幼虫),一个含有1mL“混合物4”的相同小瓶和一个50mm培养皿含有5mL双蒸无菌H₂O用于供水。线虫与或不与“混合物4”在25℃的黑暗中孵育2天,然后转移到20 μ m的过滤器中,在黑暗在25℃下孵育3小时,以分离活死线

虫和死线虫,只有在孵育时间结束时计数活的幼虫。“混合物4”导致活幼虫数量急剧减少: J2s生存力($11.4 \pm 4.0\%$)。该结果表明,合成混合物对幼虫生存力的影响比真菌培养板所产生的效果更有效(图12)。

[0284] 进一步检查了“混合物4”的生物活性,证明了在花生上生长的黑曲霉和 *P. digitatum* 的生长。将花生放在含有5mL水的50mm培养皿中,接种每种真菌的分生孢子悬浮液(10^6 分生孢子/mL)滴液(10 μ L;每次3滴花生),并在25 $^{\circ}$ C下密封的1L盒子中孵育。

[0285] 结果如图13A-F所示,其中图13A表示在1mL/L“混合物4”存在下用黑曲霉接种的花生。图13B表示没有“混合物4”的接种黑曲霉的花生。图13C表示在1mL/L“混合物4”的存在下接种 *P. digitatum* 的花生。图13D表示没有混合物 *P. digitatum* 接种的花生。图13E表示在1mL/L“混合物4”存在下未接种的花生。图13F表示没有“混合物4”的未接种的花生。

[0286] 10天后,暴露于“混合物4”的所有花生都没有任何感染症状,即没有观察到真菌,如图13A、C、E所示,而在对照和如图13B、D、F所示没有“混合物4”的预先接种的花生中都清楚地观察到黑曲霉的生长。

[0287] 进一步检查“混合物4”的生物活性,以防止用致病真菌灰葡萄孢菌接种或未接种的葡萄中的疾病症状。在两种浓度的“混合物4”(1或2mL/L)或不存在“混合物4”作为对照的情况下,将葡萄储存在密封的2L盒中。另外,一半的葡萄预先接种了分生孢子菌(4.5×10^5 分生孢子/mL)的分生孢子悬浮液,而另一半没有进行处理,以检查“混合物4”对天然接种的影响。葡萄在0 $^{\circ}$ C下暴露于“混合物4”4或12天。然后,取出含有“混合物4”的小瓶,并将箱子在室温下打开10分钟,使VOC蒸发,然后将其返回到0 $^{\circ}$ C以进一步培养。1个月后,将所有箱子打开并转移至20 $^{\circ}$ C两天,然后计数感染葡萄的葡萄。

[0288] 结果如图14A-B所示,其中图14A显示了“混合物4”对预接种葡萄的病症的影响。图14B显示了“混合物4”对未处理葡萄的疾病症状的影响。图14A显示,高浓度的“混合物4”已经在暴露4天后已经预防了 *B. cinerea* 感染,而在两种低浓度和高浓度的混合物存在下,被 *B. cinerea* 感染的葡萄的天然感染在4天和12天的暴露下显着降低,如图14B所示。

[0289] 实施例10

[0290] 该实施例证实“混合物4”作为小麦贮存中的熏蒸剂的生物活性。

[0291] 在25 $^{\circ}$ C下将“混合物4”浓度增加(0、0.75、1、1.25 μ L/mL)6天的情况下,将商业小麦籽粒在含有或不含水分的密封的1L盒中孵育,然后将5个小麦随机从箱中收集并转移到PDA培养皿中,并在25 $^{\circ}$ C下进一步培养5天,以分离定殖小麦的真菌。

[0292] 结果如图15A-E所示,其中图15A显示与未处理的小麦籽粒的真菌分离。图15B显示了在水分存在下孵育的未处理小麦籽粒的真菌分离。图15C显示了在水分存在下温育并暴露于0.75 μ L/mL“混合物4”的小麦籽粒的真菌分离。图15D显示了在水分存在下温育并暴露于1 μ L/mL“混合物4”的小麦籽粒的真菌分离。图15E显示了在水分存在下温育并暴露于1.25 μ L/mL“混合物4”的小麦籽粒的真菌分离。如图15A-E所示,只有在没有“混合物4”的情况下,真菌分离才能发现,这表明这种混合物是一种强力的熏蒸剂。

[0293] 实施例11

[0294] 该实施例证实“混合物4”对 *P. digitatum* 在橙子上的生长的生物活性。

[0295] 在25 $^{\circ}$ C下,在“混合物4”浓度(0、0.125、0.25和0.375 μ L/mL)存在7天的情况下,将密封的2L盒子中的病原真菌接种在橙子上。

[0296] 结果如图16A-E所示,其中图16A表示未处理的橙子。图16B表示在没有“混合物4”的情况下用*P. digitatum*接种的橙子。图16C表示在0.125 μ L/mL“混合物4”存在下用*P. digitatum*接种的橙子。图16D表示在0.25 μ L/mL“混合物4”的存在下用*P. digitatum*接种的橙子。图16E表示在0.375 μ L/mL的“混合物4”存在下用*P. digitatum*接种的橙子。如图16A-E所示,在最低浓度下,“混合物4”降低了症状严重性,而在较高浓度下,“混合物4”的存在可防止症状出现。

[0297] 实施例12

[0298] 该实施例证实“混合物21”对植物蚜虫在体外和植物中的生物活性。

[0299] 被检查的蚜虫是:绿桃蚜虫桃蚜、葫芦科的棉蚜、白菜蚜虫甘蓝蚜、夹竹桃蚜虫、蚜虫、银叶粉虱烟粉虱和玉米叶蚜虫、玉米蚜。将每个蚜虫转移到90mm培养皿中并在室温下暴露于不同浓度的“混合物21”(0、0.125、0.25 μ L和0.5 μ L/mL)15分钟。然后,在双眼下检查了蚜虫的生存能力,并与未暴露的蚜虫进行了比较。

[0300] 如图17所示,蚜虫的死亡已经在“混合物21”的浓度最低时观测到。所有没有暴露于“混合物21”的蚜虫都活着。

[0301] 图18显示了“混合物21”对烟粉虱虫侵染的黄瓜植物(*Cucumis sativus*)的影响。在蒸发VOC之前将植物暴露于“混合物21”15分钟。

[0302] 黄瓜植物用silverleaf whitfly烟粉虱接种,然后在室温下,在增加浓度的“混合物21”(0、0.041、0.083和0.125 μ L/mL)的存在下将每株植物密封在塑料袋中。在“混合物21”暴露15分钟后,所有的蚜虫死亡,植物从密封袋中取出,用于蒸发VOC。接下来,使植物在室温下生长,并监测植物毒性的症状。如图18所示,暴露于“混合物21”和对照植物的植物之间没有可见的区别,表明在被测试条件下“混合物21”的植物毒性低。

[0303] 实施例13

[0304] 该实施例证实“混合物21”对储存期间马铃薯发芽的生物活性。

[0305] 马铃薯在密度为2L的箱子中,在20 $^{\circ}$ C下在浓度增加(0、0.005、0.025、0.025、0.05 μ L/mL)的情况下在黑暗中孵育10天。

[0306] 结果示于图19A-E,其中图19A表示未处理的马铃薯。图19B表示在“混合物21”0.005 μ L/mL存在下的马铃薯。图19C表示在0.0125 μ L/mL“混合物21”存在下的马铃薯。图19D表示在“混合物21”为0.025 μ L/mL的情况下的马铃薯。图19E表示在0.05 μ L/mL“混合物21”存在下的马铃薯。如图19中证实,在两个最低浓度,“混合物21”减少了马铃薯相对于对照的发芽,而在较高的浓度下,“混合物21”的存在阻止了发芽。

[0307] 实施例14

[0308] 该实施例证实4-庚酮具有对*M. javanica* J2幼虫的杀线虫活性。

[0309] 还在立体显微镜下目视检查了黑轮层炭壳、合成混合物和纯化合物4-庚酮的效果。结果如图20A-D所示。其中图20A表示未处理的线虫;图20B表示暴露于预先生长4天的三个黑轮层炭壳培养物质板(直径为50mm,具有5mL生长培养基)的线虫;图20C表示暴露于0.25mL/L合成混合物的线虫预加载到125mg珍珠岩颗粒;图20D表示暴露于0.05mL/L预加载到25mg珍珠岩颗粒的化合物4-庚酮的线虫。大多数控制线虫仍然是移动的,具有可行线虫的特征正弦曲线或曲线形状。相比之下,在暴露于黑轮层炭壳培养物牌之后,观察到线虫数量明显减少,直线形线虫线虫的分布相对较高,此外,暴露于混合物或4-庚酮,大多数线虫

显示出典型的直体形状,几乎没有弯曲的外观,意味着它们的死亡率(图20B-D)。

[0310] 实施例15

[0311] 该实施例证实*M. javanica*卵由合成混合物影响。

[0312] 由于真菌和合成混合物都影响了J2幼虫的生存能力(图12),因此检查了*M. javanica*卵的易感性。如图21所示,暴露于黑轮壳炭壳的*M. javanica*卵孵出的活的J2幼虫数量与非暴露条件下控制的数量相似。然而,合成混合物导致幼虫生存能力的显著降低,表明与黑轮层炭壳培养物相比,合成混合物具有强烈的杀线虫活性。

[0313] 实施例16

[0314] 该实施例证实将合成混合物施加到线虫侵染的土壤会减少疾病发生。

[0315] 为了检验合成混合物预防疾病发展的能力,合成混合物被用于降低土壤中的J2幼虫生存力。为此,将土壤与预先装载有增加体积的混合物的珍珠岩颗粒混合,然后向经处理的土壤中加入*M. javanica* J2幼虫。如图22所示,混合物在浓度低至0.083 μ L/g土壤时显著降低了幼虫的生存力。这个结果表明,混合物对土壤中的线虫有效。接下来,在存在或不存在合成混合物的情况下用线虫接种易感番茄幼苗,并且在7-8周的疾病之后,通过擦伤指数、根重和每克根的*M. javanica*数量来评估愈伤组织。结果如图23A-C所示,其中图23A表示磨损指数;图23B表示每克根的*M. javanica*卵数;图23C表示根重。暴露于合成混合物处理的土壤中生长的接种的番茄植物显示出较低的擦伤指数和每克根的线虫卵数,而暴露植物和未暴露植物之间的根重没有显著差异。综合起来,目前的结果表明,合成混合物基于黑轮层炭壳挥发物的四种,可能会提供一种打击RKN病的新策略。

[0316] 虽然已经结合本发明的具体实施方案描述了本发明,但是显而易见的是,许多替代方案、修改和变化对于本领域技术人员是显而易见的。因此,旨在包括落在所附权利要求的精神和广泛范围内的所有这样的替代、修改和变化。

[0317] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请通过引用并入本说明书中,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请被具体和单独地指明通过引用并入本文。此外,本申请中引用或标识任何参考文献不应被解释为承认该参考文献可用作本发明的现有技术。在使用章节标题的范围内,不应将其解释为必然的限制。

序列表

<110> 以色列农业和乡村发展部农业研究机构(农业研究中心)

D·埃兹拉

O·利亚兹

Y·艾拉德

T·鲁斯基

S·布朗·米雅瑞

P·布茨基

A·杰姆莱尔

A·利切特

A·多姆布若夫斯基

<120> 轮层炭菌属或其衍生的挥发性有机化合物的用途

<130> 65225

<150> US 62/110,665

<151> 2015-02-02

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 562

<212> DNA

<213> *Daldinia* sp.

<400> 1

```
ctgcggaggg atcattaccg agttatctaa actccaacce tttgtgaacc ttaccgctgt 60
tgcctcggcg ggctgcgctt accctgtagc taccctgtag ctacccgta ggcgcgctcc 120
aagccccccg gtggaccact aaactctggt ttaataccga atctctgaat gttcaactt 180
aataagttaa aactttcaac aacggatctc ttggttctgg catcgatgaa gaacgcagcg 240
aaatgcgata agtaatgtga attgcagaat tcagtgaatc atcgaatctt tgaacgcaca 300
ttgcgcccac tagtattcta gtgggcatgc ctattcgagc gtcatttcaa cccttaagcc 360
ttagttgctt agcgttgga gctcgcgctg tacttgttac ggcgcagttc ctcaaagtga 420
ttggcggagt tagggcatac tctaagcgta gtaatattc ttctcgcttc tgtagttgtc 480
ctggcggctt gccgttaaac ccctatattt tctagtggtt gacctcgat taggtaggaa 540
taccgctga acttaagcat at 562
```

<210> 2

<211> 211

<212> DNA

<213> *Daldinia* sp.

<400> 2

```
tggccatac caatcatgat actagcatat tgtagatat cgtcgtgcgc ggctatatat 60
```

gtatatcgga tcaactactt acccatggtg gcggggacga ccaacgatgg acgctgtatt 120
aatatgtag aaaagaatac aaacttgggc cegtctgat gaggccgaag cggggcgat 180
ggttgggcga ggatggaact tacggaaaac a 211

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<222> (223)

<223> 单链DNA寡核苷酸

<400> 3

tccgtaggtg aacctgcggg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<222> (223)

<223> 单链DNA寡核苷酸

<400> 4

tcctccgctt attgatatgc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<222> (223)

<223> 单链DNA寡核苷酸

<400> 5

tcctccgctt attgatatgc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<222> (223)

<223> 单链DNA寡核苷酸

<400> 6

tacgagtctt tctggcccat 20

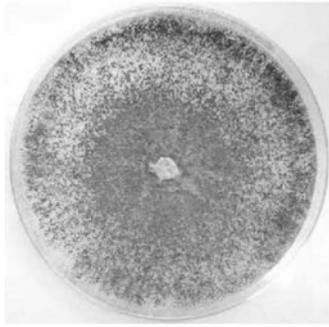


图1

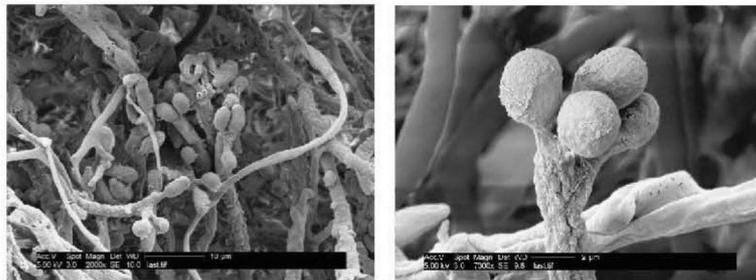
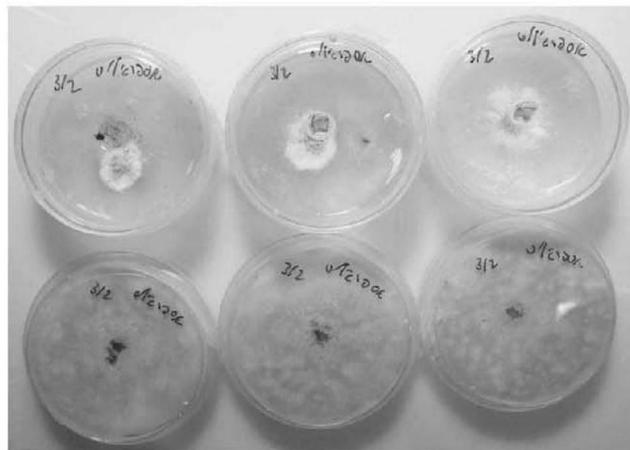


图2



上图-存在黑轮层炭壳的情况下的“夹心法”。黑轮层炭壳的生长可以在黑曲霉塞子下看到。下图-不存在黑轮层炭壳的情况下在对照PDA板中黑曲霉的生长。

图3

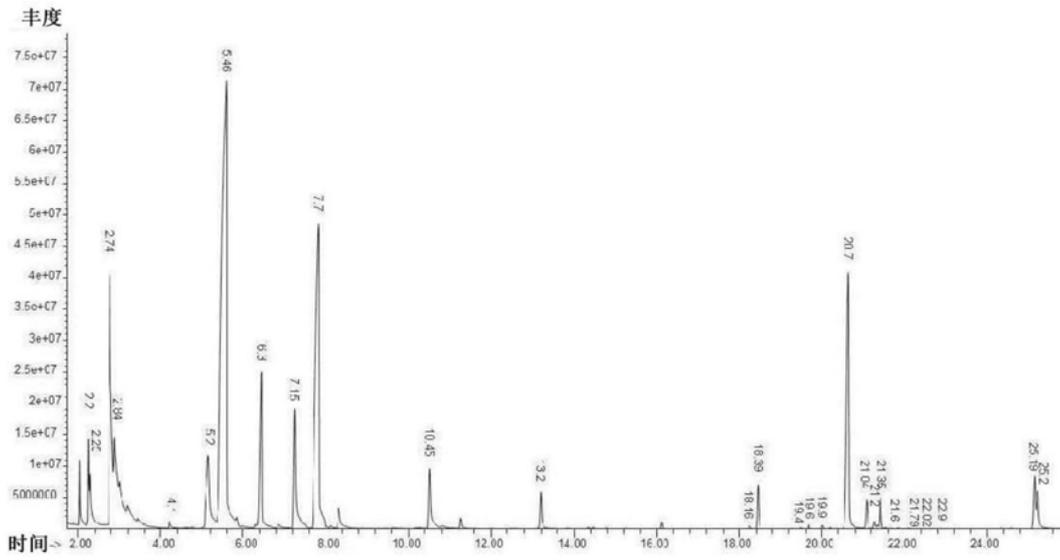


图4



图5A



图5B



图5c



图6A



图6B



图6c



图7A



图7B

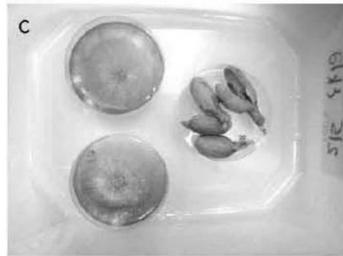


图7c

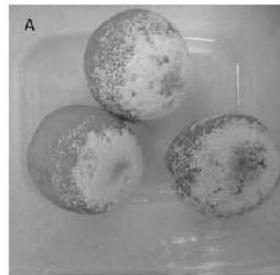


图8A

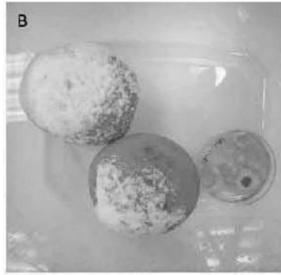


图8B

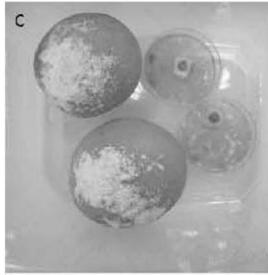


图8c

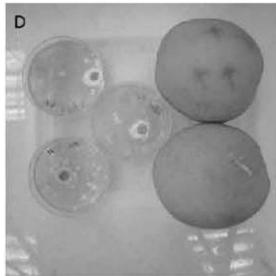


图8D

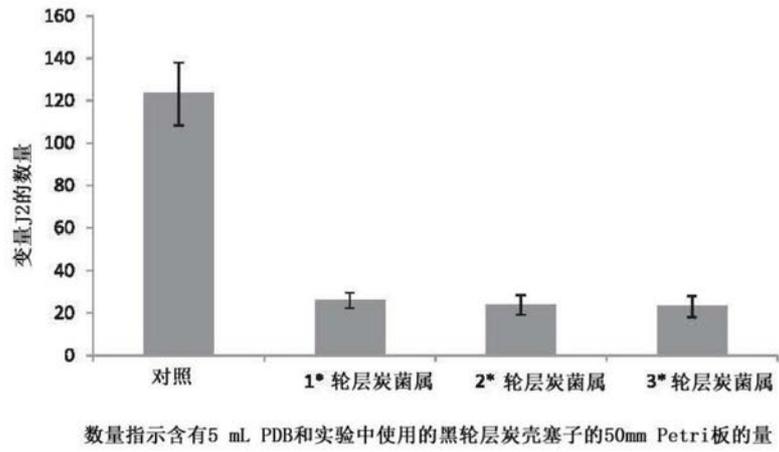


图9

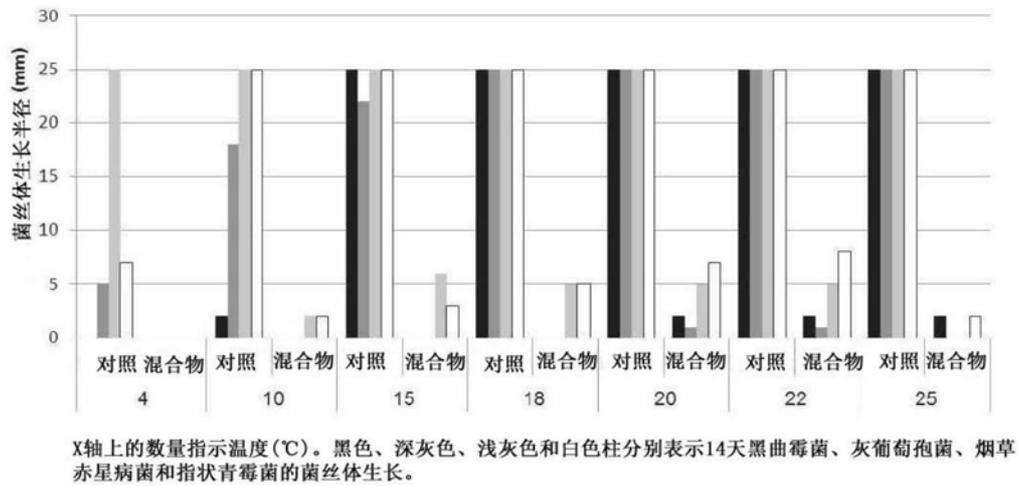


图10

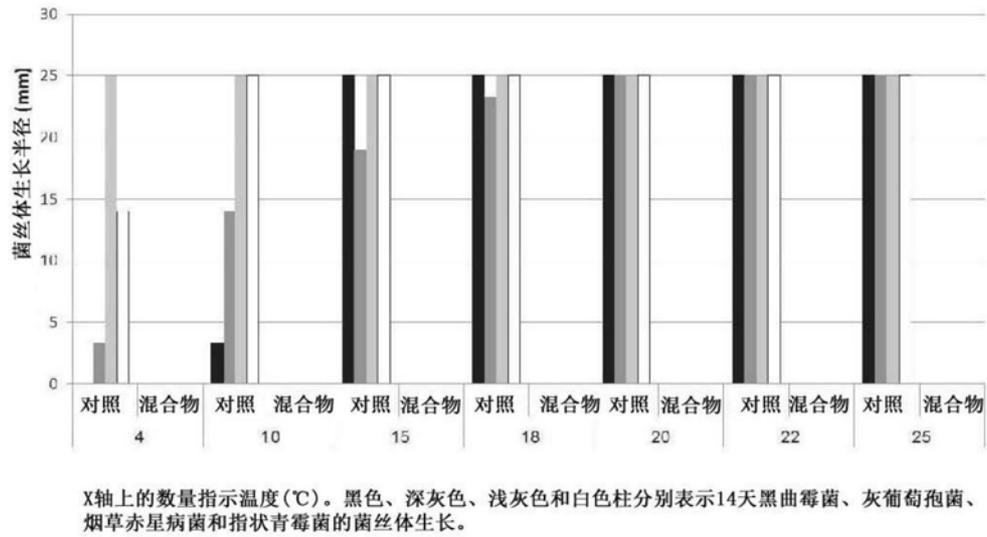


图11

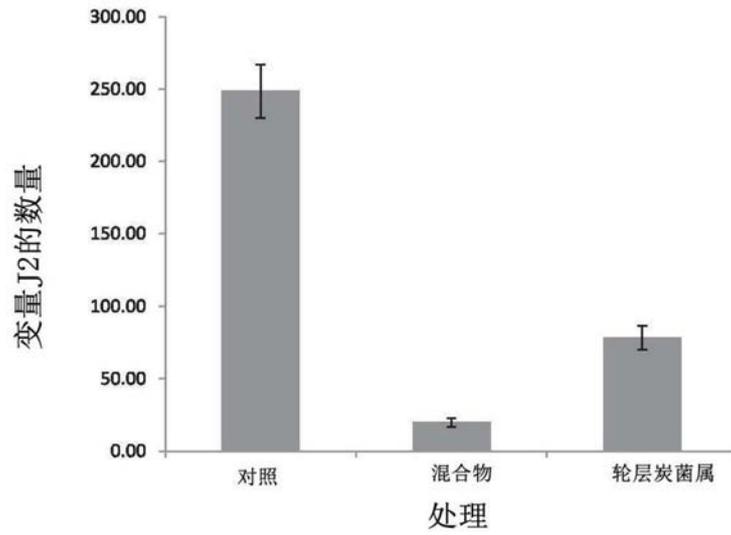


图12

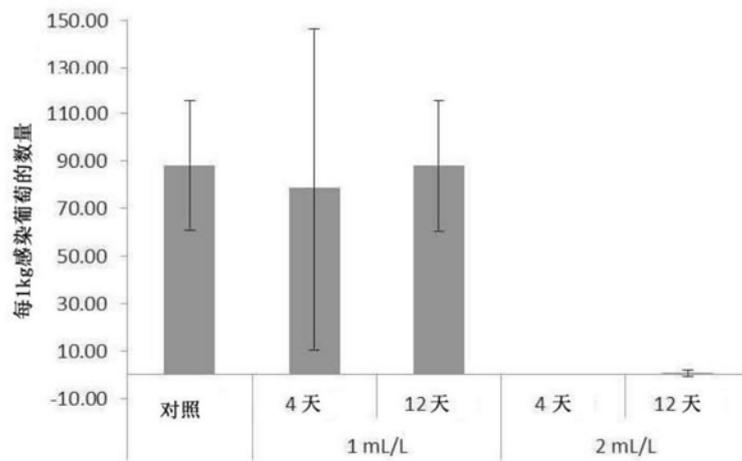
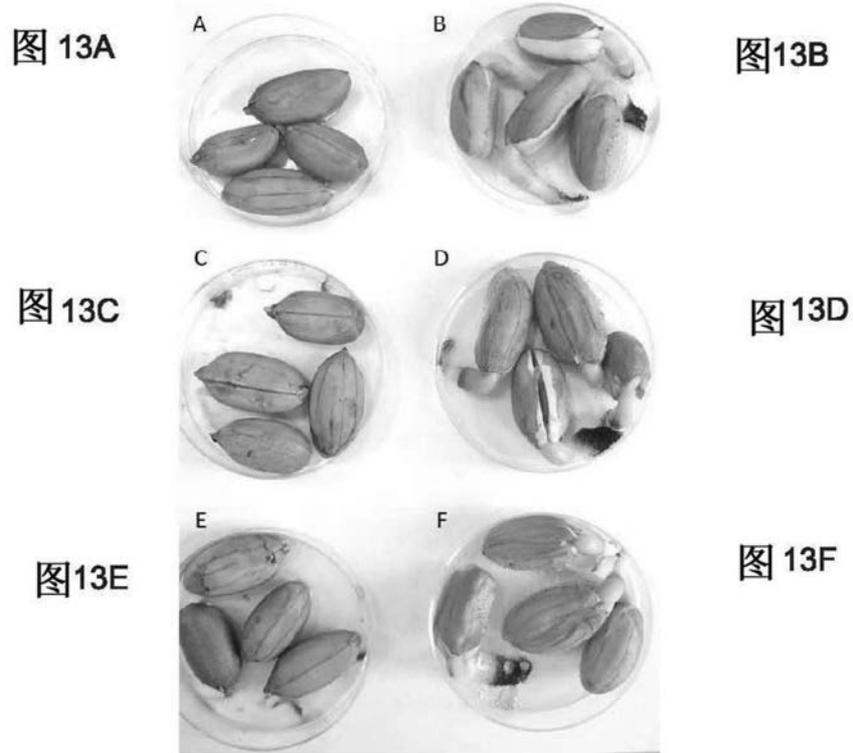


图14A

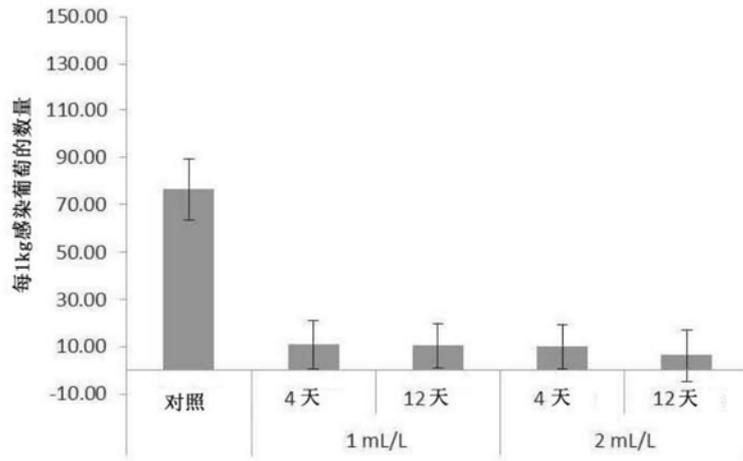
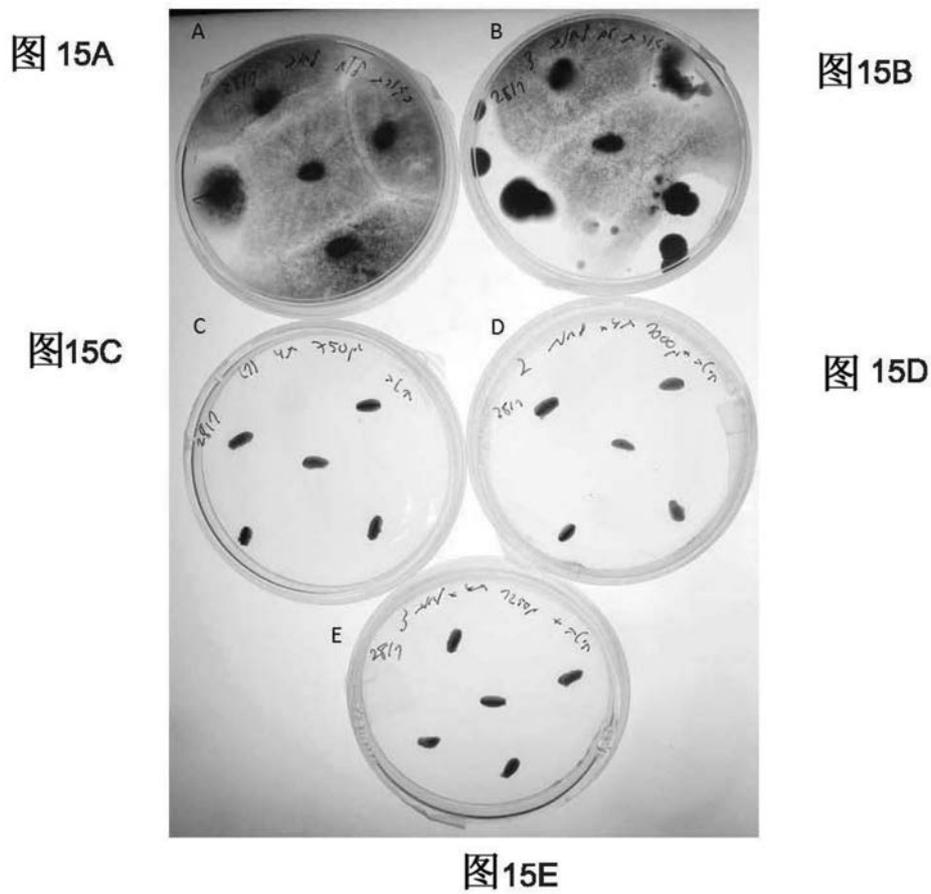


图14B



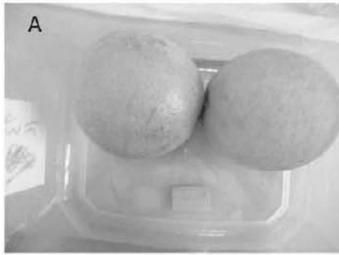


图16A

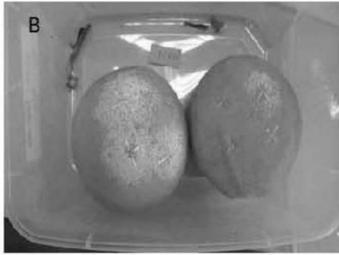


图16B



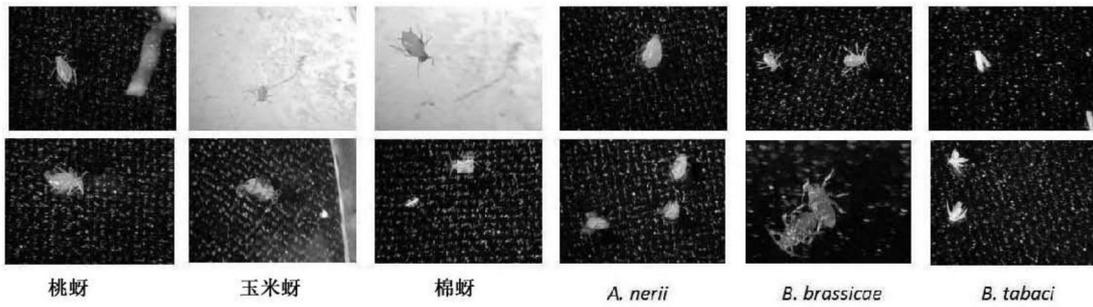
图16C



图16D



图16E



上图-对照；下图-暴露于0.125 L/mL的“混合物21”15分钟后的蚜虫

图17

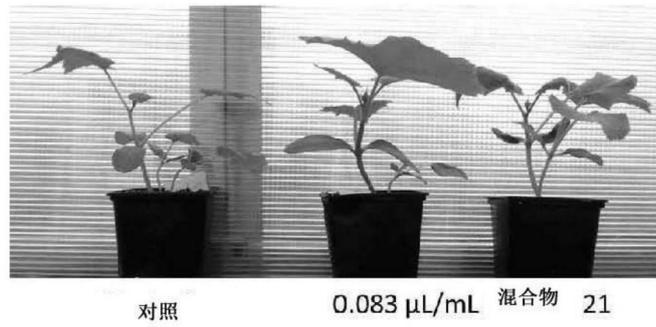


图18



图19A

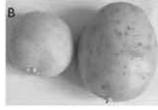


图19B



图19C



图19D



图19E



图20A



图20B



图20C

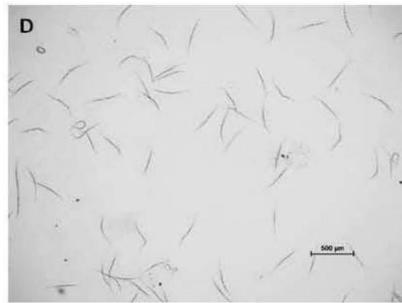


图20D

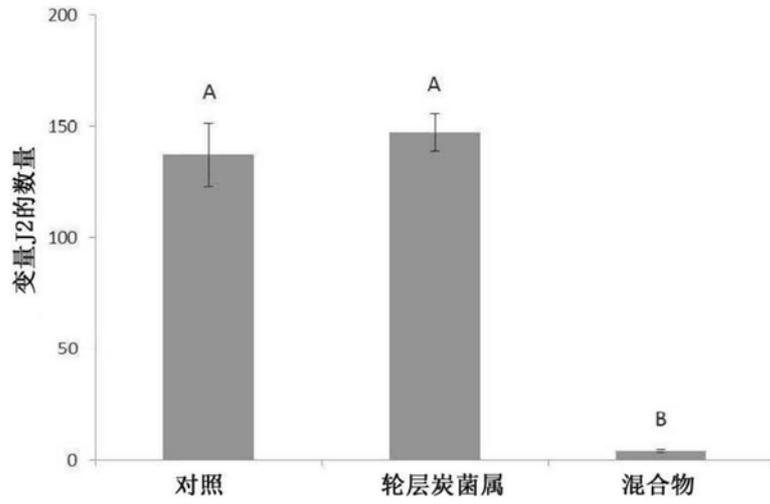


图21

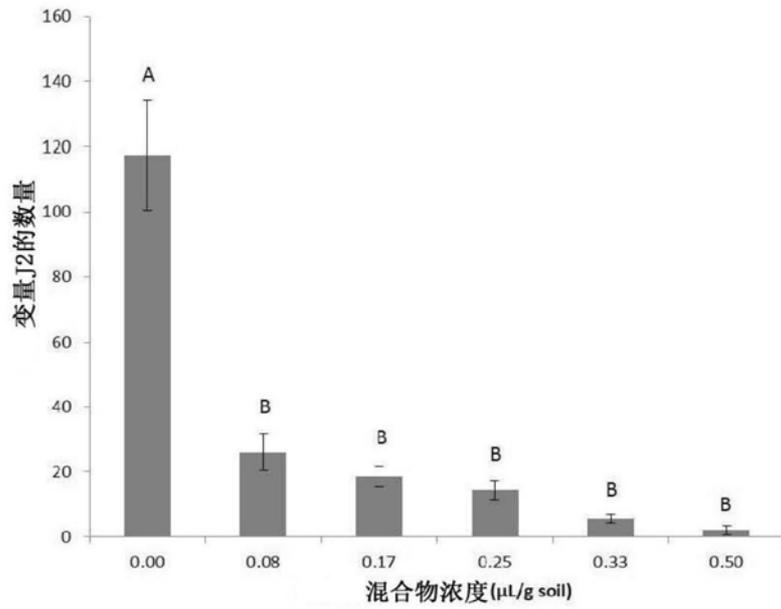


图22

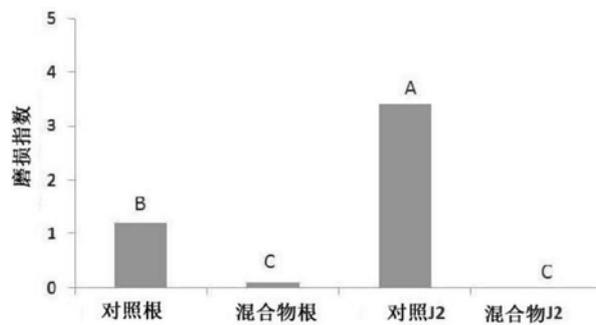


图23A

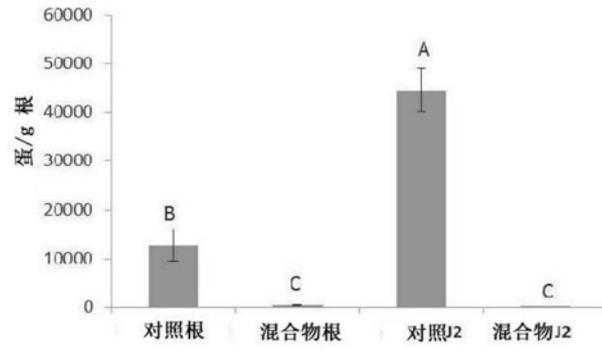


图23B

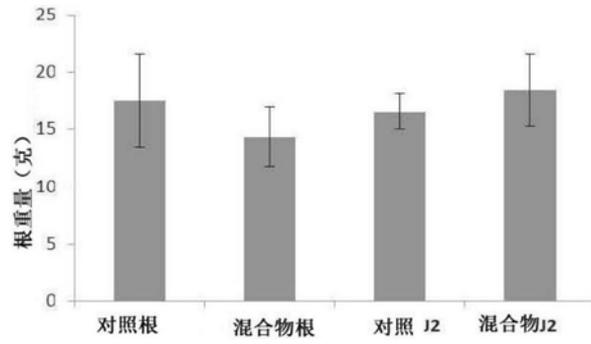


图23C