[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A01N 63/00 (2006.01)
A01N 25/00 (2006.01)
A01N 65/00 (2006.01)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480025237.X

[43] 公开日 2006 年 10 月 11 日

[11] 公开号 CN 1845676A

[22] 申请日 2004.7.16
[21] 申请号 200480025237.X
[30] 优先权
[32] 2003.7.17 [33] US [31] 10/623,432
[86] 国际申请 PCT/US2004/022918 2004.7.16
[87] 国际公布 WO2005/009360 英 2005.2.3
[85] 进入国家阶段日期 2006.3.2
[71] 申请人 加里·A·斯特罗贝尔
地址 美国蒙大拿
[72] 发明人 G·A·斯特罗贝尔
D·C·曼克尔 J·默西哀
J·希门尼斯 J-E·J·林
J·瑟斯顿 B·克斯廷
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 赵艳华
权利要求书 3 页 说明书 33 页 序列表 3 页

[54] 发明名称

新颖内生植物性真菌有关的组合物及其使用方法

[57] 摘要

本发明提供有关新颖内生植物性真菌 Muscodor 之杀虫有效的组合物。具全而言，本发明涉及商业上有用的 Muscodor 以及制备该制剂之方法。本发明提供挥发性有机化合物的制剂合成杀虫混合物，其可分离自生长于多种不同底物的 Muscodor。本发明还提供通过使该生物体或其生境暴露在上述 Muscodor - 相关组合物以抑制生物体，例如：微生物、昆虫、以及线虫生长的方法。

1. 一种合成混合物，其包含杀虫有效量的至少两种挥发性有机化合物，该挥发性有机化合物可分离自生长在黑麦谷物上的 Muscodor albus 经分离的培养物、糙米砾上的 Muscodor albus 经分离的培养物和马铃薯葡萄糖琼脂上的 Muscodor albus 经分离的培养物。

2. 权利要求 1 的合成混合物，其中至少两种挥发性有机化合物选自表 1、3 以及 6 中的挥发性有机化合物。

3. 权利要求 1 的合成混合物，其中至少两种挥发性有机化合物选自：2-甲基-1-丁醇、异丁醇、异丁酸、3-甲基-1-丁醇、3-甲基丁基乙酸酯以及丙酸乙酯。

4. 权利要求 1 的合成混合物，其中至少两种挥发性有机化合物选自：2-甲基-1-丁醇、异丁醇、甲基异丁酸酯、异丁酸、3-甲基-1-丁醇、3-甲基丁基乙酸酯以及丁酸乙酯。

5. 权利要求 1 的合成混合物，其中至少两种挥发性有机化合物包含异丁酸，以及 2-甲基-1-丁醇、3-甲基-1-丁醇、异丁醇、丙酸乙酯、丁酸乙酯以及 3-甲基-1-丁醇中的至少一种。

6. 权利要求 1 的混合物，其中至少两种挥发性有机化合物包含 3-甲基丁基乙酸酯以及丙酸，2-甲基，3-甲基丁基酯。

7. 权利要求 1 的混合物，其中至少两种挥发性有机化合物包含 2-甲基-1-丁醇，以及异丁醇、丙酸乙酯以及丁酸乙酯中的至少两种。

8. 权利要求 1 的混合物，其中至少两种挥发性有机化合物包含丁酸乙酯、异丁醇以及丙酸乙酯。

9. 权利要求 1 的混合物，其中至少两种挥发性有机化合物包含 2-甲基-1-丁醇、丁酸乙酯、异丁醇、苯乙醇、乙基异丁酸酯、2-甲基丁基乙酸酯以及异丁酸。

10. 权利要求 1 的混合物，其中至少两种挥发性有机化合物包含 3-甲基-1-丁醇、丁酸乙酯、异丁醇、苯乙醇、乙基异丁酸酯以及异丁酸。

11. 一种抑制生物体生长的方法，该生物体选自微生物、昆虫及线虫，该方法包括使所述生物体或生物体生境暴露于权利要求 1 的合成混合物。

12. 一种处理或保护水果、种子、植物及土壤免于生物体侵染的方法，该生物体选自：微生物、昆虫及线虫，该方法包括使水果、种子、植物或土壤暴露于有效量挥发性有机化合物，该化合物选自：3-甲基丁基乙酸酯、3-甲基-1-丁醇、异丁醇、甲基 2-甲基丁酸酯、甲基异丁酸酯、少于 2500ppm 的 2-甲基-1-丁醇以及少于 2800ppm 的异丁酸。

13. 一种处理或预防建筑材料及建筑物内有毒霉菌的方法，其通过使建筑物、建筑材料或建筑材料间的空间暴露于有效量的挥发性有机化合物，该化合物选自：3-甲基丁基乙酸酯、3-甲基-1-丁醇、异丁醇、甲基 2-甲基丁酸酯、甲基异丁酸酯、少于 2500ppm 的 2-甲基-1-丁醇以及少于 2800ppm 的异丁酸。

14. 一种 Muscodor 载体制剂，包含:

载体，

稳定剂，以及

Muscodor albus 培养物，

其中该培养物和稳定剂附着至载体。

15. 权利要求 14 的 *Muscodor* 载体制剂，其中该载体是谷物。

16. 权利要求 15 的 Muscodor 载体制剂，其中该谷物选自：玉米、黑麦、大麦、稻米、小麦、燕麦豆、以及大豆。

17. 权利要求 14 的 Muscodor 载体制剂，其中该载体是含有氮以及碳源的吸收材料。

18. 权利要求 14 的 Muscodor 载体制剂，其中该稳定剂是糖类。

19. 权利要求 18 的 Muscodor 载体制剂，其中该糖类选自：乳糖、蔗糖和海藻糖。

20. 权利要求 18 的 *Muscodor* 载体制剂，其中该糖类是乳糖。

21. 权利要求 14 的 *Muscodor* 载体制剂，其中进一步包含基质，其中载体、培养物、以及稳定剂经该基质包封。

22. 权利要求 21 的 *Muscodor* 载体制剂，其中该基质是水凝胶。

23. 一种制备 Muscodor 载体制剂的方法，包括:

培育 Muscodor 培养物;

将 Muscodor 培养物接种于载体;

添加稳定剂至载体; 以及

干燥载体。

24. 权利要求 23 的方法，其中该稳定剂是糖类。

25. 权利要求 24 的方法，其中该糖类选自: 蔗糖、海藻糖以及乳糖。

26. 权利要求 25 的方法，其中该糖类是乳糖。

27. 权利要求 23 的方法，其中该载体是谷物。

28. 权利要求 27 的方法，其中该谷物选自: 玉米、黑麦、大麦、稻米、小麦、燕麦豆以及大豆。

29. 权利要求 23 的方法，进一步包括在干燥载体之前包封载体。

新颖内生植物性真菌有关的组合物及其使用方法

互相参照的相关申请

本申请要求根据 35 U.S.C.§ 120 的美国专利申请 10/408,209，申请日期 2003 年 4 月 4 日的利益，该专利申请要求根据 35 U.S.C.§ 120 美国专利申请 10/121,740，申请日期 2002 年 4 月 11 日的利益，该专利申请要求根据 35 U.S.C.§ 119（e）的美国临时申请序号 60/283,902，申请日期 2001 年 4 月 16 日以及美国临时申请序号 60/363,072，申请日期 2002 年 3 月 11 日的利益。这些申请的内容全文在此并入以作参考。

技术领域

本发明系涉及微生物学及杀虫剂领域，并提供可在采收前后抑制不利于植物及不利于建筑材料的微生物、昆虫、以及线虫生长的组合物及方法。具体而言，本发明涉及基于或源自 *Muscodor albus* 的组合物以及使用该组合物作为杀虫剂的方法。

发明背景

本申请中涉及多种出版物或专利，于括号中表示。各出版物或专利全文在此并入以供参考。若未标示于本文中，则在本说明书最后权利要求之前提出完整引用出版物。

众所周知多种不同的微生物具有适用于控制植物疾病的生物活性。虽然对于确认及发展控制多种农艺以及园艺植物疾病的生物杀虫剂已有重要进展，但目前采用的多数杀虫剂仍是合成的化合物，在 EPA 分类为致癌性化学物，且对野生生物以及其它非目标物种具有毒性。例如，溴代甲烷被广泛的作为土壤熏蒸剂以及用于处理采收后的害虫。由于它对人类及动物的高毒性和对大气的毒害作用，不久即将禁用溴

代甲烷。因此，亟需发现其安全的替代物以及其它合成的杀虫剂。

发明概要

本申请人发现溴代甲烷替代品及及使用方法。具体而言，本申请人发现（1）商业上有用的新颖的内生植物性真菌 Muscodor 的制剂，该 Muscodor 产生挥发性的副产品，该副产品是有效的杀虫剂，以及(2)包含一种或多种此类挥发性的副产品的合成杀虫混合物。

本发明的一个方面是商品化有活性的、杀虫有效的 Muscodor 载体制剂，其包含 Muscodor 培养物，附着于含有微量营养物和稳定剂的稳定微环境。此制剂仅在暴露于周围环境的水分下才经水分活化、产生 Muscodor 的挥发物。因此，它是能储藏的杀虫组合物。

在另一具体实施方案中 Muscodor 载体制剂是包封的。包封能保护 Muscodor 培养物、载体、以及稳定剂免于害虫（例如存在于施用之土壤）干扰，而仍使 Muscodor 挥发物逃逸以及抑制微生物、昆虫、以及线虫的生长。

本发明另一方面是制备上述 Muscodor 制剂的方法。

本发明还涉及可分离自生长于各种不同的底物（包括黑麦谷物、糙米砾以及马铃薯葡萄糖琼脂（dextrose agar））的 Muscodor 的挥发性有机化合物的各种合成杀虫混合物。

本发明亦包含抑制生物体（例如微生物、昆虫、以及线虫）生长之方法，其通过使该生物体或其生境（habitats）暴露于可分离自上述Muscodor培养物及/或Muscodor制剂以及合成杀虫混合物的各挥发性有机化合物。此方法可用于工业以及农业。例如，在一个实施方案中它可用于处理或防止建筑材料以及建筑物中有毒的霉菌。在另一实施方案中，它可用于处理或保护果实、种子、植物、以及植物周围的土壤，免于微生物、昆虫、或线虫之侵扰。

发明详述

本申请人已分离以及表征了新颖的真菌（名称为 Muscodor）及其二个种，Muscodor albus 以及 Muscodor roseus。M. albus 的部分基

因组的序列提供于 SEQ ID NOS: 1 以及 2 中，M. roseus 的部分基因组的序列提供于 SEQ ID NOS: 3 以及 4。M. albus 的分离培养物和 M. roseus 的分离培养物根据用于专利程序的微生物保藏的国际认可的布达佩斯条约及其细则（布达佩斯条约）于 2002 年 2 月 1 日保藏于位于 1815N, University Street Peoria, Illinois 61604 U.S.A.的农业研究机构保藏中心，登记号如下：Muscodor albus 620-登记号 NRRL 30547; Muscodor roseus A3-5-登记号 NRRL30548。

这些菌株的保藏确保本申请悬而未决过程中可以获得这些培养物。但是应该理解保藏物的可获得性不是许可实施本发明，而损害政府授予的专利权。

M. albus 以及 M. roseus 制成的挥发性副产品(Muscodor 挥发物）可抑制和/或使昆虫、线虫、以及微生物（包括侵扰建筑材料之微生物以及引起农作物、种子、水果疾病、以及在土壤内之微生物）致死。本申请人还发现单独或各种部分组合（subcombination）的 Muscodor 挥发物的成分具有类似 Muscodor 的杀虫活性。因此，本发明涉及商品化有用的稳定的 Muscodor 制剂、一种或多种 Muscodor 挥发物成分合成混合物，以及使用此类组合物作为杀虫剂的方法。

除非特别说明，本发明的实践使用常规的化学、微生物学、细胞生物学、生物化学以及免疫学的技术，该技术为本领域技术人员所熟知。该技术在文献中充分解释。此类方法是描述于下列出版物。参阅例如：Sambrook 等，MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL，第 2 版; 1989）; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F. M. Ausubel 等，eds.（1987））；系列的 METHODS IN ENZYMOLOGY（Academic Press, Inc.）；PCR: A PRACTICAL APPROACH（M. MacPherson 等人，IRL Press at Oxford University Press（1991））；以及 PCR 2: A PRACTICAL APPROACH（M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds.（1995）。

虽然目前将描述本发明特定的实施方案，应了解该实施方案仅是说明一小部份代表本发明原理应用的许多可能的具体实施方案的实施

例。本领域技术人员熟知的本发明之各种不同的修饰，均属于本发明之精髓、范围以及将进一步的限定于所附的权利要求中。

定义

除非文章中另行说明，单数形式"一个"、以及"这个"均包括复数的含义。例如术语“细胞”包括多个细胞、包括其混合物。

本文之术语"包含"系指组合物及方法包括列举的要素，但不排除其它要素。在定义组合物以及方法时，"基本上由...组成"应排除组合中任何其它本质上显著的要素。因此，在此定义的基本由某些成分组成的组合物，将不排除分离以及纯化方法中之微量污染物以及农业上可接受的载体。"由...组成"，应排除在施用本发明组合物时其它成分以及实质方法步骤中之微量元素以外的其它成分。由这些转变（transition）术语定义的实施方案均属于本发明范围。

本文使用的"生物控治"定义为通过使用第二种生物体控制病原体或者昆虫。例如，细菌毒素（例如抗生素）已用以控制病原体。这些毒素可分离以及直接施用至植物或可施用细菌菌种使其原位产生毒素。

本文术语"真菌"包括多种缺少叶绿素的带核的带有孢子的生物体。真菌的实例包含酵母、霉菌、霉、锈菌以及蘑菇。

术语"细菌"包括任何不具有显著细胞核的原核生物体。

"杀虫的"意指物质对于提高害虫死亡率或抑制生长率的能力。术语杀虫包含下述定义的抗微生物的、杀虫的、以及杀线虫的。

"抗微生物的"意指物质对于提高单细胞或丝状生物体，例如：细菌、真菌、原生动物、粘菌、以及蓝绿藻的死亡率或抑制其生长率的能力。术语抗微生物的包含下述定义的杀真菌的以及杀细菌的。

"杀真菌"意指物质对于提高真菌的死亡率或抑制真菌成长率的能力。

"杀虫的"意指物质对于提高增加昆虫或其幼虫的死亡率或抑制昆虫或其幼虫生长率的能力。

"杀细菌的"意指物质对于提高细菌的死亡率或抑制细菌生长率的能力。

"杀线虫的"意指物质对于提高线虫的死亡率或抑制线虫生长率的能力。

术语"培养"意指于各种培养基之上或之中繁殖生物体。"全肉汤培养"意指含有细胞以及培养基的液体培养。"上清液"意指经离心、过滤、沉降、或其本领域已知的方法移除生长于培养液中的细胞后的液体培养液残留物。

"有效量"是指足以产生有利的或所要求的结果的量。有效量可以一次或分多次施用。就治疗以及防护而言，"有效量"是指足以改善、稳定、逆转、延缓或延迟目标感染或者疾病状态进展的量。"杀虫有效量"意指足以抑制害虫生长的量。

"阳性对照"意指已知有杀虫活性的化合物。"阳性对照"包括（但非限于）可商业上获得的化学杀虫剂。"阴性对照"意指已知无杀虫活性的化合物。阴性对照的实例是水。

术语"代谢物"或"挥发物"意指任何微生物发酵的化合物、物质或副产品。挥发物大多数可在环境温度以及压力下蒸发。"Muscodor 挥发物"意指 Muscodor 培养物的气体副产品。"挥发性有机化合物"意指 Muscodor 挥发物的一种化学成分。

术语"突变体" 意指亲代菌株的变体以及得到此所要求的生物活性与亲代菌株相似的突变体或变体的方法。"亲代菌株"的定义为诱变之前的原始 Muscodor 菌株。无须人为介入可自然发生突变体。也可经本领域技术人员已知的各种方法以及组合物得到突变体。例如，亲代菌株可用化学试剂，例如 N-甲基-N′-硝基-N-亚硝基胍、乙基甲烷砜处理、或经γ、X 射线照射处理、或 UV 照射处理、或经本领域技术人员熟知的其它方法处理。

"制剂"意指活性剂与另一化合物、载体或组合物、惰性（例如可检测的试剂或标记物或液体载体）或活性物质（例如佐剂）的组合。农业用的载体的实例提供于下。真菌也可与载体或者和至少一种化学

或者生物杀虫剂配制成组合物。

所有数值，例如 pH、温度、时间、浓度、以及分子量，包括范围是近似值，可在（+）或（-）0.1 之间变化。应理解，虽然不总明确陈述，所有数值是用"约"表示。还应理解，虽然不总是明确陈述，在此描述之试剂仅仅作为范例，其等价物为本领域所熟知。

为了实现本发明组合物良好的分散以及粘附，一个实施方案中是有利的将全部肉汤培养物、上清液和/或挥发物与有助分散以及粘附的成分一起配制。适当的制剂为本领域技术人员所熟知（可湿性粉剂、颗粒等，或是可微囊包封在适当的培养基等内，例如水悬剂以及悬浮水溶液等液体、挥发性的组合物以及乳状浓缩物。其它适用的制剂亦为本领域技术人员所熟知。

"变体"是具有本发明菌株所有鉴别特性的菌株，而且其可以被鉴定为具有高严格之条件下杂交至部分的序列已存放于 GenBank 的生物体的基因组的基因组。"杂交"意指一种反应，在该反应中一种或多种多核苷酸反应形成通过在核苷酸残基的碱基之间之氢键稳定的复合体。氢键可经 Watson-Crick 碱基配对、Hoogstein 结合、或任何其它序列-特异性方式发生。复合体可包含双链形成双螺旋结构、三链或更多链形成多链复合体、单链自杂交链、或其任何组合。杂交反应可在不同"严格"条件下进行。一般而言，低严格杂交反应是在约 40℃、10 X SSC 或等效的离子强度/温度的溶液中进行。中度严格杂交通常是在约 50℃、6 X SSC 下进行，以及高严格杂交反应一般是在约 60℃、1 X SSC 下进行。

变体也定义成与 M. roseus 或 M. albus 基因组具有大于 85%、更优选大于 90%或更优选大于 95%序列同一性的基因组序列的菌株。多核苷酸或多核苷酸区域（或者多肽或多肽区域）与另一序列具有一定百分比（例如 80%、85%、90%、或 95%）的"序列同一性"意指当序列比对时，比较二序列后该百分比的碱基（或者氨基酸）相同。序列比对以及同源性或序列同一性百分比可使用本领域已知的软件程序测定，例如描述于目前分子生物学手册（（F.M. Ausubel 等人，eds.，1987）

Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1 中的那些。优选使用预设参数进行序列比对。优选的序列比对程序是使用预设参数的 BLAST。具体而言，优选的程序是 BLASTN 以及 BLASTP，其使用下列预设参数：遗传密码 = 标准；过滤器= 没有； 股 = 两股； 截断 =60；预期= 10；矩阵 = BLOSUM62； 描述 = 50 个序列； 分类 =高分数；数据库 = 非多余的数据库，GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS 翻译 + SwissProtein+ SPupdate + PIR。此类程序的细节可参见下列网址：www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

Muscodor 载体制剂

生长在各种不同基质上的 Muscodor 产生基质依赖性挥发性有机化合物的混合物，其对昆虫、线虫、以及微生物具有抑制性和/或致死性。本申请人设计了商品化有用的 Muscodor 制剂，其中提供高细胞密度的 Muscodor 培养物以及（1）适当的营养物以产生挥发性有机化合物，以及（2）稳定微环境。此类制剂能储存以及产生有效杀虫的挥发物。

本发明涉及 Muscodor 载体制剂，其为商品化的活性杀虫组合物，包含 M. albus 或 M. roseus 培养物、载体、以及稳定剂，其中培养物和稳定剂附着至载体。该制剂能储藏数个月以及是水分活化的；即干燥时不进行新陈代谢，当接触水分，例如来自洒水、土壤、或温室湿度的水分时能产生 Muscodor 挥发物。

农业上可接受的载体包括制剂暴露至水分之后 Muscodor 将会生长的任何基质。适当的载体含有碳源以及氮源以及促进 Muscodor 生长以及代谢的其它微量营养物。在优选的实施方案中载体是谷物。此处所用的术语谷物，包括全粒谷物以及谷物颗粒，例如砂砾（grit）或粉末。可使用各种不同的谷物，包括来自玉米、黑麦、大麦、稻米、小麦、燕麦、大豆等等。在特别优选的实施方案中该谷物是黑麦谷物、糙米砾、或大麦谷物。在另一优选的实施方案中载体是含适当碳以及氮源的吸收性材料。合适的吸收性材料的实例是粘土颗粒以及粉末以

及 Biodac（可购自 Kadant Grantek, Inc. Granger, IN）。适当的碳源包括葡萄糖；适当的氮源包括酵母提取物和硫酸铵。

稳定剂是能维持 Muscodor 细胞存活的物质。在优选的实施方案中，稳定剂包括糖类，例如蔗糖、乳糖、或海藻糖。在尤其优选的实施方案中糖类是乳糖。

优选的培养物是未进行基本的细胞代谢的高细胞密度培养物。这可以经由选择适当平衡的培养基以及适当的发酵条件，例如：时间、温度、以及 pH 实现。在优选的实施方案中，培养物生长于含有碳以及氮源的液体培养基中。用于该液体培养基的适当碳源是糖类，优选葡萄糖、蔗糖、以及淀粉。适当的氮源包括含蛋白质的材料以及含氮的盐类，优选铵盐、酵母提取物和麦芽提取物。适当的发酵条件描述于以下的"制备 Muscodor 载体制剂的方法"的部分。

在另一实施方案中，将 Muscodor 载体制剂包封以保护制剂，例如避免与经土壤传播的微生物接触，但仍允许 Muscodor 挥发物散逸。包封材料是本领域技术人员所熟知的，包括各种不同的聚合的基质。在优选的实施方案中，包封材料是水凝胶，例如藻酸盐。

在另一实施方案中，Muscodor 制剂与有效量的一种或多种杀真菌剂、杀虫剂、杀线虫剂、抗菌剂、或食物防腐剂组合。

制备 Muscodor 载体制剂的方法

本发明还包括制备 Muscodor 载体制剂之方法。该方法包括（1）生长 Muscodor 培养物，（2）将 Muscodor 培养物接种载体，（3）在载体中添加稳定剂，以及（4）干燥载体。适当的载体、培养基、以及稳定剂如上所述。

在优选的实施方案中 Muscodor 培养物是通过将 Muscodor 活的种子培养物接种培养基制备。培养物在控制温度以及 pH 下振荡及通气生长。优化培养基以及发酵条件以使用于接种载体的培养物具有高细胞密度而无实质的代谢。优选的温度优选介于约 20 至 32℃之间，更优选介于约 23-27℃之间，最优选为 25℃。优选的 pH 是约 3 至 7，优选

约 2 至 6，最优选约 4。制成高密度的细胞后，优选约 2 至 8 天之后、更优选发酵 7 天之后，采收全部发酵培养液。

使用所采收的全部培养液接种灭菌载体。使载体内真菌在控制温度以及水分含量下生长足够时间内以接种载体，优选约 1 至 10 天、更优选约 3 至 8 天、最优选约 7 天。优选的控制温度是约 20 至 30℃、更优选是 20 至 25℃。优选的水分含量是约 20 至 80%，更优选约 30 至 70%、最优选约 65%。

在载体中添加入稳定剂，例如：乳糖、海藻糖、或蔗糖，保持 Muscodor 细胞的存活。在优选的实施方案中添加稳定剂以及用 Muscodor 培养物接种同时进行。在另一优选的实施方案中，Muscodor 培养物接种和生长之后添加稳定剂。

最后干燥载体进行储藏。干燥 Muscodor 载体上的 Muscodor 可被外部添加的或来自周围的环境（例如土壤以及空气）的水分重新活化。本领域技术人员熟知的各种不同营养物可与加入的水一起使用以增强干燥 Muscodor 生长以及挥发物的产生。载体再水合之后，在活化的 Muscodor 产生挥发性有机化合物。

本发明还包含包封的 Muscodor 载体制剂。用于微生物的多种技术（Lin 等人，1991），可适于包封 Muscodor 载体制剂或浓缩的 Muscodor 真菌物质。Muscodor 载体制剂在干燥之前，是经各种不同的聚合基质包封。此外，将浓缩的 Muscodor 真菌物质单独或和营养物一起用聚合基质包封。然后干燥胶囊进行储藏。与未包封的 Muscodor 载体制剂相似，包封的制剂经暴露至周围环境的水分再活化产生挥发物。

合成的杀虫混合物

本申请人鉴定了包含生长在不同基质上的 Muscodor 培养物的气体副产品的挥发性有机化合物，例如如上所述的 Muscodor 制剂。各种不同的 Muscodor 制剂以及由生长在黑麦谷物以及马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）上的 M. albus 制备的挥发性有机化合物列于以下实施例部分的表 1、3、4 以及 6 中。本领域技术人员将认识到 Muscodor 可生长在

多种基质上，而且产生的挥发性有机化合物是可容易确认的，如以下的实施例 1 所述。

本申请人发现包含（1）M. albus 气体副产品的基本所有成分，（2）M. albus 气体副产品的一些部分组合，或（3）M. albus 的气体副产品的一种成分的合成的挥发性有机化合物的混合物具有 M. albus 杀虫特性。表 7-12 显示各种不同浓度的抑制微生物生长的各种不同的挥发性有机化合物及其组合。

因此，本发明包含可分离自 Muscodor 分离培养物的一些或所有挥发性有机化合物的多种合成杀虫混合物。源自可分离自 Muscodor 制剂（其中载体为糙米砾）或 M. albus 培养物（生长在黑麦种子和/或 PDA 上）的挥发性有机化合物的混合物的具体实施方案描述如下以及描述于实施例部分。本申请人的实验结果还显示两种或多种挥发性有机化合物的某些混合物可导致检验生物体的协同抑制。此处所用的协同混合物是指两种或多种挥发性有机化合物的混合物，其中该混合物具有的对测试生物体的抑制效果大于该混合物中的各挥发性有机化合物（单独使用）对测试生物体的抑制效果的总和。实施例 10 为该协同组合物以及确定协同作用的方法的实施例。

在一个实施方案中，合成混合物包含杀虫有效量的至少两种下列化合物：2-甲基-1-丁醇、异丁醇、异丁酸、3-甲基-1-丁醇、3-甲基丁基乙酸酯、以及丙酸乙酯。在该混合物优选的实施方案中，若使用于特定的混合物，各挥发性有机化合物将含有下列有效量：异丁酸—优选至少 0.046 微升/毫升以及更优选为 0.046 微升/毫升－0.92 微升/毫升；2-甲基-1-丁醇—优选至少 0.11 微升/毫升以及更优选为 0.11 微升/毫升－0.92 微升/毫升；异丁醇、丙酸乙酯、3-甲基-1-丁醇、以及 3-甲基丁基乙酸酯—各优选至少为 0.20 微升/毫升以及更优选为 0.20 微升/毫升－0.92 微升/毫升。（本部分的所有浓度均为每毫升空气挥发性有机化合物的微升数）。

在另一实施方案中，合成混合物包含杀虫有效量的至少两种下列化合物：2-甲基-1-丁醇、异丁醇、甲基异丁酸酯、异丁酸、3-甲基-1-

丁醇、3-甲基丁基乙酸酯、以及丁酸乙酯。在该混合物优选的实施方案中，若使用于特定的混合物，各挥发性有机化合物将含有下列之有效量：异丁酸—优选至少 0.046 微升/毫升以及更优选为 0.046 微升/毫升－0.92 微升/毫升；2-甲基-1-丁醇—优选至少 0.11 微升/毫升以及更优选为 0.11 微升/毫升－0.92 微升/毫升；异丁醇、丁酸乙酯、3-甲基-1-丁醇、以及 3-甲基丁基乙酸酯—各优选至少为 0.20 微升/毫升以及更优选为 0.20 微升/毫升－0.92 微升/毫升。

在另一实施方案中，合成混合物包含杀虫有效量之至少三种下列化合物：2-甲基-1-丁醇、异丁醇、甲基异丁酸酯、异丁酸、3-甲基-1-丁醇、3-甲基丁基乙酸酯、丙酸乙酯、以及丁酸乙酯。在该混合物优选的实施方案中，若使用于特定的混合物，各挥发性有机化合物将含有下列之有效量：异丁酸—优选至少 0.046 微升/毫升以及更优选为 0.046 微升/毫升－0.92 微升/毫升；2-甲基-1-丁醇—优选至少 0.11 微升/毫升以及更优选为 0.11 微升/毫升－0.92 微升/毫升；异丁醇、丁酸乙酯、丙酸乙酯、3-甲基-1-丁醇、以及 3-甲基丁基乙酸酯—优选至少各为 0.20 微升/毫升以及更优选为 0.20 微升/毫升－0.92 微升/毫升。

在另一实施方案中，合成混合物包含杀虫有效量的至少两种可分离自在马铃薯葡萄糖琼脂上生长的Muscodor albus分离培养物的挥发性有机化合物。该混合物优选的实施方案包含 3-甲基丁基乙酸酯以及丙酸、2-甲基、3-甲基丁基酯。

在另一实施方案中，合成混合物包含杀虫有效量的至少两种可分离自生长在糙米砾上的Muscodor albus分离培养物的挥发性有机化合物。

在另一实施方案中，合成混合物包含杀虫有效量的至少三种可分离自生长在黑麦谷物上的Muscodor albus分离培养物的挥发性有机化合物。

在另一实施方案中，合成混合物包含杀虫有效量的至少两种或至少三种分离自生长在黑麦谷物的 Muscodor albus 分离培养物、生长在

糙米砾上的 Muscodor albus 分离培养物、生长在马铃薯葡萄糖琼脂的 Muscodor albus 分离培养物的挥发性有机化合物。

在优选的实施方案中，该混合物包含杀虫有效量的 2-甲基-1-丁醇或 3-甲基-1-丁醇、丁酸乙酯、异丁醇、苯乙醇、乙基异丁酸酯、以及异丁酸。在优选的实施方案中，混合物中各挥发性有机化合物具有下列之有效量：至少 0.11 微升/毫升，更优选为 0.11 微升/毫升－0.64 微升/毫升、最优选 0.38 微升/毫升丁酸乙酯；优选至少 0.023 微升/毫升，更优选为 0.023 微升/毫升－0.13 微升/毫升、最优选 0.080 微升/毫升异丁醇以及苯乙醇和异丁酸；优选至少 0.015 微升/毫升，更优选为 0.015 微升/毫升－0.092 微升/毫升、最优选 0.054 微升/毫升乙基异丁酸酯；优选至少 0.030 微升/毫升，更优选为 0.030 微升/毫升－0.18 微升/毫升、最优选 0.12 微升/毫升 2-甲基丁基乙酸酯；和优选至少 0.25 微升/毫升，更优选为 0.25 微升/毫升－1.48 微升/毫升、最优选 0.86 微升/毫升的 2-甲基-1-丁醇或 3-甲基-1-丁醇。

使用 Muscodor 制剂以及合成的组合物的方法

如下述表以及实施例所示，本申请人发现如上所述的的组合物——Muscodor 制剂以及合成杀虫混合物——可抑制下列生物体的一种或多种的生长或杀死一种或多种下列生物体：微生物、线虫、以及昆虫。其可致死人类的主要真菌以及细菌病原体，包括白色念珠菌（C.albicans）（表 11）以及烟曲霉菌(A. fumigatus)以及假单胞菌属(Pseudomonas sp.)。其杀死污染食物的细菌，例如金黄色葡萄球菌（S.auerus）以及大肠杆菌(E.coli)（表 11）且已发现可杀死葡萄穗霉菌属（家庭以及公共建筑物的污染物），亦可杀死许多木材腐败真菌。

因此，本发明包含抑制生物体生长的方法，生物体选自：微生物、昆虫、以及线虫，该方法通过使生物体或其生境暴露于有效量的下列源自 Muscodor 的组合物：（1）Muscodor 载体制剂，（2）一种可分离自 Muscodor 的挥发性有机化合物，描述于以下实施例部份，以及(3)

两种或多种可分离自 Muscodor 的挥发性有机化合物的混合物，说明如上以及在以下实施例部份。生物体生境为本领域技术人员所熟悉，包括种子、植物、植物周围的土壤、农场器械、食物、采收食物后的容器、建筑材料、以及建筑材料间的空间。

在本发明优选的实施方案中，抑制微生物、昆虫、以及线虫的生长是藉由使生物体或其生境暴露于有效量之 2-甲基-1-丁醇、异丁酸、3-甲基丁基乙酸酯、异丁醇、或 3-甲基-1-丁醇完成。在特别优选的实施方案中，有效量的 2-甲基-1-丁醇优选少于 2500ppm，有效量的异丁酸少于 2800ppm。

在优选的实施方案中本发明提供处理或预防建筑材料以及建筑物内有毒的霉菌的方法，其使建筑物、建筑材料、或建筑材料间之空间暴露于一种或多种如上所述的源自 Muscodor 的组合物。

在农业应用上，本发明提供处理或保护水果、种子、植物、以及植物周围的土壤，包括盆栽土壤混合物，免于微生物、昆虫、或线虫侵扰的方法，其使水果、种子、植物、以及植物周围的土壤暴露于一种或多种如上所述的源自 Muscodor 的组合物。

实施例

实施例 1：制备 Muscodor 载体制剂

将 pH 3.7 的含酵母提取物（5 克/升）、葡萄糖（20 克/升）、以及可溶性淀粉（4 克/升）的培养基（10 升）在发酵罐中灭菌。然后用活的 Muscodor 种子培养物（0.2 升）接种发酵罐，并在约 25℃下操作。机械地搅拌（300 rpm）并充气（0.3 vvm）发酵培养基。发酵 7 天之后，采收含高密度真菌细胞的全发酵培养液。使用全培养液（0.17 升）作为接种物，接种在 2.8-公升培养瓶内的灭菌糙米砾（200 克干燥砂砾含 200 毫升水）。使载体内的真菌在 20－25℃以及 65%的水含量下生长 7 天。在烧瓶内生长的 Muscodor 载体中添加入 284 毫升的乳糖溶液（10%w/v）。载体经空气干燥至水含量为 5-15%用于储藏。

实施例 2：鉴定经 Muscodor 载体制剂制备的挥发性有机化合物

分析由使用糙米砾作为载体的经 Muscodor 制剂产生的挥发性的成分。第一个步骤，载体中每克 M. albus 使用 1.78 毫升水再水合 Muscodor 制剂。然后，将如上所述的 Muscodor 制剂（2.5 克）置于 250 毫升 Erlenmeyer 烧瓶并用胶塞密封。使用"固相微萃取"注射器捕获真菌的挥发物。纤维材料（Supelco）是在稳定伸展纤维上的聚二甲基硅氧烷上的 50/30 二乙烯苯/carburen。将注射器置于胶塞隔中并在气相下暴露 25 分钟。然后将注射器插入装有火焰电离检测器（FID）的气相层析仪（Hewlett Packard 5890 Series II）。使用薄膜厚度 0.50 毫米的 30 米 x 0.25 毫米 I.D 的 ZB Wax 毛细管柱分离挥发物。柱温度设定如下：31℃至 220℃，5℃/分钟，总运行时间为 43.8 分钟。注射器温度是 250℃。载体气体是 Helium Ultra High Purity（局部分配器）以及起始柱头压是 105 kPa。在诱捕挥发物之前，纤维是在 250℃、低氦气流动下平衡 30 分钟。注射时间是 30 秒，将样本丝引入到 GC。在相同条件下，分析纯标准化合物以证实 Muscodor 制剂成分的特性。观察到的挥发性有机化合物特性示于表 1。

表 1

	糙米砾上的 M. albus(再水合)
挥发性有机化合物	总面积（%）
乙基异丁酸酯 (丙酸，2-甲基，乙基酯)	2.9
丙酸乙酯(丙酸，乙基酯)	47
异丁醇(2-甲基-1 丙醇)	3.2
异丁酸(丙酸，2-甲基)	5.2
甲基 2-甲基丁酸酯 (丙酸，2-甲基，甲基酯)	2.6
苯乙醇(苯乙醇)	3.6
3-甲基丁基乙酸酯 (1-丁醇，3-甲基，乙酸酯)	5.5
3-甲基-1-丁醇 (1-丁醇，3-甲基)	28.2

实施例 3: Muscodor 载体制剂控制猝倒（damping off）的生物活性

随时间以及若干温度上测试 Muscodor 制剂样品在土壤盆测试（soil pot test）中控制猝倒的功效。具体而言，将温室土壤混合物用在 PDA 中生长 5-7 天的茄属丝核菌（Rhizoctonia solani）培养物感染。在混合器内将二个培养板的培养物与水研磨 30 秒并混合一升的土壤（Fafard no.2）。然后将部分茄属丝核菌感染的土壤和下列二种 Muscodor 载体制剂之一混合：含有糖稳定剂例如乳糖（如实施例 1 所述制备）的载体或不添加糖稳定剂的载体（如实施例 1 所述制备，除了没有在空气干燥之前添加乳糖的最终步骤）。将 100 毫升经 Muscodor 载体制剂处理的茄属丝核菌感染的土壤置于数个塑料罐的每一个中，每种处理有 3-4 个重复罐。仅有病原体的对照与没有感染的对照包括在各实验之内。过夜培育之后，各罐表面散布大约 70 个嫩茎花椰菜种子，覆盖上未感染的盆栽混合物（potting mix），然后用喷雾瓶湿润。此时将所述罐置于水盘 1 h 进行加水，之后排除过量的水。然后于实验期间视需要添加入水。荧光下大约 6-7 天之后，计数健康的幼苗，结果表示为未感染的对照组的萌发百分比。Muscodor 载体制剂具有良好的控制（经茄属丝核菌引起的）猝倒病的功效。

如表 2 所示，上述实验是用新鲜制备的 Muscodor 载体制剂（含或不含稳定剂）以及在各种不同的温度下储存了各种不同时间的制剂进行。含糖稳定剂的 Muscodor 载体制剂具有商业应用的可接受的稳定性。相反的，不含糖稳定剂的 Muscodor 载体制剂则迅速地失去的杀虫活性。

表 2

干燥糙米砾载体的稳定性 每 300 毫升土壤 2.25 克干燥载体的猝倒(茄属丝核菌)试验				
含稳定剂的载体				
储藏温度	嫩茎花椰菜幼苗萌发(非接种对照的%)			
	0 天	1 个月	3 个月	6 个月
4℃	107.5%	81.3%	100.9%	101.4%
室温	107.5%	71.3%	103.7%	99.2%
40℃	107.5%	84.6%	99.5%	未测试
不含稳定剂的载体				
储藏温度	嫩茎花椰菜幼苗萌发(非接种对照的%)			
	0 天	1 个月	2 个月	4 个月
4℃	79.2%	10.7%	5.9%	1.0%
室温	79.2%	0.0%	0.0%	未测试
40℃	79.2%	8.5%	0.0%	未测试

实施例 4: 制备包封的 Muscodor 载体制剂

离心如实施例 1 所述的经由发酵方法制备的 Muscodor 的全培养液。将所得的真菌菌丝体沉淀(10 毫升)添加入 90 毫升含有 5%乳糖的 0.3 M $CaCl_2$溶液中。然后使用 60-ml 注射器将混合物逐滴添加到搅拌的 0.5%(w/v)藻酸盐溶液中。然后将大约 1 升的无菌去离子水添加入含有胶囊的藻酸盐溶液中。使用滤纸过滤收集湿胶囊。将此胶囊于通风柜中空气干燥。将约 15 个干燥胶囊添加入 250-ml 烧瓶,然后添加 3 毫升马铃薯葡萄糖培养液至干燥胶囊中。二天后,观察到一些真菌的生长并用气相层析法分析烧瓶顶部空间中气体样品。如表 3 所示,在顶部空间发现典型的 Muscodor 的挥发性有机化合物。

表 3

	在包封材料内的 M. albus
挥发性有机化合物	总面积(%)
丁酸乙酯(丁酸，乙基酯)	0.4
乙基异丁酸酯(丙酸，2-甲基，乙基酯)	1.2
丙酸乙酯(丙酸，乙基酯)	41.2
异丁醇(2-甲基-1-丙醇)	3.4
异丁酸(丙酸，2-甲基)	12.6
2-甲基丁基乙酸酯(1-丁醇，2-甲基，乙酸酯)	0.34
2-甲基-1-丁醇(1-丁醇，2-甲基)	35.1
甲基 2-丁酸甲酯(丙酸，2-甲基，甲基酯)	0.9
苯乙醇(苯乙醇)	1.3

实施例 5:鉴定生长在黑麦上的 Muscodor 产生的挥发性有机化合物

将 150 克黑麦谷物和 250 毫升水置于 2 L 烧瓶并连续二天高压灭菌两次、每次 30 分钟，以制备 M. albus 黑麦谷物培养物。烧瓶中以添加切成小立方体的一半含量的 PDA 平皿培养物或以吸管移入 25 毫升的液体菌丝体悬浮液接种。添加小立方体的固体培养物至含有 100 毫升马铃薯葡萄糖培养液的 1 L 烧瓶并在旋转振荡器上振荡使菌丝体悬浮液生长。定殖的（colonized）谷物培养物可在 10-15 天之内使用。

如上述实施例 2 所述分析挥发性有机化合物的产生。一种由实施例 2 中 Muscodor 载体制剂产生的气体新颖成分（丙酸乙酯）在黑麦谷物制剂中以高浓度产生。观察到的挥发性有机化合物特征如表 4 所示。

表 4

	黑麦谷物定殖（colonized）的 M. albus
挥发性有机化合物	总面积（%）
丁酸乙酯（丁酸，乙基酯）	0.14
乙基异丁酸酯（丙酸，2-甲基，乙基酯）	0.71
丙酸乙酯（丙酸，乙基酯）	9.63
异丁醇（2-甲基-1-丙醇）	1.37
异丁酸（丙酸，2-甲基）	14.9
2-甲基丁基乙酸酯（1-丁醇，2-甲基，乙酸酯）	2.4
2-甲基-1-丁醇（1-丁醇，2-甲基）	48.5
甲基 2-甲基丁酸酯（丙酸，2-甲基，甲基酯）	0.26
苯乙醇（苯乙醇）	5.7

实施例 6:黑麦上生长的 Muscodor 产生的挥发性有机化合物的生物学活性。

抗所选的真菌的活性

测试了在马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）以及黑麦谷物上的 M. albus 产生的挥发物对许多真菌的抑制性和致死活性。对于 PDA 平板培养物，将各平板切一个沟（不含培养基）以物理上分成二个琼脂部分，以确保任何抑制仅是由于空气可扩散的化合物。在一个部分上生长 M. albus 7 天之后，将三个测验真菌的琼脂块（plug）置于另一部分，以及将全部的平板用石蜡膜密封。三天之后，评估测验真菌的生长。缺少生长下，转移测验块至新鲜的 PDA 平板评估测验块的存活。5 天之后不显示生长现象的测验块则判定已死亡。

类似地是使用"Y"平板分成三等份，每部分 5 或 10 个黑麦谷物以及将测验块置于 PDA 上的另一部分，测试黑麦谷物培养物。第三部分是保持空的。如上所述评估测验块的生长以及存活。

结果表示成生长（G）或无生长（NG），圆括号内是死亡的测验块的数目/总测验块。

表 5

真菌	PDA 培养物	5个黑麦谷物	10个黑麦谷物
柱孢属（Cylindrocarpon）菌菌株 A	NG(0/6)	NG(3/3)	NG(3/3)
柱孢属菌菌株 B	NG(0/6)	NG(3/3)	NG(3/3)
白地霉（Geotrichum candidum）	NG(6/6)	NG(3/3)	NG(3/3)
地霉属 citri-auranti	NG(6/6)	NG(3/3)	NG(3/3)
尖孢镰孢（Fusarium oxysporum）菌株 A	G	G	NG(2/3)
尖孢镰孢菌株 B	NG(0/3)	NG(0/3)	NG(3/3)
茄属丝核菌	NG(3/3)	NG(3/3)	NG(3/3)
木霉属(Trichoderma sp.)	G	G	G

虽然无论使用何种 M. albus 培养物均可抑制并杀死一些病原体，例如：白地霉、地霉属 citri-auranti 以及茄属丝核菌，但证明黑麦培养物对于更难杀死的病原体，例如柱孢属以及尖孢镰孢、木霉属、非病原性真菌更具活性，证明不论培养物或所使用剂量为何，这些病原体对 M. albus 挥发物不敏感。

抗甜菜粘虫（甜菜夜蛾）的活性。

将含有大约 150 克定殖 M.albus 的高压灭菌黑麦种的三个小塑料烧杯置于塑料盒（大约 250 in^2）中。将伴盒设在室温而无三个烧杯的真菌。两个盒子均含有 PDA 的培养板，其中心具有茄属丝核菌小测验块（plug）作为生物测定的指示物。将含有覆盖人工饲料的甜菜粘虫卵的 96 孔微量滴定板引入各盒。二天之后，盒内无 Muscodor 的卵开始孵化，而茄属丝核菌则发展出新菌丝体。盒内含 M. albus 的黑麦培养物的粘虫卵则未孵化。此外，茄属丝核菌的生长受到抑制。5 天之后，未处理的盒中的粘虫已达到第二至第三蜕期。

在另一实验中，将含有已在人工饲料中生长三天的粘虫幼虫的成对微量滴定板引入盒中。相较于未处理的对照，停止饲育 Muscodor 盒内的平板且保持发育不良。五天之后，处理平板内的粘虫死亡。

抗玉米根虫甲虫（十二点叶甲（Diabrotica undecimpunctata））的活性

将含有覆盖着人工饲料的玉米根虫卵的成对微量滴定板也引入盒中。当平板引入测验盒时虫卵正好开始孵化。Muscodor 盒中大约有一半的虫卵孵化。剩余的虫卵未孵化，且所有新生小虫于二天内死亡。一周之后，在未处理的对照盒内的微量滴定板产生了正常的感染，每孔发展出 3-6 个第三蜕期蛴螬（grub）。

实施例 7:鉴定生长在马铃薯葡萄糖琼脂上的 Muscodor 产生的挥发性有机化合物

Muscodor albus 培养物生长在培养皿中的马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）上。设计了一个方法来分析生长在培养皿中的 M. albus 菌丝体之上的空间中的气体。使用"固相微萃取（Solid Phase Micro Extration）"注射器捕获真菌的挥发物。纤维材料（Supelco）是在稳定伸展纤维上聚二甲基硅氧烷上的 50/30 二乙烯苯/ carburen。将注射器通过在培养皿侧边钻开的小孔暴露至气相 45 分钟。然后将注射器插入到装有质量-选择性检测器的气相层析仪（Hewlett Packard 5890 Series II Plus）中。使用膜厚度 0.50 毫米的 30 米 x 0.25 毫米 I.D ZB 蜡毛细管柱分离挥发物。管柱的温度程序化如下：25℃，2 分钟，以 5℃/分钟至 220℃。载体是 Helium Ultra High Purity（局部分配器）以及起始柱头压是 50 kPa。 使 He 压随箱温度倾斜（ramp）而倾斜以保持分离过程中恒定的载体气体流速。在诱捕挥发物之前，纤维在 240℃、氦气流下平衡 20 分钟。注射时间是 30 秒，将样本丝（sample fiber）注射到 GC。气相层析仪连接 VG 70E-HF 双聚焦磁性质谱仪，在质量分辨率 1500 下操作。MS 的扫描速率是 0.50 秒/质量衰变，质量范围 35-360 amu。数据收集以及数据处理是用 VG SIOS/ OPUS 接口以及软件包进行。经由 NIST 数据库文库比较初步鉴定由 M. albus 产生的未知物。

对仅含有 PDA 和含有所得到的化合物（大部分是苯乙烯）的培养

板进行类似的分析，并从对含有真菌的平板所作的分析中减去。使用此处所述的 GC/MS 方法，在真正的标准品的相对基础上，对 28 个化合物中的 20 个化合物进行了最后的鉴定。然而，有 8 种仅含有约 20%挥发物的其它化合物仅根据 NIST 数据库的信息进行了试验性地鉴定，而未包括在任何使用 M. albus 化合物的人工混合物的生物测试中。

所观察到的挥发性有机化合物的特征如表 6 所示。在表内，符号*意指未在标准化合物或所分析的化合物的光谱中观察到分子-离子吸收峰。符号#意指观察到此成分的光谱和滞留时间，且该物质与 NIST 数据库内最可能的化合物符合，但数据并未经使用适当的相同标准化合物经滞留时间或 MS 证实。此类化合物没有置于生物测试中的人工混合物中。

表 6: M. albus 产生的挥发性的化合物的 GC/MS 分析

RT	总面积(%)	M/z	可能的化合物	MW
3:45	0.33	114	辛烷	114
4:19	0.93	58	丙酮	58
4:37	0.68	74	乙酸甲酯	74
5:56	7.63	88	乙酸乙酯	88
6:51	0.31	102	丙酸，2-甲基，甲基酯	102
7:16	6.24	*	乙醇	46
8:03	2.07	116	丙酸，2-甲基-乙基酯	116
11:45	0.58	*	丙酸，2-甲基 2-甲基丙酯	144
12:05	2.06	74	异丁醇	74
12:50	22.24	*	1-丁醇，3-甲基，乙酸酯	130
14:57	1.53	*	丙酸，2-甲基，3-甲基丁基酯	158
15:28	22.99	*	1-丁醇，3-甲基-	88
16:08	0.29	138	#呋喃，2-戊基-	138
18:53	0.29	142	#4-壬酮	142
20:38	0.41	142	2-壬酮	142
21:07	0.30	204	#萘，十氢-4a-甲基-1-亚甲基-7-(1-甲基亚乙基)-，(4aR-反)-	204
22:54	1.51	204	#甘菊环（azulene），1,2,3,4,5,6,7,8-八氢-1,4-二甲基-7-(1-甲基乙烯基)-，[1S-(1.α.,4.α.,7.α.)]	204
23:16	0.94	204	#环己烯，4-(1,5-二甲基-1,4-己二烯基)-1-	204

			甲基-	
25:20	3.63	204	# 1H-3a,7-亚甲基甘菊环,2,3,4,7,8,8a-六氢-3,6,8,8 四甲基-, [3R-(3. α., 3a. β ,7. β.,8a. α.)]	204
25:30	6.08	88	丙酸, 2-甲基	88
26:04	0.48	204	石竹烯	204
27:55	0.34	204	#萘, 1,2,4a,5,6,8a-六氢-4,7-二甲基-1-(1-甲基乙基)-, [1 R-(1. α.,4a. α.,8a. α.))	204
28:34	0.36	204	#螺[5.5]十一-2-稀, 3,7,7-三甲基-11-亚甲基	204
28:50	1.07	204	甘菊环, 1,2,3,5,6,7,8, 8a-八氢-1, 4-二甲基-7-(1-甲基乙烯基), [1S-(1. α.,7. α.,8a. β.)]俗名: 布藜烯 (Bulnesene)	204
28:57	3.24	204	萘, 1,2,3,5,6,7,8,8a-八氢-1,8a-二甲基-7-(1-甲基乙烯基)-, [1 R-(1. α.,7. β.,8a. α.)]俗名: 朱栾倍半萜 (Valencene)	204
31:12	1.74	*	乙酸, 2-苯基乙基酯	164
33:17	1.06	122	苯基乙醇	122
39:00	9.76	204	未知的	204

实施例 8:生长在 PDA 上的 Muscodor 产生的挥发性有机化合物的生物活性。

真菌以及人类病原体

从 PDA 板的中间移除一条琼脂，产生二个大约相等且可生长微生物的分开部分，如于 Strobel 等人 2001 所述。一个 M. albus 培养物琼脂块（plug）置于一个部分上，并用塑料袋封住平板生长 10 天。十天后对另一部分接种各种不同的真菌性病原体，以无 M. albus 的分开平板作为对照。各处理有三个平板。扩展青霉（Penicillium expansum）、桃褐腐病菌（Monilinia fructicola）、白色假丝酵母（Candida albicans）以及细菌以孢子/细胞悬浮液应用，而其它病原体是以各平板中单一的 3 或 6 毫米菌丝体块施用。3 天之后测量菌落直径评估病原体的生长。实验结束后将接种区域琼脂转移至新鲜的 PDA 平板再分离病原体，评估其存活性。

在 M. albus 存在下，除了 F.solani 以及 F.oxysporum lycopersici 之外没有病原体生长（表 11），并且他们的生长受到抑制。此外，虽然 M. albus 的挥发物抑制炭角菌属（Xylaria sp.）（M. albus 的近亲）的生长，但不杀死炭角菌属（表 11）。

线虫（秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans)）

将使用“沟（moat）”系统（Worapong 等人，2001）的平板一侧接种 M. albus，并在相对一侧接种大肠杆菌或含大肠杆菌的自由存活线虫。设置不含 Muscodor 的相同平板。五天之后不含 Muscodor 的平板产生大量的繁殖的线虫群，线虫群跨过沟并开始在培养皿的相对一侧繁殖。在对照平板上大肠杆菌生长成正常的菌落形态。Muscodor 处理的平板上长出基本的菌落，菌落的菌丝越过 PDA 的表面。出现的线虫行动迟缓，但是是活动的。经过七天，Muscodor 到达 PDA 的边缘以及菌丝到达带大肠杆菌的平板的沟以及带圆形蠕虫的平板。琼脂上仅呈现少量活着的成年线虫，其活动性受到限制。

实施例 9：可分离自 Muscodor 的挥发性有机化合物的来源。

多数如上所述的在底物上由 M. albus 产生的挥发性有机化合物可得自 Aldrich Chem Co.，然而朱栾倍半萜得自 Fluka Chem Co.以及合成的布藜烯（bulnesene）是得自 Dr. Clayton Heathcock （U.C. Berkeley, Dept of Chemistry）并可依据 Heathcock and Ratcliffe（1971）的方法合成。

2-甲基丁基异丁酸酯以及 2-甲基丁基乙酸酯可依以下方法合成。

2-甲基丁基异丁酸酯（1-丁醇，2-甲基，丙酸酯，2-甲基）。在 0℃的 5ml 干燥 CH_2C1_2 溶液中的异丁酸（1.05ml，11mmol）的溶液中加入草酰氯（5.65ml，2.0M，己烷中）并搅拌 1 hr。然后缓慢加入 2-甲基-1-丁醇（1.23ml，0.011mol）以及在室温下搅拌 12 小时。添加稀 $NaHCO_3$ 终止反应并用己烷萃取（2 x 5ml）。合并有机层以及在空气气流下小心移除溶剂。^1H NMR（400 MHz，$CDC1_3$）δ 3.95（t，J =

6.4 Hz, $OC\underline{H}_2CH$), 2.37 (m, CH), 1.55 (m, $C\underline{H}_aH_bCH_3$), 1.37 (m, $C\underline{H}(CH_3)CH_aCH_b$), 1.01 (d, J = 7.2 Hz, $(C\underline{H}_3)_2CH$), 0.77 (d, J = 6.4 Hz, 2 x CH_3)。

2-甲基丁基乙酸酯。在 RT 下添加 0.5 克 DMAP 至 2-甲基-1-丁醇 (1.0ml, 9.2mmol) 的 2.0ml 己烷溶液并搅拌 30 分钟。然后将溶液冷却至 0℃, 添加过量的乙酰氯 (1.2ml) 以及在 RT 下搅拌 12 小时。加水终止反应并用己烷萃取 (2 x 2ml)。在空气气流下小心的移除溶剂。^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.81 (dd, J = 11 和 6 Hz, $OC\underline{H}_aCH_bCH$), 3.72 (dd, J= 11 和 6.8 Hz, $OCH_aC\underline{H}_bCH$), 1.91 (s, $C\underline{H}_3CO$), 1.56 (m, $C\underline{H}_aH_bCH_3$), 1.32 (m, $CH_3CH_2C\underline{H}$), 1.05 (m, $CH_aH_bCH_3$), 0.79 (d, J = 7.2, $C\underline{H}_3CH_2$), 0.77 (d, J = 7.6 Hz, $C\underline{H}_3CH$)。

其它非市售酯类是依据 Hoefle, G.等人 (1978) 的酰化方法中的一些制备。

丙酸, 2-甲基, 3-甲基丁基酯。将异丁酰氯 (2ml, 19.1mmol) 缓慢加入 0℃的异戊醇 (1ml, 9.5mmol)、4-二甲基氨基吡啶 (583mg, 4.8mmol)、以及吡啶 (0.85ml, 10.5mmol) 的二氯甲烷溶液的溶液中。加入完全之后 5 分钟出现明显的沉淀。在氩气下搅拌 12 h 之后, 将反应倒至 20ml 的 0.1N HCl 中。分层后, 水层用 20ml 的二氯甲烷萃取。合并有机层, 用 10ml 饱和的氯化铵水溶液清洗, 然后用 10ml 饱和的碳酸氢钠水溶液清洗。用硫酸镁干燥有机层, 过滤, 以及在真空下浓缩。经由 14mm 的 Vigreaux 柱 (bp 60-62 ℃, 25mm) 蒸馏纯化。产生的澄清、无色的油在 Amberlyst 15 中搅拌去除任何残留的异丁酰氯。^1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) 4.09 (t, 2H, J 6.7), 2.53 (m, 1H), 1.68 (m, 1H), 1.52 (q, 2H, J 6.5), 1.16 (d, 6H, J 7.0), 0.92 (d, 6H, J 6.5)。

丙酸, 2-甲基-乙基酯。将异丁酰氯 (2ml, 19.1mmol) 缓慢加入 0℃的乙醇 (0.55ml, 9.5mmol)、4-二甲基氨基吡啶 (583mg, 4.8mmol)、以及吡啶 (0.85ml, 10.5mmol) 的二氯甲烷溶液的溶液中。加入完全之后 5 分钟出现明显的沉淀。在氩气下搅拌 12 h 之后, 将反应倒至

20ml 0.1N HCl 中。分层后水层用 20ml 的二氯甲烷萃取。合并有机层，用 10ml 饱和的氯化铵水溶液清洗，然后用 10ml 饱和的碳酸氢钠水溶液清洗。用硫酸镁干燥有机层，过滤，以及在真空下浓缩。经由 14mm Vigreaux 柱（bp 102℃）蒸馏纯化。 ^{1}H（300 MHz, $CDCl_3$） 4.12（q, 2H, J7.2），2.52（m, 1H），1.25（t, 3H, J 6.9），1.16（d, 6H, J 7.2）。

1-丁醇，3 甲基，乙酸酯。在氩气氛下逐滴添加乙酰氯（6.5ml, 91.8mmol）至 0℃的异戊醇（5ml, 45.9mmol）、N,N-二甲基吡啶（2.8g, 23mmol）、以及无水的吡啶（4.1ml, 50.5 mol）的二氯甲烷（92ml）溶液的溶液中。将反应混合物倒至 100ml 的 0.1N HCl 中，以及分离产生的分层。有机层用 50ml 饱和的氯化铵水溶液清洗，然后用硫酸镁干燥。过滤有机层以及在真空下浓缩产生澄清的油。产生的油经蒸馏（bp 134-136℃）纯化以生成乙酸异戊酯。 ^{1}H NMR （300 MHz, $CDCl_3$） 4.08（t, 2H, J 6.9），2.03（s, 3H），1.68（m, 1H），1.51（q, 2H, J 6.9），0.92（d, 6H, J 6.6）。

实施例 10:可分离自 Muscodor 的挥发有机化合物的合成混合物。

许多实验显示挥发性有机化合物的人工混合物可提供对抗植物致病性真菌的活性。

可分离自生长在糙米砾以及黑麦谷物的Muscodor albus的挥发性有机化合物的合成混合物的活性。

在一组实验中，将培养板用塑料壁分隔成 3 等份空间用于测试。在含有 PDA 的培养平板的一个部分中置入茄属丝核菌（R. solani）块。在平板的另一部分，放置含测验化合物的 1x2cm 的无菌的滤纸块。所有平板包上二层之 saran 薄膜以及在室温下温育。各平板的顶部空间是 65ml。去除琼脂块并置于新鲜的 PDA 培养平板上测定暴露至各测验化合物的茄属丝核菌的存活。在无测验化合物的一边进行对照实验。

异丁酸以及 3-甲基-1-丁醇对茄属丝核菌具有致死效应，与将茄

属丝核菌暴露至 M. albus 后观察到（参阅表 7）的相似。此外，三种化合物的简单混合物显示了该致死效应。该混合物含有 28.5μl 的 2-甲基-1-丁醇、28.5μl 的丙酸乙酯以及 3μl 的异丁酸（参阅表 8）。测试许多其它简单混合物（参阅表 8），其可抑制茄属丝核菌生长但是不会使病原体致死。此外，含有六个或七个挥发性有机化合物的混合物（如表 9 以及 10 所示）显示对茄属丝核菌具有致死效应。因此，可使用挥发性的化合物的人工混合物摹拟 M. albus 的活性。

表 7-10 列出了如上所述的实验结果。未处理的对照平板上茄属丝核菌落的直径是 70-72mm。在以上各表中存活栏中的（+）符号意指生物体暴露至给定的化合物或混合物以及从给定的化合物或混合物移除后持续的存活性，而（-）符号意指生物体已死亡。相同栏内多重（+）以及（-）符号指出多重试验的结果。

表 7. 各挥发性有机化合物对 R. solani 的效应。

编码	化合物	量		3 天后菌落直径 (mm)	存活
		μ l/65ml 顶部空间	ppm		
A	2-甲基-1-丁醇	(60 μ l/65ml) 0.92	750	无生长	(+)
	2-甲基-1-丁醇	(30 μ l/65ml) 0.46	375	30.5	(+)
	2-甲基-1-丁醇	(15 μ l/65ml) 0.23	188	55	(+)
	2-甲基-1-丁醇	(7 μ l/65ml) 0.11	90	66	(+)
B	2-甲基丁基乙酸酯	0.92	940	41	(+)
	2-甲基丁基乙酸酯	0.46	470	56	(+)
	2-甲基丁基乙酸酯	0.23	235	70	(+)
	2-甲基丁基乙酸酯	0.11	112	70	(+)
C	异丁醇	0.92	737	15	(+)
	异丁醇	0.46	369	58	(+)
	异丁醇	0.23	184	70	(+)
	异丁醇	0.11	90	70	(+)
D	甲基 2-甲基丁酸酯	0.92	814	23.3	(+)
E	甲基异丁酸酯	0.46	820	32	(+)
	甲基异丁酸酯	0.23	410	45.5	(+)
	甲基异丁酸酯	0.11	196	56	(+)
F	丙酸乙酯	0.92	819	13.5	(+)
G	乙基异丁酸酯	0.92	798	36.5	(+)
H	丁酸乙酯	0.92	809	无生长	(+)
I	苯乙醇	0.46	940	67.5	
	苯乙醇	0.23	470	66.5	
J	异丁酸	0.92	873	无生长	无
	异丁酸	0.46	437	4	(+/-)
	异丁酸	0.23	218	12	(+)
K	3-甲基-1-丁醇	0.92	744	无生长	无
	3-甲基-1-丁醇	0.46	372	绒毛 (fuzz)	(+)
	3-甲基-1-丁醇	0.23	186	70	
	3-甲基-1-丁醇	0.11	89	70	

表 8：挥发性有机化合物的混合物的效应

混合物	编码	量/(65ml 顶部空间)	3 天后菌落直径(mm)	存活
1	A/C	各 30μl (0.92)	7.5	(+)
2	A/F	各 30μl (0.92)	无生长/绒毛(fuzz)	(+)
3	A/H	各 30μl (0.92)	无生长	(+)
4	C/H	各 30μl (0.92)	12.5	(+)
5	F/H	各 30μl (0.92)	11	(+)
6	C/F	各 30μl (0.92)	14.5	(+)
7	A/C/H	各 20μl (0.92)	无生长/绒毛(fuzz)	(+)
8	A/F/H	各 20μl (0.92)	5	(+)
9	A/C/F/H	各 15μl (0.92)	绒毛 (fuzz)	(+)
10	C/F/H	各 20μl (0.92)	18.5	(+)
11	A/C/J	28.5μl A/C+3μl J	无生长	(+)
12	A/F/J	28.5μl A/F+3μl J	无生长	无
13	A/H/J	28.5μl A/H+3μl J	无生长	(+/-)
14	C/H/J	28.5μl C/H+3μl J	绒毛 (fuzz) /9.0	(+)
15	F/H/J	28.5μl F/H+3μl J	6/无生长	(+)
16	C/F/J	28.5μl C/F + 3μl J	无生长/绒毛(fuzz)	(+)
17	F/J/K	28.5μl F/K + 3μl J	无生长	(+)
18	H/J/K	28.5μl H/K + 3μl J	无生长	(+)
19	A/C/H/J	19μl A/C/H + 3μl J	无生长	(+/-)
20	A/F/H/J	19μl A/F/H + 3μl J	无生长	(+)
21	C/F/H/J	19μl C/F/H + 3μl J	无生长	(+)
22	A/C/F/H/J	14.25μl A/C/F/H + 3μl J	无生长	(+)
23	K/C/F/H/J	14.25μlK/C/F/H + 3μl J	无生长	(+)
		对照组	70-72	

表 9.不同浓度的若干挥发性有机化合物混合物对 R.solani 的效应。

组合(量/65ml 顶部空间)							
混合物化合物	A (μl)	B (μl)	1.25x B	1.5x B	1.75x B	C (μl)	D (μl)
2-甲基-1-丁醇	16	32	40	48	56	64	96
丁酸乙酯	7	14	17.5	21	24.5	28	42
异丁醇	1.5	3	3.75	4.5	5.25	6	9
苯乙醇	1.5	3	3.75	4.5	5.25	6	9
乙基异丁酸酯	1	2	2.5	3	3.5	4	6
2-甲基丁基乙酸酯	2	4	0	0	0	8	12
异丁酸	1.5	3	3.75	4.5	5.25	6	9
菌落生长(mm)	10.3	3.3	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长
活性	(+)	(+/-)	(+/-/-)	(+/+/-)	(-/-/-)	(-)	(-)

表 10. 若干挥发性有机化合物混合物对 R. solani 的效应

量/ 65ml 顶部空间		
化合物	A（μl）	B（μl）
3-甲基-1-丁醇	16	56
丁酸乙酯	7	24.5
异丁醇	1.5	5.25
苯乙醇	1.5	5.25
乙基异丁酸酯	1	3.5
异丁酸	1.5	5.25
菌落生长(mm)	无生长/绒毛	无生长
活性	(+)	(-)

可分离自生长在马铃薯葡萄糖琼脂上的Muscodor albus的挥发性有机化合物合成混合物的活性

在另一组实验中，将可分离自生长在马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）上的Muscodor albus的挥发性有机化合物以其在该培养物的气相中的相关比例在小瓶内制备测试溶液。将测验混合物置于位于含有 PDA 的培养平板中心的预先灭菌的微量杯（4x6mm）内。当未使用时该混合物储存在 0℃。新鲜生长的测验生物体切成 $3mm^3$ 的琼脂块（每测验真菌至少 3 个琼脂块），置于距微量杯 2-3cm，将平板用二层石蜡膜包封并在 23℃下生长 2 天或更久。测定从琼脂块边沿的菌丝体生长。然而，对于细菌以及白色假丝酵母则在 PDA 平板的测验侧划线接种，并检查新的可看见的生长以及活性，通过从已经被接种的 PDA 平板的原始区域再划线接种。也设置了适当的对照，其中微杯中未放置测试溶液。对 PDA 平板上每 50 CC 之空域的 3.2-90μl 的人工混合物进行了 3 重复测试，以取得各测验生物体的 IC_{50} 数据。经无菌下移除小琼脂块以及置于 PDA 平板以及观察 1-3 天之后的生长，测验微生物之活性。

如表 11 所示，所有暴露在可分离自生长在 PDA 上的 Muscodor albus 的挥发物的合成混合物的病原体的生长受到抑制，且由于暴露于合成混合物而多数的病原体被杀死。

在以下的表 11 内，应用在 GC/MS 分析中获得的化合物的电子电离横截面（总面积的%）得到用于人工混合物各阳性确认化合物的量。（参

见表 6）。表 6 内的化合物中，前面有#符号的化合物不包括在合成混合物之内。下面表 11 内的符号#意指该实验设计内未测量某一特定的生物体的数据。

表 11. M.albus 挥发性化合物以及 M.albus 化合物的合成混合物对一组检验微生物的效应。

测验微生物	暴露 M.albus 2 天后相对于对照的生长%	暴露 M.albus 培养物 3 天后的存活	人造大气中 2 天后的 IC_{50} (μl /CC)	人造大气中相对于对照的生长%(mm)	暴露人造大气 3 天后的存活
终极腐霉	0	死亡	0.48±0.01	0	死亡
肉桂疫霉	0	死亡	0.29±0.06	0	死亡
扩展青霉	0	死亡	#	#	#
茄属丝核菌	0	死亡	0.08±0.02	0	死亡
大麦坚黑粉菌	0	死亡	0.31±0.09	0	死亡
Stagnospora nodorum	0	死亡	0.15±0	0	死亡
油菜核盘菌	0	死亡	0.17±0.05	0	活着
Scerotinia minor	0	死亡	#	#	#
烟曲霉	0	死亡	0.41±0.05	0	活着
桃褐腐病菌	0	死亡	#	#	#
茄病镰孢	19.4±0.284	活着	1.13±0.07	42.0 ±2	活着
尖孢镰孢	4	活着	#	#	#
大理花轮枝孢	0	死亡	0.3±0	0	死亡
甜菜褐斑病菌(Cercospora beticola)	17.5± 3.5	活着	0.12±0.15	8±2	活着
Tapesia yallundae	0	死亡	0.64±0	0	死亡
炭角菌属.	25±0	活着	0.41±0.03	0	活着
Muscodor albus	100±0	活着	0.6±0	17.5±7.5	活着
大肠杆菌	0	死亡	#	0	死亡
金黄葡萄球菌	0	死亡	#	0	死亡
藤黄微球菌	0	死亡	#	0	死亡
白色假丝酵母	0	死亡	#	微量	活着
枯草杆菌	0	活着	#	0	活着

为了测定各类化合物相对的生物活性，也测试了各类化合物在全部混合物中之最适浓度的相对量，全部混合物为标准培养平板中的培养物上每 50 CC 空域的 60μl 的检验混合物。例如，酯类占鉴定挥发物混合物的 44%，以 26.4μl/50 CC（0.53μl/CC）空域测试对酯类进

行了测试，对各其它类鉴定的化合物应用了相同的过程。用选择的一组 7 个测验真菌完成测试。各组化合物对测验生物体均具有一些抑制活性（表 12）。然而，在类似的基础上，酯类比任何其它化合物更具抑制活性（表 12）。

对酯类中的各化合物进行了单独评估。当依表 6 条件对各酯进行类似测验时，1-丁醇，3-甲基，乙酸酯（3-甲基丁基乙酸酯）几乎完全具有表 6 所示的所有酯类的结果。它代表 62%的所有鉴定的组合酯类，因此在 0.32 μl/CC 的水平下测试。此外，丙酸，2-甲基，3-甲基丁基酯显示最小的抑制性生物活性，其它酯类部分只有小的活性或无活性。虽然酯类、以及 1-丁醇，3-甲基乙酯类在生物测定中有抑制性活性，但在任何测试的任何条件下，在标准的 3 天曝露期未观察到任何测验真菌的死亡（表 12）。这是重要的观察结果，因为在完全人工气氛以及在 M. albus 天然的培养平板气氛中均注意到检验生物体的死亡。结果强烈地显示 M. albus 挥发物具有附加的或者协同的机制。因此，各类化合物具有或多或少的抑制性活性，需要成分的混合物引起测验真菌以及细菌的死亡（表 11）。所有相对于未处理对照的菌丝体生长的测定如上所述。

表 12. 各类挥发性的化合物的抑制性影响表示为相对于无测验化合物存在的对照的测验微生物生长%

测验微生物#	醇类 0.48μl/cc 对照的生长 %	酯类 0.53μl /cc 对照的生长 %	酮类 0.02μl /cc 对照的生长 %	酸类 0.09μl /cc 对照的生长 %	脂类 0.08μl /cc 对照的生长 %
终极腐霉	11.2±4	0	67.5±7	40.9±3	75±0
茄属丝核菌	55±5	0	67.5±7.5	67.5±7.5	40±0
Tapesia yallundae	35±15	0	75±25	100±0	100±0
炭角菌属	75±25	0	100±0	100±0	100±0
油菜核盘菌	29±3	8.1±1.5	20.6±12	40±0	78±2
甜菜褐斑病菌	58±8	5±5	100±0	83±17	100±0
茄病镰孢	70±10	55±5	90±10	80±20	80±10

挥发性有机化合物间的协同作用

使用描述于 Richer （Richer, D.L. 1987）的 Limpel 方法研究了由 M. albus 产生的挥发性有机组分间的协同作用。Limpel 描述的协同作用的测定可用下列公式表示:

$E_e = X + Y - (XY/100)$

当 E_e 预期是二种抗真菌化合物的附加效应，X 为当以混合物中所用的比率单独施用抗真菌剂 A 时观察到的测验生物体的抑制百分比，Y 为当以混合物中所用的比率单独施用抗真菌剂 B 时观察到的测验生物体的抑制百分比。若观察到的效应（E_0） 大于预期效 应，则表示有协同作用。

设定实验研究测定 M. albus 产生的组分间是否具有协同作用。依据描述于以上实施例 10 的方法测试各挥发性有机化合物以及挥发性有机化合物混合物的生物活性。结果示于表 13。然后将挥发性有机化合物观察到的抑制性效应与以上公式计算的预期的附加效应比较。此比较亦展示于表 13。此结果显示由 M. albus 产生的挥发性有机化合物混合物可提供协同的抗真菌活性，观察到的抑制性效应大于预期效应。

下表中的编码相当于表 7 中各挥发性有机化合物的编码。

表 13: 挥发性有机化合物的混合物的效应

混合物	编码	量/65ml 顶部空间	3 天菌落生长的抑制百分比	3 天菌落生长的预期附加的抑制百分比	存活
1	A	30μl(0.92)	68	N/A	(+)
2	C	30μl (0.92)	0	N/A	(+)
3	F	30μl (0.92)	76	N/A	(+)
4	H	30μl (0.92)	86	N/A	(+)
5	A/C	各 30μl (0.92)	86	68	(+)
6	A/F	各 30μl (0.92)	100	92	(+)
7	A/H	各 30μl (0.92)	100	92	(+)
8	C/F	各 30μl (0.92)	83	76	(+)
9	对照	无化合物	0	0	(+)

参考文献

1. Heathcock,R.和 Ratcliff, R. (1971) J. Am. Chem. Soc. 93: 1746。

2. Hoefle, G.等人, (1978) Vorbrueggen, Agnew. Chem., Int. Ed. Engl. 17: 569。

3. Lin, J.等人(1991) Biotechnology and Bioengineering 38: 273-279。

4. Nelson, P. V. (1998) Greenhouse Operation and Management 5th ed. Prentice-Hall。

5. Richer, D. L. (1987) Pestic Sci. 19: 309-319。

6. Strobel, G. A.等人(2001) Microbiology 147: 2943-2950。

7. Strobel, G. A. 等人(1996) Microbiology 142: 435-440。

8. Strobel, G. A. 等人(2000) Mycotaxon. 76 257-266。

9. Worapong, J. 等人(2001) Mycotaxon. 79: 67-69。

序列表

<110> Strobel, Gary
Manker, Denise

〈120〉 新颖内生植物性真菌及使用方法

<130> AQ 2019.40

<140> Unknown
<141> 2002-04-11

<150> 60/283,902
<151> 2002-03-11

<150> 60/363,072
<151> 2001-04-16

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 2089
<212> DNA
<213> Muscodor albus

<400> 1
ccggttgatc ctgccagtag tcatatgctt gtctcaaaga ttaagccatg catgtctaag 60
tataagcaat tatacagcga aactgcgaat ggctcattaa atcagttatc gtttatttga 120
tagtacctta ctacttggat aaccgtggta attctagagc taatacatgc taaaaatccc 180
gactcacgga gggatgtatt tattagatta aaaaccaatg cccctcgggg ctttctggtg 240
attcataata acttcacgaa tcgcatggcc ttgcgccggc gatggttcat tcaaatttct 300
gccctatcaa ctttcgatgg cagggtcttg gcctgccatg gttacaacgg gtaacggagg 360
gttagggctc gacccggag aaggagcctg agaaacggct actacatcca aggaaggcag 420
caggcgcgca aattacccaa tcccgacacg gggaggtagt gacaataaat actgatacag 480
ggctcttttg ggtcttgtaa ttggaatgag tacaatttaa atcccttaac gaggaacaat 540
tggagggcaa gtctggtgcc agcagccgcg gtaattccag ctccaatagc gtatattaaa 600
gttgttgcag ttaaaaagct cgtagttgaa ccttgggcct ggctggccgg tccgcctcac 660
cgcgtgcact ggttcggccg ggcctttccc tctggggagc cccatgcctt tcattaggtg 720
tggtggggaa ccaggacttt tactgtgaaa aaattagagt gttcaaagca ggcctatgct 780
cgaatacatc agcatggaat aatagaatag gacgtgtggt tctatttttgt tggtttctag 840
gaccgccgta atgattaata gggacagtcg ggggtgtcag tattcaattg tcagaggtga 900
aattcttgga tttattgaag actaactact gcgaaagcat tcaccaagga tgttttcatt 960
aatcaggaac gaaagttagg ggatcgaaga cgatcagata ccgtcgtagt cttaaccata 1020
aactatgccg actagggatc gggcggtgtt atttttttgac ccgctcggca ccttacgaga 1080
aatcaaagtc tttgggttct gggggagta tggtcgcaag gctgaaactt aaagaaattg 1140
acggaagggc accaccagga gttaaccagc gttacattcg tcgcactctg ctccaaaaag 1200
taggcctgta gaaggctcgg tggcttgctg ataactacta gtctcctgta atggaggcga 1260
caccccttaaa gtgcggggac atcctgttaa aagtctagac gccggacctg gctcggaaac 1320
gagtccaggg cgccagatta accatctggg ttggctaata agtgctagac ttgggactat 1380
ccgcagccaa acacctgagc tgctagcagt acggtggagg ttcagagact tgacaggggt 1440
gggtgagcag tgttcgcttg cttaagataa agtccgggga cgcatgaaaa tgcagtccaa 1500
ctgtaataac ttacaaccgt aataacggga gcctgcggct taatttgact caacacgggg 1560
aaactcacca ggtccagaca caatgaggat tgacagattg agagctcttt cttgattttg 1620
tgggtggtgg tgcatggccg ttcttagttg gtggagtgat ttgtctgctt aattgcgata 1680
acgaacgaga ccttaacctg ctaaatagcc cctattgctt tggcagtagg ctggcttctt 1740
agagggacta tccgctcaag cggatggaag tttgaggcaa taacaggtct gtgatgccct 1800
tagatgttct gggccgcacg cgcgttacac tgacaggggc agcgagtact tccttagcag 1860

agatgcttgg gtaatcttgt taaaccctgt cgtgctgggg atagagcatt gcaattattg 1920
ctcttcaacg aggaattcct agtaagcgta agtcatcaac ttgcgttgat tacgtccctg 1980
ccctttgtac acaccgcccg tcgctactac cgattgaatg gctcagtgag gctttcggac 2040
tggcccaggg gagtcggcaa cgacacccca gggccggaaa gttatccaa 2089

<210> 2
<211> 652
<212> DNA
<213> Muscodor albus

<400> 2
tggaagtaaa agtcgtaaca aggtctccgt tggtgaacca gcggagggat cattacagag 60
ttttccaaac tcccaaccct atgtgaactt acctttgttg cttcggcggc ggaggctacc 120
ctatagggga taccacatag tggttaccct gtagtcccag gtgctagatc gtgctcaacg 180
tcttatcgtc tacgactagc tacccggtgg ccctcccccgc cggcggccaa ctaaactctg 240
ttttttatggc attctgaatt ataaacttaa taagttaaaa ctttcaacaa cggatctctt 300
ggttctggca tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag taatgtgaat tgcagaattc 360
agtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgcccatta gcattctagt gggcatgcct 420
gttcgagcgt catttcacca cttaagccct gttgcttagc gttgggagcc tacggcactg 480
cccgtagctc cctaaagtga ttggcggagt tggttctcac tctaggcgta gtaaatctat 540
ctcgcctctg tagtggttcc ggcccctgcc gtaaaacccc ctatatcaaa ggttgacctc 600
ggatcaggta ggaatacccg ctgaacttaa gcatatcaat aagccgggag ga 652

<210> 3
<211> 2055
<212> DNA
<213> Muscodor roseus

<400> 3
ccagtagtca tatgcttgtc tcaaagatta agccatgcat gtctaagtat aagcaattat 60
acagcgaaac tgcgaatggc tcattaaatc agttatcgtt tatttgatag taccttacta 120
cttggataac cgtggtaatt ctagagctaa tacatgctaa aaatcccgac tcacggaggg 180
atgtatttat tagattaaaa accaatgccc ctcggggctt tctggtgatt cataataact 240
tcacgaatcg catggccttg cgccggcgat ggttcattca aatttctgcc ctatcaactt 300
tcgatggcag ggtcttggcc tgccatggtt acaacgggta acggagggtt agggctcgac 360
cccggagaag gagcctgaga aacggctact acatccaagg aaggcagcag gcgcgcaaat 420
tacccaatcc cgacacgggg aggtagtgac aataaatact gatacagggc tcttttgggt 480
cttgtaattg gaatgagtac aatttaaatc ccttaacgag gaacaattgg agggcaagtc 540
tggtgccagc agccgcggta attccagctc caatagcgta tattaaagtt gttgcagtta 600
aaaagctcgt agttgaacct tgggcctggc tggccggtcc gcctcaccgc gtgcactggt 660
tcggccgggc ctttcccttt ggggagcccc atgcctttca ttaggtgtgg tggggaacca 720
ggacttttac tgtgaaaaaa ttagagtgtt caaagcaggc ctatgctcga atacatcagc 780
atggaataat agaataggac gtgtggttct attttgttgg tttctaggac cgccgtaatg 840
attaataggg acagtcgggg gtgtcagtat tcaattgtca gaggtgaaat tcttggattt 900
attgaagact aactactgcg aaagcattca ccaaggatgt tttcattaat caggaacgaa 960
agttagggga tcgaagacga ttgccacgag cccgggggct ctggtgcact ggttagccgg 1020
tgtatctggt cgtccataat taggcgcgag cctagttagt ctataacgca ctataggcga 1080
caccgtcaaa ttgcggggac atccttagag cctctaccac acctgcccgc tagaaatagc 1140
gagcagtcgt aacagcgtag gggattggac aatccgcagc caaatccgta ccctgagagg 1200
gctacccggg acttccgggt ggcactccgg ccaggatgca gttcacagac tagacgtcgg 1260
tgggggagta ctccttaaga tatagtcgag ccgccctaga aatggggcgt gatagaagca 1320
gataccgtcg tagtcttaac cataaactat gccgactagg gatcgggcgg tgttattttt 1380
tgacccgctc ggcaccttac gagaaatcaa agtctttggg ttctgggggg agtatggtcg 1440
caaggctgaa acttaaagaa attgacggaa gggcaccacc aggagtggag cctgcggctt 1500
aatttgactc aacacgggga aactcaccag gtccagacac aatgaggatt gacagattga 1560
gagctctttc ttgattttgt gggtggtggt gcatggccgt tcttagttgg tggagtgatt 1620
tgtctgctta attgcgataa cgaacgagac cttaacctgc taaatagccc ctattgcttt 1680
ggcagtaggc tggcttctta gagggactat ccgctcaagc ggatggaagt ttgaggcaat 1740
aacaggtctg tgatgcccct agatgttctg ggccgcacgc gcgttacact gacaggggca 1800
gcgagtactt ccttagcaga gatgcttggg taatcttgtt aaaccctgtc gtgctgggga 1860
tagagcattg caattattgc tcttcaacga ggaattccta gtaagcgtaa gtcatcaact 1920

tgcgttgatt acgtccctgc cctttgtaca caccgcccgt cgctactacc gattgaatgg 1980
ctcagtgagg ctttcggact ggcccagggg agtcggcaac gacaccccag ggccggaaag 2040
ttatccaaat cggtc 2055

<210> 4
<211> 650
<212> DNA
<213> Muscodor roseus

<400> 4
tggaagtaaa agtcgtaaca aggtctccgt tggtgaacca gcggagggat cattacagag 60
ttttctaaac tcccaaccct atgtgaactt acctttgttg cttcggcggc ggaggctacc 120
ctatagggga taccacatag tggttaccct gtagtcccag atgctagatc gtgctcaacg 180
tcttatcgtc tacgactagc tacccggtgg ccctccccgc cggcggccaa ctaaactctg 240
tttttatggc attctgaatt ataaacttaa taagttaaaa ctttcaacaa cggatctctt 300
ggttctggca tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag taatgtgaat tgcagaattc 360
agtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgcccatta gcattctagt gggcatgcct 420
gttcgagcgt catttaccac ttaagccctg ttgcttagcg ttgggagcct acggcactgc 480
ccgtagctcc ctaaagtgat tggcggagtt ggttctcact ctaggcgtag taaatctatc 540
tcgcctctgt agtggttccg gcccctgccg taaaaccccc tatatcaaag gttgacctcg 600
gatcaggtag gaatacccgc tgaacttaag catatcaata agccggagga 650