



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104080337 B

(45) 授权公告日 2016. 08. 31

(21) 申请号 201280052973. 9

(22) 申请日 2012. 09. 10

(30) 优先权数据

61/532, 234 2011. 09. 08 US

61/568, 435 2011. 12. 08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 04. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/054443 2012. 09. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/036922 EN 2013. 03. 14

(73) 专利权人 诺维信生物农业公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 R. S. 史密斯 A. 哈比卜 J. 科桑克

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司

公司 11322

代理人 龙淳 顾小曼

(51) Int. Cl.

A01N 43/16(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101115390 A, 2008. 01. 30,

CN 101115390 A, 2008. 01. 30,

CN 101578044 A, 2009. 11. 11,

CN 101578044 A, 2009. 11. 11,

WO 2009049747 A2, 2009. 04. 23,

US 6979664 B1, 2005. 12. 27,

WO 2005062899 A2, 2005. 07. 14,

审查员 张静静

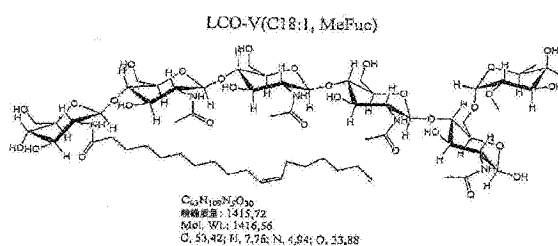
权利要求书2页 说明书16页 附图2页

(54) 发明名称

种子处理方法和组合物

(57) 摘要

公开的是增强植物生长的方法, 包括用有效量的植物信号分子在播种前至少一个月处理种子, 其中在收获时, 与由未经处理的种子收获的植物相比, 或与由使用信号分子在临播种前或在播种的一周或更短时间内处理的种子而收获的植物相比, 该植物表现出以下至少一项: 按蒲式耳/英亩测量的增加的植物产量、增加的根数目、增加的根长度、增加的根质量、增加的根体积和增加的叶面积。



1. 一种增强大豆生长的方法,包括用脂壳寡糖(LC0)在播种前至少一个月处理大豆种子,其中所述LC0由式[LC0-V(C18:1,MeFuc)]表示,并且与由LC0在播种前一周内处理的对照种子收获的植物相比,在收获后植物显现出以下至少一种:按蒲式耳/英亩测量的增加的产量、增加的根数目、增加的根长度、增加的根质量、增加的根体积和增加的叶面积。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述LC0是合成的。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述LC0是重组的。

4. 如权利要求1所述的方法,还包括将所述种子与至少一种解磷剂接触。

5. 如权利要求1所述的方法,还包括将所述种子与一种或多种青霉属的菌株接触。

6. 如权利要求1所述的方法,还包括将所述种子与一种或多种拜赖青霉(*P. bilaiae*)菌株接触。

7. 如权利要求6所述的方法,其中所述种子与选自以下的菌株接触:

保藏号为NRRL 50162的菌株;

保藏号为NRRL 50169的菌株;

保藏号为ATCC 20851的菌株;

保藏号为ATCC 22348的菌株;和/或

保藏号为ATCC 18309的菌株。

8. 如权利要求1所述的方法,还包括将所述种子与一种或多种*P. gaestrivorus*菌株接触。

9. 如权利要求8所述的方法,其中所述种子与保藏号为NRRL50170的菌株接触。

10. 如权利要求1所述的方法,还包括将所述种子与一种或多种根瘤菌的菌株接触。

11. 如权利要求1所述的方法,还包括将所述种子与一种或多种豌豆根瘤菌的菌株接触。

12. 如权利要求1所述的方法,还包括将所述种子与一种或多种中华根瘤菌的菌株接触。

13. 如权利要求1所述的方法,还包括将所述种子与一种或多种草木樨中华根瘤菌的菌株接触。

14. 如权利要求1所述的方法,还包括将所述种子与一种或多种慢生根瘤菌的菌株接触。

15. 如权利要求1所述的方法,还包括将所述种子与一种或多种大豆慢生根瘤菌的菌株接触。

16. 如权利要求1所述的方法,还包括将所述种子与杀真菌剂和/或杀虫剂接触。

17. 如权利要求1所述的方法,其中所述种子与甲霜林、噻虫胺、精甲霜灵、咯菌腈、噻虫嗪、和/或吡虫啉接触。

18. 如权利要求1所述的方法,其中所述种子与精甲霜灵、咯菌腈、和/或噻虫嗪接触。

19. 如权利要求1所述的方法,还包括将所述种子与壳寡聚体(CO)接触。

20. 如权利要求1所述的方法,还包括将所述种子与几丁质和/或壳聚糖接触。

21. 如权利要求1所述的方法,还包括将所述种子与类黄酮接触。

22. 如权利要求1所述的方法,其中所述LC0以 10^{-5} 至 10^{-14} 摩尔的浓度施用到所述种子。

23. 如权利要求1所述的方法,其中所述LC0以 10^{-5} 至 10^{-11} 摩尔的浓度施用到所述种子。

24. 如权利要求1所述的方法,其中所述LC0以 10^{-7} 至 10^{-8} 摩尔的浓度施用到所述种子。
25. 如权利要求1所述的方法,其中所述LC0以1至400 $\mu\text{g}/\text{cwt}$ 的量施用到所述种子。
26. 如权利要求1所述的方法,其中所述LC0以2至70 $\mu\text{g}/\text{cwt}$ 的量施用到所述种子。
27. 如权利要求1所述的方法,其中所述LC0以2.5至3.0 $\mu\text{g}/\text{cwt}$ 的量施用到所述种子。
28. 如权利要求1—27中任一项所述的方法,其中在播种前至少9个月用所述LC0处理所述种子。
29. 如权利要求1—27中任一项所述的方法,其中在播种前至少12个月用所述LC0处理所述种子。
30. 如权利要求1—27中任一项所述的方法,其中在播种前至少2年用所述LC0处理所述种子。

种子处理方法和组合物

背景技术

[0001] 革兰氏阴性土壤菌根瘤菌科(Rhizobiaceae)和慢生根瘤菌科(Bradyrhizobiaceae)与豆科植物例如大豆之间的共生关系有较多文献记载。这些关系的生化基础包括分子信号传导的交换,其中,植物对细菌的信号化合物包括黄酮、异黄酮和黄烷酮类,而细菌对植物的信号化合物包括慢生根瘤菌和根瘤菌nod基因表达的终产物,称为脂壳寡糖(LCO)。这些细菌与豆科植物之间的共生使得豆科植物能够固定大气氮从而在具有较低的可同化氮水平的土壤中生长,由此免去对氮肥的需求。由于氮肥会显著增加作物的成本,并且与许多污染效应相关,农产业继续努力运用这种生物关系并开发新的用于提高植物产量而不增加氮类肥料的使用的试剂和方法。

[0002] 美国专利第6,979,664号教导了增强植物作物的种子萌发或出苗的方法,包括以下步骤:提供包含有效量的至少一种脂壳寡糖和农业上适用的载体的组合物,以及在种子或幼苗的紧邻处以相较于未经处理的种子或幼苗能增强种子萌发或出苗的有效量施用该组合物。

[0003] 关于该概念的进一步拓展在W02005/062899中有过教导,其涉及至少一种植物诱导剂(即LCO)与杀真菌剂、杀虫剂或其组合的结合,以增强植物特性如植物挺立(plant stand)、生长、强健度(vigor)和/或产量。教导称这些组合物和方法适用于豆科植物和非豆科植物,并且可以用于处理种子(临播种前)、幼苗、根或植物。

[0004] 相似地,W02008/085958教导了用于在豆科植物和非豆科植物中增强植物生长和作物产量的组合物,其包含LCO与另一种活性剂如几丁质或壳聚糖、类黄酮化合物、或除草剂的组合,其可以同时或相继地应用于种子和/或植物。与在'899公开中的情况一样,'958公开教导了在临播种前对种子进行处理。

[0005] 大量其它的公开描述了LCO在种子处理过程中的益处,例如,Kidaj等人,“Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions,”Microbiol Res25426(2011)和Maj等人,“Pretreatment of Clover Seeds with Nod Factors Improves Growth and Nodulation of Trifolium pratense,”J.Chem Ecol(2009)35:479-487。

[0006] 最近,Halford,“Smoke Signals”,Chem.Eng.News(2010年4月12日)第37~38页报道,在森林起火后,烟中所含的karrikin或丁烯羟酸内酯起到生长刺激剂的作用并促使种子萌发,并且能滋补已储存的种子如玉米、西红柿、莴苣和洋葱。这些分子是美国专利第7,576,213号的主体。

发明内容

[0007] 本发明提供增强植物生长和作物生产的方法,其中可以得到植物信号分子(植物生长增强剂)的有益效果,而无需将植物信号分子(植物生长增强剂)在播种的同时施用于种子。本发明部分基于以下发现,即与经由未经处理的种子收获的植物相比,用例如LCO的植物信号分子处理种子,随后在播种前进行延长的储存,导致增强的植物生长,包括较高的

植物产量和/或叶表面积和/或根数目、长度和质量。本发明还提供增强植物生长和作物生产的方法,其中在经由临播种前或播种的一周或更短时间内处理的种子而产生的植物作物中可以获得额外的改进。

[0008] 本发明的第一方面涉及增强植物生长的方法,包括用有效量的植物信号分子在播种前至少一个月(三十天)处理种子。在实施方式中,可以根据本发明的方法在播种前2个月、在播种前至少3个月、在播种前至少4个月、在播种前至少5个月、在播种前至少6个月、在播种前至少9个月、在播种前至少1年、在播种前至少2年、且在一些实施方式中在播种前至少3年处理种子。

[0009] 使用该处理来产生与由未经处理的种子收获的植物相比显现出以下至少一种的植物(作物):按蒲式耳/英亩测量的增加的产量、增加的根数目、增加的根长度、增加的根质量、增加的根体积和增加的叶面积。在特定实施方式中,可以使用该处理来产生与由用信号分子在临播种前或在播种一周或更短时间内处理的种子收获的植物(作物)相比显现出以下至少一种的植物(作物):按蒲式耳/英亩测量的增加的产量、增加的根数目、增加的根长度、增加的根质量、增加的根体积和增加的叶面积。

[0010] 在本发明的某些实施方式中,植物信号分子是脂壳寡糖(LCO)。在一些实施方式中,LCO是重组的。在其它实施方式中,LCO是合成的。在其它实施方式中,LCO得自微生物,例如选自根瘤菌(*Rhizobium* sp.)、慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium* sp.)例如大豆慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)、中华根瘤菌(*Sinorhizobium* sp.)和固氮根瘤菌(*Azorhizobium* sp.)的根瘤菌菌种,或得自丛枝菌根真菌。

[0011] 在其它实施方式中,植物信号分子是几丁质化合物例如壳寡聚体(CO)。在一些实施方式中,CO是重组的。在其它实施方式中,CO是合成的。在其它实施方式中,CO得自如同LCO的微生物。

[0012] 在其它实施方式中,植物信号分子是类黄酮。在其它实施方式中,植物信号分子是茉莉酸、亚油酸、亚麻酸或其衍生物。在其它实施方式中,植物信号分子是karrikin。

[0013] 可以使用两种或更多种不同植物信号分子(或其类型)的组合来处理种子。

[0014] 在其它实施方式中,处理还包括使种子与至少一种其它的农艺学有益的试剂例如固氮生物(根瘤菌接种剂)、菌根真菌、解磷剂、除草剂、杀虫剂或杀真菌剂接触。在一些实施方式中,处理涉及将包含植物信号分子的组合物喷洒到种子上,且在一些其它实施方式中,处理涉及将组合物滴到种子上。

[0015] 本发明的方法同样适用于豆科植物和非豆科植物。在一些实施方式中,豆科种子是大豆种子。在一些其它实施方式中,经处理的种子是非豆科种子,例如大田作物种子,如玉米,或蔬菜作物种子。

[0016] 取决于特定的种子特性(储存之后的生存力)或产业标准,可以根据本发明的方法在从播种前1个月(30天)到1年、2年且在一些实施方式中甚至3年的任何时间处理种子。例如,大豆种子通常在下一季节播种,而玉米种子可以储存更长的时间,包括播种前3年以上。

[0017] 本发明还涉及用植物信号分子/植物生长增强剂例如LCO或CO处理的种子,其在播种前已被储存至少30天到1年、2年且在一些实施方式中甚至3年。

[0018] 本发明的又一方面涉及用植物信号分子/植物生长增强剂例如LCO或CO处理的经播种的种子,其在播种前已被储存至少30天到1年、2年且在一些实施方式中甚至3年。

[0019] 本发明的相关方面涉及包(package),其包括用于在处理之后播种的目的的根据本发明的经处理的种子。

[0020] 如在工作例(其包括在温室和田间条件下进行的比较实验)中所证实的,即使将信号分子在播种时间很久之前且在延长的储存时间之后施用到种子,也可以得到信号分子/植物生长增强剂的益处。

[0021] 如在工作例(其包括在温室和田间条件下进行的比较实验)中进一步所证实的,与未经处理的种子和在临播种前或在播种的一周内用LC0处理的种子相比,涉及用来自大豆慢生根瘤菌的LC0处理大豆种子的本发明的实施方式显现出增加的植物产量、叶表面积、以及增加的根长度和根体积。

附图说明

[0022] 图1和图2示出可用于实践本发明的脂壳寡糖化合物(LC0)的化学结构。

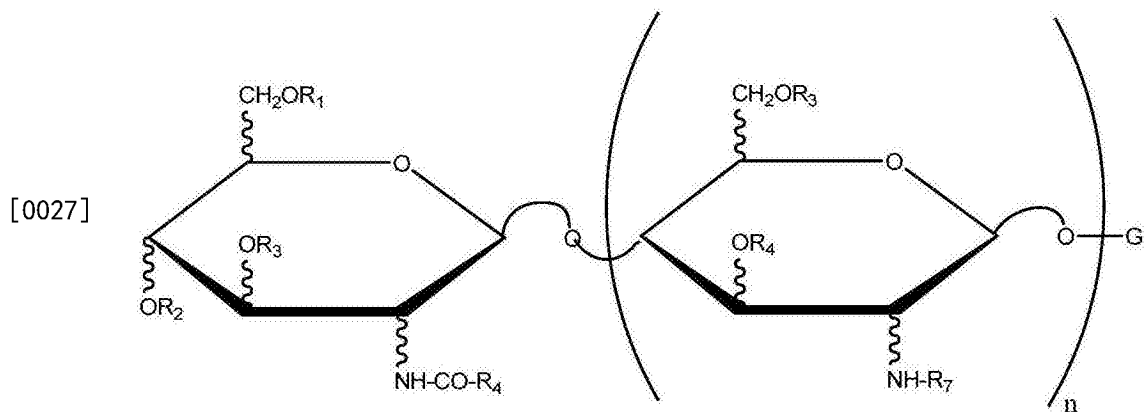
[0023] 图3是显示与对照(即未经处理的种子和用信号分子在播种前7天处理的种子)相比的由根据本发明实施方式(例如播种前55天)处理的种子而萌发的19天大的大豆植物上的第一片三叶的平均表面积的条形图。

具体实施方式

[0024] 出于本发明的目的,可以与“植物生长增强剂”互换使用的术语“植物信号分子”广泛地指代任何在植物或微生物中天然出现的和合成的(其可以是非天然出现的)试剂,其直接或间接地活化植物生化通路,引起增加的植物生长,这至少在以下至少一方面是可度量的:按蒲式耳/英亩测量的增加的产量、增加的根数目、增加的根长度、增加的根质量、增加的根体积和增加的叶面积。可以用于实施本发明的植物信号分子的代表性实例包括脂壳寡糖化合物(LC0)、壳寡糖(CO)、几丁质化合物、类黄酮、茉莉酸、亚油酸和亚麻酸及其衍生物、以及karrikins。

[0025] 植物信号分子可以是分离和/或纯化的组分。术语“分离的”是指信号分子从其天然状态移除出来并与其它与之天然相关的分子分开。术语“纯化的”是指相对于其它组分例如不想要的或较差的组分,信号分子的浓度增加(经纯化工艺)。

[0026] 在领域内也称为共生Nod信号或Nod因子的LC0由在非还原端缩合有N-连接的脂酰链的 β -1,4-连接的N-乙酰基-D-葡萄糖胺(“GlcNAc”)残基的寡糖骨架构成。LC0在骨架中GlcNAc残基的数目、脂酰链的长度和饱和度、以及还原和非还原糖残基的取代方面不同。LC0的实例在以下呈现为式I:



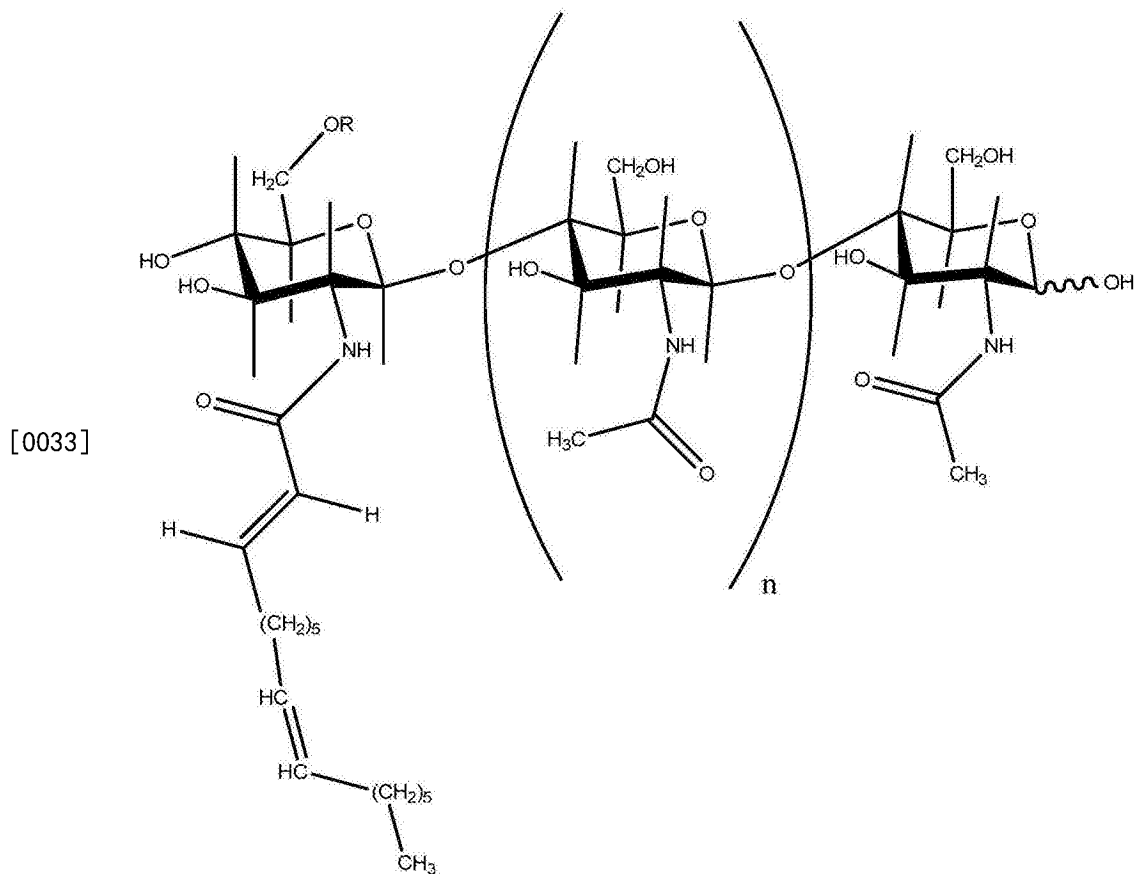
[0028] 其中：

[0029] G是己糖胺，其可以例如在氮上被乙酰基取代，在氧上被硫酸根、乙酰基和/或醚基取代，

[0030] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 和 R_7 可以相同或不同，表示H、 $\text{CH}_3\text{CO}-$ 、 $\text{C}_x\text{H}_y\text{CO}-$ （其中x是0~17的整数，且y是1~35的整数）、或任何其它酰基例如氨甲酰基，

[0031] R_4 表示含有至少12个碳原子的单、二或三不饱和以及四不饱和的脂肪链，且n是1~4的整数。

[0032] LC0可以得（例如分离和/或纯化）自例如根瘤菌的细菌，诸如根瘤菌、慢生根瘤菌、中华根瘤菌和固氮根瘤菌。LC0结构对于各个这些细菌物种是特有的，并且各个菌株可以产生多种具有不同结构的LC0。例如，来自草木樨中华根瘤菌（*S.meliloti*）的具体LC0已记载于美国专利第5,549,718号中，具有式II：



[0034] 其中,R表示H或CH₃CO—,且n等于2或3。

[0035] 更具体的LC0包括NodRM、NodRM-1、NodRM-3。当被乙酰化时(R=CH₃CO—),它们分别变成AcNodRM-1和AcNodRM-3(美国专利第5,545,718号)。

[0036] 来自大豆慢生根瘤菌的LC0记载于美国专利第5,175,149和5,321,011号中。广泛而言,它们是包括甲基岩藻糖的五糖植物激素。大量的这些源自大豆慢生根瘤菌的LC0被记载:BjNod-V(C_{18:1});BjNod-V(Ac,C_{18:1});BjNod-V(C_{16:1});和BjNod-V(Ac,C_{16:0}),其中“V”表示存在五个N-乙酰基葡萄糖胺;“Ac”表示乙酰化;“C”后面的数字表明脂肪酸侧链中碳的数目;且“:”后面的数字表示双键的数目。

[0037] 本发明实施方式中使用的LC0可以从产生LC0的细菌菌株,例如固氮根瘤菌属、慢生根瘤菌属(包括大豆慢生根瘤菌)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)、根瘤菌属(包括豌豆根瘤菌(*R.leguminosarum*))、中华根瘤菌属(包括草木樨中华根瘤菌)的菌株以及遗传工程改造为产生LC0的菌株中回收。

[0038] LC0是豆科植物共生中宿主特异性的主要决定因子(Diaz等人,*Mol.Plant-Microbe Interactions*13:268-276(2000))。由此,在豆科中,根瘤菌的特定属和种与特定的豆科宿主发展出共生的固氮关系。这些植物-宿主/细菌组合记载于Hungria等人,*Soil Biol.Biochem.*29:819-830(1997)。这些细菌/豆科植物共生伙伴关系的实例包括草木樨中华根瘤菌/苜蓿和草木樨;豌豆根瘤菌蚕豆生物变异型(*R.leguminosarum* biovar *viciae*)/豌豆和小扁豆;豌豆根瘤菌菜豆生物变异型(*R.leguminosarum* biovar *phaseoli*)/菜豆;大豆慢生根瘤菌/大豆;以及豌豆根瘤菌三叶草生物变异型(*R.leguminosarum* biovar *trifolii*)/红三叶草。Hungria还列举了有效的根瘤菌菌种的类黄酮Nod基因诱导物,和由不同根瘤菌菌种产生的具体LC0结构。然而,LC0特异性仅需用在豆科植物中建立结瘤。在本发明的实践中,既定LC0的用途并不限于对其共生豆科植物伙伴的种子进行处理,以实现与由未经处理的种子收获的植物相比,或与由使用信号分子在临播种前或在播种的一周或更短时间内处理的种子而收获的植物相比,按蒲式耳/英亩测量的增加的植物产量、增加的根数目、增加的根长度、增加的根质量、增加的根体积和增加的叶面积。由此,通过实例的方式,从大豆慢生根瘤菌得到的LC0可以用于处理大豆以外的豆科种子和非豆科种子例如玉米。作为另一实例,图1中示出的可从豌豆根瘤菌中得到的豌豆LC0(命名为LC0-V(C_{18:1}),SP104)也可以用于处理豌豆以外的豆科种子和非豆科种子。

[0039] 本发明还包括,从丛枝菌根真菌例如球囊菌(*Glomerocycota*)的真菌(例如根内球囊霉(*Glomus intraradicus*))中得到(例如分离和/或纯化)的LC0的用途。从这些真菌得到的代表性LC0的结构记载于W02010/049751和W02010/049751(本文记载的LC0也称为“Myc因子”)。

[0040] 本发明还包括,合成型LC0化合物例如记载于W02005/063784中的那些、以及通过遗传工程产生的重组LC0的用途。基本的天然出现的LC0结构可以含有在天然出现的LC0中发现的修饰或取代,例如记载于Spaink,*Crit.Rev.Plant Sci.*54:257-288(2000)和D' Haeze等人,*Glycobiology*12:79R-105R(2002)中的那些。用于构建LC0的前体寡糖分子(C0,在以下说明,也可以用作本发明中的植物信号分子)也可以通过遗传工程有机体来合成,例如,如Samain等人,*Carb.Res.*302:35-42(1997)中所述。

[0041] LCO可以以多种纯度形式进行利用,并且可以单独使用或以LCO产生细菌或真菌的培养物的形式进行使用。例如,OPTIMIZE®(从Novozymes BioAg Limited市售可得)含有产生图2中所示的LCO(LCO-V(C18:1,MeFuc),MOR116)的大豆慢生根瘤菌的培养物。提供基本纯的LCO的方法包括,简单地从LCO与微生物的混合物中去除微生物细胞,或通过LCO溶剂相分离以及之后的HPLC色谱而继续分离并纯化LCO分子,例如在美国专利第5,549,718号中记载的。通过重复的HPLC可以增强纯化,且可以将纯化的LCO分子进行冻干以用于长期储存。

[0042] 作为真菌细胞壁以及昆虫和甲壳类动物的外骨骼的主成分的几丁质和壳聚糖也由GlcNAc残基构成。几丁质化合物包括几丁质(IUPAC:N-[5-[[3-乙酰氨基-4,5-二羟基-6-(羟甲基)环氧乙烷-2基]甲氧基甲基]-2-[[5-乙酰氨基-4,6-二羟基-2-(羟甲基)环氧乙烷-3-基]甲氧基甲基]-4-羟基-6-(羟甲基)环氧乙烷-3-基]乙酰胺)、和壳聚糖(IUPAC:5-氨基-6-[5-氨基-6-[5-氨基-4,6-二羟基-2-(羟甲基)环氧乙烷-3-基]氧-4-羟基-2-(羟甲基)环氧乙烷-3-基]氧-2(羟甲基)环氧乙烷-3,4-二醇)。这些化合物可以商购自例如Sigma-Aldrich,或者可以从昆虫、甲壳类动物的壳或真菌细胞壁制得。制备几丁质和壳聚糖的方法为领域内已知,并已记载于例如美国专利第4,536,207号(由甲壳类动物的壳制备)、Pochanavanich等人,Lett.Appl.Microbiol.35:17-21(2002)(由真菌细胞壁制备)和美国专利第5,965,545号中(由蟹壳以及市售壳聚糖的水解进行制备)。可以得到小于35%至大于90%去乙酰化的去乙酰化几丁质和壳聚糖,且其涵盖较广范围的分子量,例如小于15kD的低分子量壳聚糖寡聚体和0.5~2kD的几丁质寡聚体;分子量为约150kD的“实用级(practical grade)”壳聚糖;和高达700kD的高分子量壳聚糖。配制用于种子处理的几丁质和壳聚糖组合物也市售可得。市售产品包括,例如ELEXA®(Plant Defense Boosters, Inc.)和BEYOND™(Agrihouse, Inc.)。

[0043] 适用于本发明的其它的几丁质化合物包括C0(例如分离的和/或纯化的)。C0在领域内已知是被鉴定为几丁质寡聚体的 β -1-4连接的N乙酰基葡糖胺结构,也已知是N-乙酰基壳寡糖。C0具有独特且不同的侧链修饰,这使其不同于几丁质分子[(C₈H₁₃NO₅)_n, CAS No.1398-61-4]和壳聚糖分子[(C₅H₁₁NO₄)_n, CAS No.9012-76-4]。描述C0的结构和制备的代表性文献如下所示:Van der Holst等人,Current Opinion in Structural Biology,11:608-616(2001);Robina等人,Tetrahedron58:521-530(2002);Hanel等人,Planta232:787-806(2010);Rouge等人Chapter27,“The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates”,Advances in Experimental Medicine and Biology,Springer Science;Wan等人,Plant Cell121:1053-69(2009);PCT/F100/00803(9/21/2000);以及Demont-Caulet等人,Plant Physiol.120(1):83-92(1999)。两种适用于本发明的C0可以容易地源自图1和图2所示的LCO(减去脂肪酸链),其是图1和2中所示的LCO的C0前体。制备重组C0的方法在领域内已知。参见,例如,Samain等人(同上);Cottaz等人,Meth.Eng.7(4):311-7(2005)和Samain,等人,J.Biotechnol.72:33-47(1999)。

[0044] 类黄酮是具有两个芳族环由三碳桥连接的一般结构的酚类化合物。类黄酮由植物产生并具有多种功能,例如,作为有益的信号传导分子,以及作为对抗昆虫、动物、真菌和细菌的保护物质。类黄酮的分类包括查耳酮、花青素、香豆素、黄酮、黄烷醇、黄酮醇、黄烷酮和异黄酮。参见,Jain等人,J.Plant Biochem.&Biotechnol.11:1-10(2002);Shaw等人,

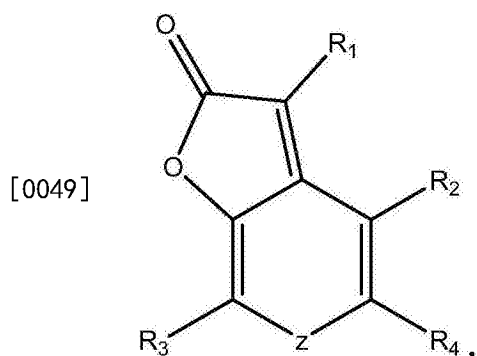
Environmental Microbiol.11:1867-80(2006)。

[0045] 可用于实施本发明的代表性类黄酮包括染料木黄酮、大豆黄酮、芒柄花素、柚皮素、橙皮素、木樨草素和芹菜素。类黄酮化合物可以从例如Natland International Corp., Research Triangle Park, NC; MP Biomedicals, Irvine, CA; LC Laboratories, Woburn MA 商购得到。类黄酮化合物可以从植物或种子中分离,例如,如在美国专利第5,702,752;5,990,291;和6,146,668号中所记载。类黄酮化合物还可以通过遗传工程有机体例如酵母来产生,如Ralston等人,Plant Physiology137:1375-88(2005)中所记载。

[0046] 在其它实施方式中,用茉莉酸(JA,[1R-[1 α ,2 β (Z)]]-3-氧代-2-(戊烯基)环戊烷乙酸)及其衍生物、亚油酸((Z,Z)-9,12-十八碳二烯酸)及其衍生物、和亚麻酸((Z,Z,Z)-9,12,15-十八碳三烯酸)及其衍生物处理种子。茉莉酸及其甲酯(茉莉酸甲酯(MeJA)),统称为茉莉酮酸酯,是在植物中天然出现的十八烷(octadecanoid)类化合物。茉莉酸由小麦幼苗的根部产生,以及通过真菌微生物例如可可球二孢菌(*Botryodiplodia theobromae*)和藤仓赤霉(*Gibberella fujikuroi*)、酵母(酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))以及大肠杆菌(*Escherichia coli*)的致病性菌株和非致病性菌株产生。亚油酸和亚麻酸在茉莉酸的生物合成过程中产生。茉莉酸酮酯、亚油酸和亚麻酸(及其衍生物)被报道为根际细菌(rhizobacteria)nod基因表达或LCO产生的诱导物。参见,例如Mabood,Fazli,Jasmonates induce the expression of nod genes in *Bradyrhizobium japonicum*,May17,2001;和Mabood,Fazli,"Linoleic and linolenic acid induce the expression of nod genes in *Bradyrhizobium japonicum*,"USDA3,May17,2001。

[0047] 可用于实施本发明的亚油酸、亚麻酸和茉莉酸的有用衍生物包括酯、酰胺、糖苷和盐。代表性的酯是其中亚油酸、亚麻酸或茉莉酸的羧基已被--COR基团取代的化合物,其中R是--OR¹基,且其中R¹为:烷基,例如C₁~C₈无支链或支链的烷基,如甲基、乙基或丙基;烯基,例如C₂~C₈无支链或支链的烯基;炔基,例如C₂~C₈无支链或支链的炔基;具有例如6~10个碳原子的芳基;或具有例如4~9个碳原子的杂芳基,其中杂芳基中的杂原子可以是例如N、O、P或S。代表性的酰胺是其中亚油酸、亚麻酸或茉莉酸的羧基已被--COR基取代的化合物,其中R是NR²R³基,且其中R²和R³独立地为:氢;烷基,例如C₁~C₈无支链或支链的烷基,如甲基、乙基或丙基;烯基,例如C₂~C₈无支链或支链的烯基;炔基,例如C₂~C₈无支链或支链的炔基;具有例如6~10个碳原子的芳基;或者具有例如4~9个碳原子的杂芳基,其中杂芳基中的杂原子可以是例如N、O、P或S。酯可以通过已知方法进行制备,例如酸催化的亲核加成,其中羧酸与醇在催化量的无机酸的存在下进行反应。酰胺也可以通过已知方法进行制备,例如通过使羧酸与合适的胺于中性条件下在偶联剂比如二环己基碳二亚胺(DCC)的存在下进行反应。亚油酸、亚麻酸和茉莉酸的合适的盐包括,例如碱加成盐。可以用作制备这些化合物的代谢上可接受的碱盐的试剂的碱包括源自阳离子例如碱金属阳离子(例如钾和钠)和碱土金属阳离子(例如钙和镁)的那些。这些盐可以通过将亚油酸、亚麻酸或茉莉酸的溶液与碱溶液混合在一起而容易地制备。盐可以从溶液中沉淀出,并通过过滤收集或可以通过其他方法例如通过溶剂蒸发而回收。

[0048] 在其它实施方式中,用插烯型4H-吡喃酮例如2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(包括其衍生物和类似物)或其生物学可接受的盐处理种子,其实例由以下结构表示:



[0050] 其中:Z是O、S或NR₅;R₁、R₂、R₃和R₄各自独立地为H、烷基、烯基、炔基、苯基、苄基、羟基、羟烷基、烷氧基、苯氧基、苄氧基、CN、COR₆、COOR₇、卤素、NR₆R₇或NO₂;且R₅、R₆和R₇各自独立地为H、烷基或烯基。这些化合物的生物学可接受的盐的实例可以包括与生物学可接受的酸形成的酸加成盐,其实例包括盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐或硫酸氢盐、磷酸盐或磷酸氢盐、乙酸盐、苯甲酸盐、琥珀酸盐、富马酸盐、马来酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、葡糖酸盐;甲磺酸盐、苯磺酸盐和对甲苯磺酸。其它生物学可接受的金属盐可以包括与碱形成的碱金属盐,其实例包括钠盐和钾盐。该结构所包含的且可以适用于本发明的化合物的实例包括以下:3-甲基-2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中R₁=CH₃,R₂、R₃、R₄=H)、2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中R₁、R₂、R₃、R₄=H)、7-甲基-2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中R₁、R₂、R₄=H,R₃=CH₃)、5-甲基-2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中R₁、R₂、R₃=H,R₄=CH₃)、3,7-二甲基-2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中R₁、R₃=CH₃,R₂、R₄=H)、3,5-二甲基-2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中R₁、R₄=CH₃,R₂、R₃=H)、3,5,7-三甲基-2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中R₁、R₃、R₄=CH₃,R₂=H)、5-甲氧基甲基-3-甲基-2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中R₁=CH₃,R₂、R₃=H,R₄=CH₂OCH₃)、4-溴-3,7-二甲基-2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中R₁、R₃=CH₃,R₂=Br,R₄=H)、3-甲基呋喃并[2,3-c]吡啶-2(3H)-酮(其中Z=NH,R₁=CH₃,R₂、R₃、R₄=H)、3,6-二甲基呋喃并[2,3-c]吡啶-2(6H)-酮(其中Z=N-CH₃,R₁=CH₃,R₂、R₃、R₄=H)。参见,美国专利第7,576,213号。这些分子也称为karrikin。参见,Halford,同上。

[0051] 可以用植物信号分子以数种方式但优选经喷洒或滴液来处理种子。喷洒和滴液处理可以通过在通常为水性性质的农业上可接受的载体中配制有效量的植物信号分子,并经连续处理系统(其已校准为以预定速率与种子的连续流成比例地施加处理)例如卧筒式处理器将组合物喷洒或滴到种子上而进行。这些方法有利地采用相对少量的载体,从而使经处理的种子相对快速地干燥。按照这样方式,可以高效地处理大量的种子。也可以采用分批系统,其中将预定批量的种子和信号分子组合物输送至混合器。用于进行这些工序的系统 and 装置可以商购自许多供应商,例如Bayer CropScience(Gustafson)

[0052] 在另一实施方式中,处理涉及涂覆种子。一种这样的工序涉及用组合物涂覆圆形容器的内壁,添加种子,然后转动容器以使种子与内壁和组合物接触,在领域内称为“容器涂覆”的工序。种子可以通过涂覆方法的组合进行涂覆。浸泡通常涉及使用含有植物生长增强剂的水溶液。例如,种子可以浸泡约1分钟至约24小时(例如,至少1min、5min、10min、20min、40min、80min、3hr、6hr、12hr、24hr)。一些类型的种子(例如,大豆种子)趋向于对湿度敏感。因此,将这些种子浸泡延长的时间段可能并不可取,在这种情况下,浸泡通常执行约1分钟至约20分钟。

[0053] 不期望受任何特定操作理论的束缚, 申请人认为, 即使处理可能不会使植物信号分子在处理上和任意储存时段保持与种子表面接触, 信号分子也可以通过称为种子记忆或种子感知的现象而实现其预期效果。参见, Macchiavelli 和 Brelles-Marino, J. Exp. Bot. 55 (408): 2635-40 (2004)。申请人还认为, 在处理后, 信号分子例如 LCO 朝着发育中的幼根扩散, 并活化共生和发育基因, 引起植物根构型的改变。尽管如此, 含有植物信号分子的组合物还可以含有粘着剂或涂覆剂以帮助信号分子粘合到种子上。出于美学目的, 组合物还可以含有涂覆聚合物和/或着色剂。

[0054] 用于处理种子的植物信号分子的有效量, 以浓度单位表示, 通常为约 10^{-5} 至约 10^{-14} M, 且在一些实施方式中为约 10^{-5} 至约 10^{-11} M, 且在一些其他实施方式中为约 10^{-7} 至约 10^{-8} M。以重量单位表示, 有效量通常为约 1 至约 400 μ g/英担 (cwt) 种子, 且在一些实施方式中为约 2 至约 70 μ g/cwt 种子, 且在一些其他实施方式中为约 2.5 至约 3.0 μ g/cwt 种子。然而, 植物信号分子的有效量可以通过合适的剂量反应检定优选在温室和/或田间研究中获得。

[0055] 处理还可涉及使种子在与植物信号分子接触之前、同时或之后接触农业/农艺学有益的试剂。如本文和本领域所使用的, 术语“农业或农艺学有益”是指在施用至种子时引起植物特性例如植物挺立、生长、强健度或产量在与未经处理的种子相比有所增强(其可以是统计学上显著的)的试剂。可用于实施本发明的这样的试剂的代表性实例包括但不限于固氮生物、菌根真菌、除草剂、杀真菌剂、杀虫剂和解磷剂。

[0056] 适当的除草剂包括苯达松、氟锁草醚、氯嘧磺隆、乳氟禾草灵、广灭灵、吡氟禾草灵、草铵膦、草甘膦、稀禾定、咪唑乙烟酸、甲氧咪草烟、氟磺胺草醚、氟烯草酸、灭草嗪、和烯草酮。含有这些化合物中的每一种的市售产品容易可得。组合物中除草剂的浓度将通常与所标记的对于特定除草剂的使用量相对应。

[0057] 本文和本领域所用的“杀真菌剂”是杀灭或抑制真菌生长的试剂。如果相对于未经处理的群, 使用杀真菌剂的处理引起(例如, 土壤中的)真菌群的杀灭或真菌群的生长抑制, 则本文所用的杀真菌剂针对特定真菌菌种“表现出活性”。根据本发明的有效杀真菌剂将适当地针对较广范围的病原体表现出活性, 病原体包括但不限于疫霉属(Phytophthora)、丝核菌属(Rhizoctonia)、镰孢菌属(Fusarium)、腐霉菌属(Pythium)、拟茎点霉属(Phomopsis)或核盘菌属(Sclerotinia)和层锈菌属(Phakopsora)及其组合。

[0058] 市售杀真菌剂可适用于本发明。适当的市售可得的杀真菌剂包括 **PROTÉGÉ**、**RIVAL** 或 **ALLEGIANCE FL** 或 **LS** (Gustafson, Plano, TX)、**WARDEN RTA** (Agrilance, St. Paul, MN)、**APRON XL**、**APRON MAXX RTA** 或 **RFC**、**MAXIM4FS** 或 **XL** (Syngenta, Wilmington, DE)、**CAPTAN** (Arvesta, Guelph, Ontario) 和 **PROTREAT** (Nitragin Argentina, Buenos Aires, Argentina)。在这些和其他市售杀真菌剂中的活性成分包括, 但不限于, 咯菌腈、精甲霜灵、嘧菌酯和甲霜林。市售杀真菌剂最适合根据制造商的说明以推荐的浓度进行使用。

[0059] 如果相对于未经处理的群, 使用杀虫剂的处理引起昆虫群的杀灭或昆虫群的抑制, 则本文所用的杀虫剂针对特定昆虫物种“表现出活性”。根据本发明的有效杀虫剂将适当地针对较广范围的昆虫表现出活性, 昆虫包括但不限于, 线虫、切根虫、蛴螬、玉米根虫、种蝇、跳甲、麦长蝥、蚜虫、叶壳、和椿象。

[0060] 市售杀虫剂可适用于本发明。合适的市售可得的杀虫剂包括 **CRUISER** (Syngenta, Wilmington, DE)、**GAUCHO** 和 **PONCHO** (Gustafson, Plano, TX)。在这些和其他市售杀虫剂中的

活性成分包括噻虫嗪、噻虫胺、和吡虫啉。市售杀虫剂最适合根据制造商的说明以推荐的浓度进行使用。

[0061] 本文所使用的解磷剂包括但不限于解磷微生物。本文所使用的“解磷微生物”是能够增加植物可利用的磷量的微生物。解磷微生物包括真菌菌株和细菌菌株。在实施方式中，解磷微生物是产孢子微生物。

[0062] 解磷微生物的非限制性实例包括选自不动杆菌属(*Acinetobacter*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、节丛孢属(*Arthrobotrys*)、曲霉属(*Aspergillus*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、假丝酵母属(*Candida*)、金色单胞菌属(*Chryseomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、正青霉属(*Eupenicillium*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、克吕沃尔菌属(*Kluyvera*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、毛霉属(*Mucor*)、拟青霉属(*Paecilomyces*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、青霉属(*Penicillium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、链孢囊菌属(*Streptosporangium*)、*Swaminathania*属、硫杆菌属(*Thiobacillus*)、孢圆酵母属(*Torulospora*)、弧菌属(*Vibrio*)、黄色杆菌属(*Xanthobacter*)和黄单胞菌属(*Xanthomonas*)的菌种。

[0063] 解磷微生物的非限制性实例选自乙酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)、节杆菌(*Arthrobacter* sp.)、少孢节丛孢菌(*Arthrobotrys oligospora*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、曲霉菌(*Aspergillus* sp.)、*Azospirillum halopraeferans*、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)、越南伯克霍尔德菌(*Burkholderia vietnamiensis*)、克瑞斯假丝酵母(*Candida krissii*)、浅黄金色单胞菌(*Chryseomonas luteola*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、阿氏肠杆菌(*Enterobacter asburiae*)、肠杆菌(*Enterobacter* sp.)、泰洛肠杆菌(*Enterobacter taylorae*)、微细正青霉(*Eupenicillium parvum*)、微小杆菌(*Exiguobacterium* sp.)、克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.)、栖冷克吕沃尔菌(*Kluyvera cryocrescens*)、微杆菌(*Microbacterium* sp.)、多枝毛霉(*Mucor ramosissimus*)、蝙蝠蛾拟青霉(*Paecilomyces hepialid*)、马昆德拟青霉(*Paecilomyces marquandii*)、浸麻类芽孢杆菌(*Paenibacillus macerans*)、胶质类芽孢杆菌(*Paenibacillus mucilaginosus*)、成团泛菌(*Pantoea aglomerans*)、扩展青霉(*Penicillium expansum*)、*Pseudomonas corrugate*、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、*Pseudomonas lutea*、草假单胞菌(*Pseudomonas poae*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、斯氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)、平凡假单胞菌(*Pseudomonas trivialis*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、链霉菌(*Streptomyces* sp.)、链孢囊菌(*Streptosporangium* sp.)、*Swaminathania salitolerans*、氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)、球有孢圆酵母(*Torulospora globosa*)、解蛋白弧菌(*Vibrio proteolyticus*)、敏捷黄色杆菌(*Xanthobacter agilis*)和野油菜黄单胞菌

(*Xanthomonas campestris*)。

[0064] 优选地,解磷微生物是青霉属真菌的菌株。可用于实施本发明的青霉属真菌的菌株包括拜赖青霉(*P.bilaiae*, 早先称为*P.bilaii*)、微白青霉(*P.albidum*)、桔灰青霉(*P.aurantiogriseum*)、产黄青霉(*P.chrysogenum*)、黄暗青霉(*P.citreonigrum*)、桔青霉(*P.citrinum*)、指状青霉(*P.digitatum*)、常现青霉(*P.frequentas*)、褐青霉(*P.fusum*)、*P.gaestrivorus*、光孢青霉(*P.glabrum*)、灰黄青霉(*P.griseofulvum*)、纠缠青霉(*P.implicatum*)、微紫青霉(*P.janthinellum*)、淡紫青霉(*P.lilacinum*)、微黄青霉(*P.minioluteum*)、蒙大拿青霉(*P.montanense*)、黑青霉(*P.nigricans*)、草酸青霉(*P.oxalicum*)、*P.pinetorum*、嗜松青霉(*P.pinophilum*)、产紫青霉(*P.purpurogenum*)、*P.radicans*、放射青霉(*P.radicum*)、雷斯青霉(*P.raistrickii*)、皱褶青霉(*P.rugulosum*)、简青霉(*P.simplicissimum*)、离生青霉(*P.solitum*)、变幻青霉(*P.variabile*)、毡毛青霉(*P.velutinum*)、鲜绿青霉(*P.viridicatum*)、灰绿青霉(*P.glaucum*)、*P.fussiporus*和扩展青霉(*P.expansum*)。

[0065] 更优选地,解磷微生物青霉属菌种是拜赖青霉、*P.gaestrivorus*和/或其组合。更优选地,拜赖青霉菌株选自ATCC20851、NRRL50169、ATCC22348、ATCC18309、NRRL50162 (Wakelin等人,2004.*Biol Fertil Soils*40:36-43)且*P.gaestrivorus*菌株是NRRL50170 (参见,Wakelin,同上)。

[0066] 根据本发明,预想的是可以使用多于一种的解磷微生物,例如,至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种,包括不动杆菌属、节杆菌属、节丛孢属、曲霉属、固氮螺菌属、芽孢杆菌属、伯克霍尔德氏菌属、假丝酵母属、金色单胞菌属、肠杆菌属、正青霉属、微小杆菌属、克雷伯氏菌属、克吕沃尔菌属、微杆菌属、毛霉属、拟青霉属、类芽孢杆菌属、青霉属、假单胞菌属、沙雷氏菌属、寡养单胞菌属、链霉菌属、链孢囊菌属、*Swaminathania*属、硫杆菌属、孢圆酵母属、弧菌属、黄色杆菌属和黄单胞菌属的任意组合,包括选自乙酸钙不动杆菌、不动杆菌、节杆菌、少孢节丛孢菌、黑曲霉、曲霉菌、*Azospirillum halopraeferans*、解淀粉芽孢杆菌、萎缩芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、洋葱伯克霍尔德菌、越南伯克霍尔德菌、克瑞斯假丝酵母、浅黄金色单胞菌、产气肠杆菌、阿氏肠杆菌、肠杆菌、泰洛肠杆菌、微细正青霉、微小杆菌、克雷伯氏菌、栖冷克吕沃尔菌、微杆菌、多枝毛霉、蝙蝠蛾拟青霉、马昆德拟青霉、浸麻类芽孢杆菌、胶质类芽孢杆菌、成团泛菌、扩展青霉、*Pseudomonas corrugate*、荧光假单胞菌、*Pseudomonas lutea*、草假单胞菌、恶臭假单胞菌、斯氏假单胞菌、平凡假单胞菌、粘质沙雷氏菌、嗜麦芽寡养单胞菌、链霉菌、链孢囊菌、*Swaminathania salitolerans*、氧化亚铁硫杆菌、球有孢圆酵母、解蛋白弧菌、敏捷黄色杆菌和野油菜黄单胞菌的一种菌种。

[0067] 固氮生物是将大气氮气固定成更可用的形式例如氨的细菌和古生菌。固氮生物的实例包括来自根瘤菌属(例如解纤维素根瘤菌(*R.cellulosilyticum*)、大田市根瘤菌(*R.daejeonense*)、菜豆根瘤菌(*R.etli*)、山羊豆根瘤菌(*R.galegae*)、高卢根瘤菌(*R.gallicum*)、贾氏根瘤菌(*R.giardinii*)、海南根瘤菌(*R.hainanense*)、洪特拉根瘤菌(*R.huautlense*)、木兰根瘤菌(*R.indigoferae*)、豌豆根瘤菌(*R.leguminosarum*)、黄土根瘤菌(*R.loessense*)、羽扇豆根瘤菌(*R.lupini*)、*R.lusitanum*、草木樨根瘤菌(*R.meliloti*)、蒙古根瘤菌(*R.mongolense*)、*R.miluoense*、岩黄芪根瘤菌(*R.sullae*)、热带根瘤菌

(*R.tropici*)、居水根瘤菌(*R.undicola*)和/或杨凌根瘤菌(*R.yanglingense*))、慢生根瘤菌属(例如*B.bete*、*B.canariense*、埃氏慢生根瘤菌(*B.elkanii*)、*B.iriomotense*、大豆慢生根瘤菌(*B.japonicum*)、*B.jicamae*、辽宁慢生根瘤菌(*B.liaoningense*)、*B.pachyrhizi*和/或圆明慢生根瘤菌(*B.yuanmingense*))、固氮根瘤菌属(例如茎瘤固氮根瘤菌(*A.caulinodans*)和/或德贝莱纳固氮根瘤菌(*A.doebereineriae*))、中华根瘤菌属(例如*S.abri*、粘着中华根瘤菌(*S.adhaerens*)、美洲中华根瘤菌(*S.americanum*)、木本树中华根瘤菌(*S.aboris*)、费氏中华根瘤菌(*S.fredii*)、*S.indiaense*、柯斯帝中华根瘤菌(*S.kostiense*)、鸡眼草中华根瘤菌(*S.kummerowiae*)、苜蓿中华根瘤菌(*S.medicae*)、草木樨中华根瘤菌(*S.meliloti*)、墨西哥中华根瘤菌(*S.mexicanus*)、莫雷兰中华根瘤菌(*S.morelense*)、萨赫勒中华根瘤菌(*S.saheli*)、多宿主中华根瘤菌(*S.terangae*)和/或新疆中华根瘤菌(*S.xinjiangense*))、中慢生根瘤菌属(合欢中慢生根瘤菌(*M.albiziae*)、紫穗槐中慢生根瘤菌(*M.amorphae*)、查克中慢生根瘤菌(*M.chacoense*)、鹰嘴豆中慢生根瘤菌(*M.ciceri*)、华葵中慢生根瘤菌(*M.huakuii*)、百脉根中慢生根瘤菌(*M.loti*)、地中海中慢生根瘤菌(*M.mediterraneum*)、*M.pluifarium*、北方中慢生根瘤菌(*M.septentrionale*)、温带中慢生根瘤菌(*M.temperatum*)和/或天山中慢生根瘤菌(*M.tianshanense*))的菌及其组合。在具体实施方式中,固氮生物选自大豆慢生根瘤菌、豌豆根瘤菌、草木樨根瘤菌、草木樨中华根瘤菌及其组合。在另一实施方式中,固氮生物是大豆慢生根瘤菌。在另一实施方式中,固氮生物是豌豆根瘤菌。在另一实施方式中,固氮生物是草木樨根瘤菌。在另一实施方式中,固氮生物是草木樨中华根瘤菌。

[0068] 菌根真菌与维管植物的根形成共生关系,并因菌丝体相对较大的表面积提供例如对水和矿质营养的吸收能力。菌根真菌包括内生菌根真菌(也称作泡囊丛枝菌根、VAM、丛枝菌根、或AM)、外生菌根真菌或其组合。在一个实施方式中,菌根真菌是球囊菌门以及球囊霉(*Glomus*)属和巨孢囊霉(*Gigaspora*)属的内生菌根。在又一实施方式中,内生菌根是聚丛球囊霉(*Glomus aggregatum*)、*Glomus brasilianum*、明球囊霉(*Glomus clarum*)、沙漠球囊霉(*Glomus deserticola*)、幼套球囊霉(*Glomus etunicatum*)、集球囊霉(*Glomus fasciculatum*)、根内球囊霉(*Glomus intraradices*)、单孢球囊霉(*Glomus monosporum*)、或摩西球囊霉(*Glomus mosseae*)、珠状巨孢囊霉(*Gigaspora margarita*)、或其组合的菌株。

[0069] 菌根真菌的实例包括担子菌门(*Basidiomycota*)、子囊菌门(*Ascomycota*)和接合菌门(*Zygomycota*)的外生菌根。其它实例包括双色蜡蘑(*Laccaria bicolor*)、红蜡蘑(*Laccaria laccata*)、彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius*)、*Rhizopogon amylopogon*、*Rhizopogon fulvigleba*、浅黄根须腹菌(*Rhizopogon luteolus*)、*Rhizopogon villosuli*、光硬皮马勃(*Scleroderma cepa*)、黄硬皮马勃(*Scleroderma citrinum*)、或其组合的菌株。

[0070] 菌根真菌包括杜鹃花类菌根(*ecroid mycorrhizae*)、浆果莓类菌根(*arbutoid mycorrhizae*)、或水晶兰类菌根(*monotropoid mycorrhizae*)。丛枝和外生菌根与许多属于杜鹃花目的植物形成杜鹃花类菌根,而与一些杜鹃花目形成浆果莓类菌根和水晶兰类菌根。在一个实施方式中,菌根可以是优选子囊菌门的杜鹃花类菌根,例如石楠柔膜菌(*Hymenoscyphous ericae*)或树粉孢属真菌(*Oidiodendron sp.*)。在另一实施方式中,菌根还可以是优选担子菌门的浆果莓类菌根。在又一实施方式中,菌根可以是优选担子菌门的

水晶兰类菌根。在又一实施方式中,菌根可以是优选丝核菌属的兰科菌根。

[0071] 本发明的方法适用于豆科种子,其代表性实例包括大豆、苜蓿、花生、豌豆、小扁豆、菜豆和三叶草。本发明的方法也适用于非豆科种子,例如禾本科(Poaceae)、葫芦科(Cucurbitaceae)、锦葵科(Malvaceae)、菊科(Asteraceae)、藜科(Chenopodiaceae)和茄科(Solanaceae)。非豆科种子的代表性实例包括大田作物例如玉米、例如稻的谷物、大麦和小麦、棉花和油菜,以及蔬菜作物例如土豆、西红柿、黄瓜、甜菜、莴苣和哈密瓜。

[0072] 在处理之后,且出于储存目的,随后根据标准技术将种子包装在例如50-1b或100-1b袋或散装袋或容器中。将种子在领域内已知的适当储存条件下储存至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月,甚至更长,例如,13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36个月或甚至更长。本文使用的术语“月”是指30天。本文使用的年是指365天。大豆种子可能需要在下一季节中播种,而玉米种子可以储存长得多的时间,包括3年以上。

[0073] 可以以任何合适的方式施用植物信号分子,例如以种子处理组合物的形式,其包括至少一种植物信号分子和农业可接受的载体。

[0074] 可以使用任何合适的农业可接受的载体,例如固体载体、半固体载体、水性液体载体、非水性液体载体、混悬液、乳液或可乳化的浓缩物。农业可接受的载体可以包括例如佐剂、惰性组分、分散剂、表面活性剂、增粘剂、粘合剂、稳定剂和/或聚合物。

[0075] 种子处理组合物还可包括一种或多种农业/农艺学有益的试剂(除信号分子之外的),例如一种或多种固氮生物、菌根真菌、除草剂、杀真菌剂、杀虫剂和/或解磷剂。

[0076] 现在通过以下非限制性实施例的方式描述本发明。提供这些实施例仅用于示例说明的目的,而不意在以任何方式限制本发明。

[0077] 工作例的概述

[0078] 实施例1和2描述了使用大豆种子进行的比较田间实验,证实本发明实现了增加的植物产量。根据本发明在播种前5个月用市售产品 **Optimize®** (其是大豆慢生根瘤菌菌剂和LC0-V(C18:1,MeFuc)(示于图2中)的组合)和用单独的纯LC0处理种子,以及在播种前4.5个月用非市售级(即,较不纯)的**Optimize®**和单独的LC0处理种子,以及出于比较的目的在播种时用这些相同的植物信号分子处理种子。使用未经处理的种子作为另一对照。以按照蒲式耳/英亩的单位测量的粮食产量差异表示的结果显示出,本发明的方法相对于非发明方法(即在播种时处理的种子和未经处理的种子)实现了大豆产量的增加。

[0079] 实施例3和4描述了在温室中进行的比较实验,其证实本发明实现了其它植物生长特性的提高。实施例3描述了涉及在播种前一个月和一年用纯LC0-V(C18:1,MeFuc)处理大豆种子的实验。在播种后十天收获大豆植物(包括根)。以根长度和体积的差异描述的结果显示出,本发明的方法实现了这些特性的显著提高。最后,实施例4描述了以在播种前55天用**Optimize®**处理的大豆种子、以及出于比较的目的在播种前7天处理的大豆种子和未经处理的大豆种子进行的实验。以第一片三叶的平均表面积为单位表示的结果显示出,本发明在这方面也增强了植物生长。

[0080] 实施例1

[0081] 进行田间试验以评价本发明实施方式在施用于大豆种子时的粮食产量。田间试验

点位于Whitewater,WI附近,特征为Milford粉粘壤土。在播种前六个月进行的土壤测试显示,土壤pH为6.8,有机物质含量为5.3%,并且磷和钾的含量分别为39ppm和139ppm。

[0082] 该试验中使用的植物信号分子是 **Optimize®**、非市售级的 **Optimize®** (NI-50S-1)、纯LC0-V(C18:1,MeFuc)(NI-50GREN-1)和非市售级的LC0-V(C18:1,MeFuc)(NI-50S-2CF)。该研究中使用的大豆种子是Stine S2118。将植物信号分子经或不经稀释以4.8fl oz/cwt的量喷洒到种子上。

[0083] 以随机完全区组设计来进行该研究,试验田块尺寸为10英尺×50英尺(0.011英亩),7.5英寸的行距。重复进行4次。在播种前4.5或5个月以及在临播种前用植物信号分子处理种子,并使用John Deere750NT谷物条播机将其播种到1英寸的深度,播种量为225,000粒种子/英亩。杀虫剂**Extreme®**和**AMPS®**均在播种前11天(出苗前)分别以3.0pt和2.5lb的量施用。**Assure II®**、**Roundup WeatherMax®**和**AMPS®**均在播种后46天(出苗后)分别以6.0oz、21oz和2.5lb的量施用。在播种后4个月20天收获植物。

[0084] 用与实验信号分子组合物(信号分子+载体)的量(wt)相应的水量(wt)来处理对照种子。对照种子在播种前在与实验种子相同的条件下储存,并与实验种子在相同时间播种到相同的土壤中。

[0085] 研究结果显示在以下表1中。

[0086] 表1

[0087]

	处理组	粮食产量@13%
1	对照-未接种	62.5
2	Optimize-播种时	64.2
3	Optimize-5个月	65.7
4	NI-50GREN-1-播种时	62.2
5	NI-50GREN-1-5个月	70.5
6	NI-50S-1-4.5个月	67.2
7	NI-50S-2CF-4.5个月	69.6

[0088] 如比较(非发明)组2和发明组3之间的比较所反映出的,用市售级**Optimize®**在播种前5个月处理大豆种子引起大豆产量有1.5蒲式耳大豆的增加。如组4与发明组5之间的比较所反映出的,仅用纯LC0-V(C18:1,MeFuc)在播种前5个月处理大豆种子引起8.3蒲式耳/英亩的大豆产量增加。如组2与发明组6之间的比较所反映出的,用非市售级**Optimize®**在播种前4.5个月处理大豆种子引起3.0蒲式耳/英亩的大豆产量增加。最后,如组4与发明组7之间的比较所示的,仅用非市售级LC0-V(C18:1,MeFuc)在播种前4.5个月处理大豆种子使大豆产量增加7.4蒲式耳/英亩。在13%的种子湿度水平进行粮食产量测量。

[0089] 实施例2

[0090] 进行大豆试验以评价本发明实施方式在施用于大豆种子时的粮食产量。田间试验点位于Whitewater,WI附近,特征为Milford粉粘壤土。在播种前六个月进行的土壤测试显

示,土壤pH为6.6,有机物质含量为4.8%,并且磷和钾的含量分别为41ppm和131ppm。

[0091] 该试验中使用的植物信号分子与实施例1中相同。该研究中使用的大豆种子是Stine S2118。将植物信号分子经或不经稀释以4.8fl oz/cwt的量喷洒到种子上。

[0092] 以随机完全区组设计来进行该研究,试验田块尺寸为10英尺×50英尺(0.011英亩),7.5英寸的行距。重复进行4次。在播种前4.5或5个月以及在临播种前用植物信号分子处理种子,并使用John Deere750NT谷物条播机将其播种到1英寸的深度,播种量为225,000粒种子/英亩。杀虫剂**Extreme®**和**AMPS®**均在播种前10天(出苗前)分别以3.0pt和2.5lb的量施用。**Assure II®**、**Roundup WeatherMax®**和**AMPS®**均在播种后45天(出苗后)分别以6.0oz、21oz和2.5lb的量施用。在播种后4个月21天收获植物。

[0093] 用与实验信号分子组合物(信号分子+载体)的量(wt)相应的水量(wt)来处理对照种子。对照种子在播种前在与实验种子相同的条件下储存,并与实验种子在相同时间播种到相同的土壤中。

[0094] 研究结果显示在下表2中。

[0095] 表2

[0096]

	处理组	粮食产量@13%
1	对照-未接种	62.4
2	Optimize-播种时	64.1
3	Optimize-5个月	68.6
4	NI-50GREN-1-播种时	65.8
5	NI-50GREN-1-5个月	64.0
6	NI-50S-1-4.5个月	69.4
7	NI-50S-2CF-4.5个月	66.6

[0097] 如比较(非发明)组2与发明组3之间的比较所反映出的,用市售级**Optimize®**在播种前5个月处理大豆种子引起大豆产量有4.5蒲式耳大豆的增加。如组2与发明组6之间的比较所反映出的,用非市售级**Optimize®**在播种前4.5个月处理大豆种子引起5.3蒲式耳/英亩的大豆产量增加。如组4与发明组7之间的比较所示的,仅用非市售级LC0-V(C18:1, MeFuc)在播种前4.5个月处理大豆种子使大豆产量增加0.8蒲式耳/英亩。仅有的由非发明组4与发明组5之间的比较所反映出的阴性响应显示出,仅用纯LC0在播种前5个月处理大豆种子引起1.8蒲式耳/英亩的下降,该结果归因于与田间试验相关的无法解释的可变性。在13%的种子湿度水平进行粮食产量测量。

[0098] 温室实验

[0099] 实施例3

[0100] 将大豆种子用 10^{-7} M纯LC0-V(C18:1, MeFuc)处理并在15℃储存。将经处理的种子和未经处理的种子(对照)在处理1个月和12个月播种到含有沙:珍珠岩(1:1混合物)的温室盆栽中。在种子播种之后,幼苗生长10天,然后收获幼苗,对其根进行清洁并在**Winrhizo®**扫描仪上进行测量。用与实验信号分子组合物(信号分子+载体)的量(wt)相应的水量(wt)来处理对照种子。对照种子在播种前在与实验种子相同的条件下储存,并与实验种子在相

同时间播种到相同的土壤中。结果显示在表3中。

[0101] 表3

[0102]

处理	处理后 1 个月		处理后 1 年	
	根长度 (cm)	根体积 (cm ³)	根长度 (cm)	根 体 积 (cm ³)
对照	128	0.455	115.5	0.403
LCO	135*	0.468	159.3*	0.540*
%增加	5.46	2.86	37.92	34

[0103] 两个发明实施方式(用LCO在播种前1个月和12个月处理的种子)获得的结果,特别是在1年的预处理之后获得的结果是显著的(考虑到本领域已知大豆种子倾向于在这么长的时间内劣化)。

[0104] 实施例4

[0105] 用 Optimize®处理的大豆种子在15℃保持于冰箱中。将种子在处理7天(7dpp)和55天(55dpp)播种到含有泥炭:珍珠岩混合物的根箱中。在19天之后取其第一片三叶的叶表面积(cm²)。如图3图示和表4所示,由根据本发明处理的种子所产生的叶子相比于非发明实施方式具有50%更高的叶表面积平均增加(42%对28%)。

[0106] 表4

[0107]

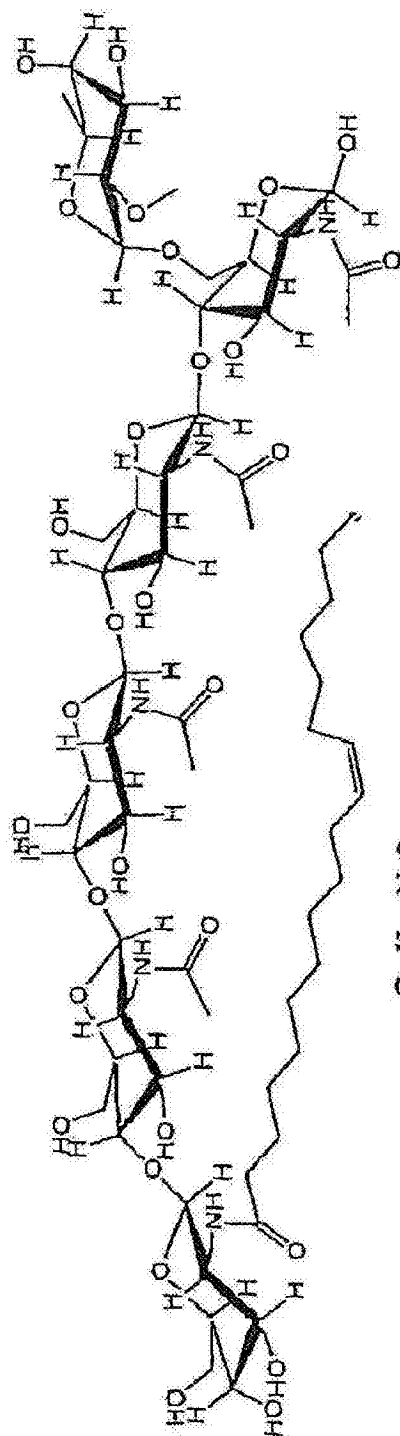
	平均值	STDEV	响应	响应%
UTC平均值	146.25	18.7539		
7dpp平均值	187.05	29.8215	40.81	28%
55dpp平均值	207.18	20.5278	60.93	42%

[0108] 因为已知种子上的细菌(大豆慢生根瘤菌)计数随时间下降,因此由在播种前55天处理的种子所产生的植物中所示的平均表面积的增加可能归因于根瘤菌LCO。

[0109] 在本说明书中引用的所有专利和非专利公开物均显示为本发明所属领域的技术人员的技术水平。所有这些公开物通过引用的方式合并入本文,其程度等同于各个单独公开物或专利申请均具体而独立地表明通过引用方式并入。

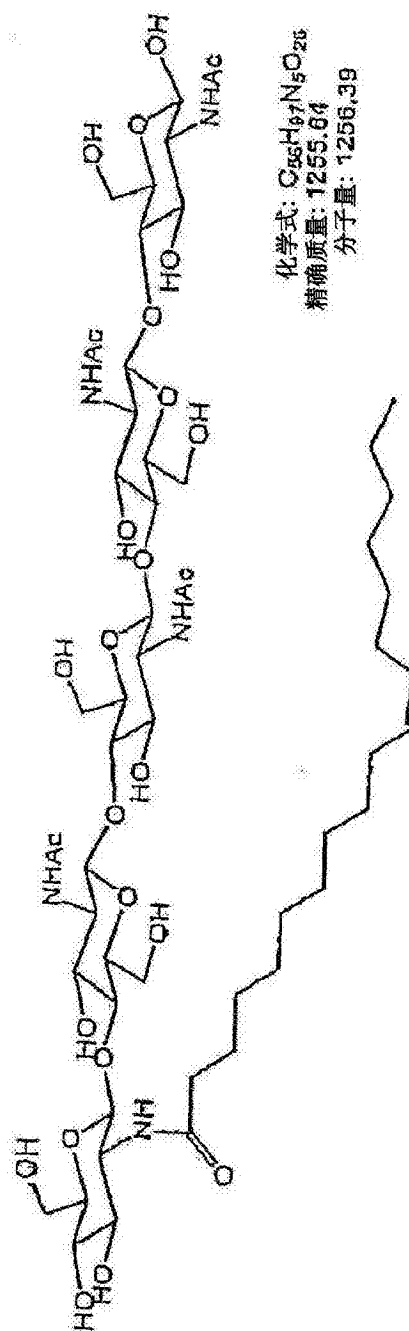
[0110] 尽管在此已参照具体实施方式描述了本发明,但应当理解,这些实施方式仅仅用来示例说明本发明的原理和应用。因此,应当理解的是,可以在不背离由所附权利要求限定的本发明的精神和范围的情况下对示例性的实施方式做出多种修改并可以提出其他布置。

LCO-V(C18:1, MeFuc)



$C_{63}H_{109}N_5O_{30}$
 精确质量: 1415.72
 Mol. Wt.: 1416.56
 C, 53.42; H, 7.76; N, 4.94; O, 33.88

图1



化学式: $C_{63}H_{109}N_5O_{30}$
 精确质量: 1415.72
 分子量: 1416.56

图2

未经处理的和经Optimize预处理的19天大的大豆上的第一片三叶的面积均值

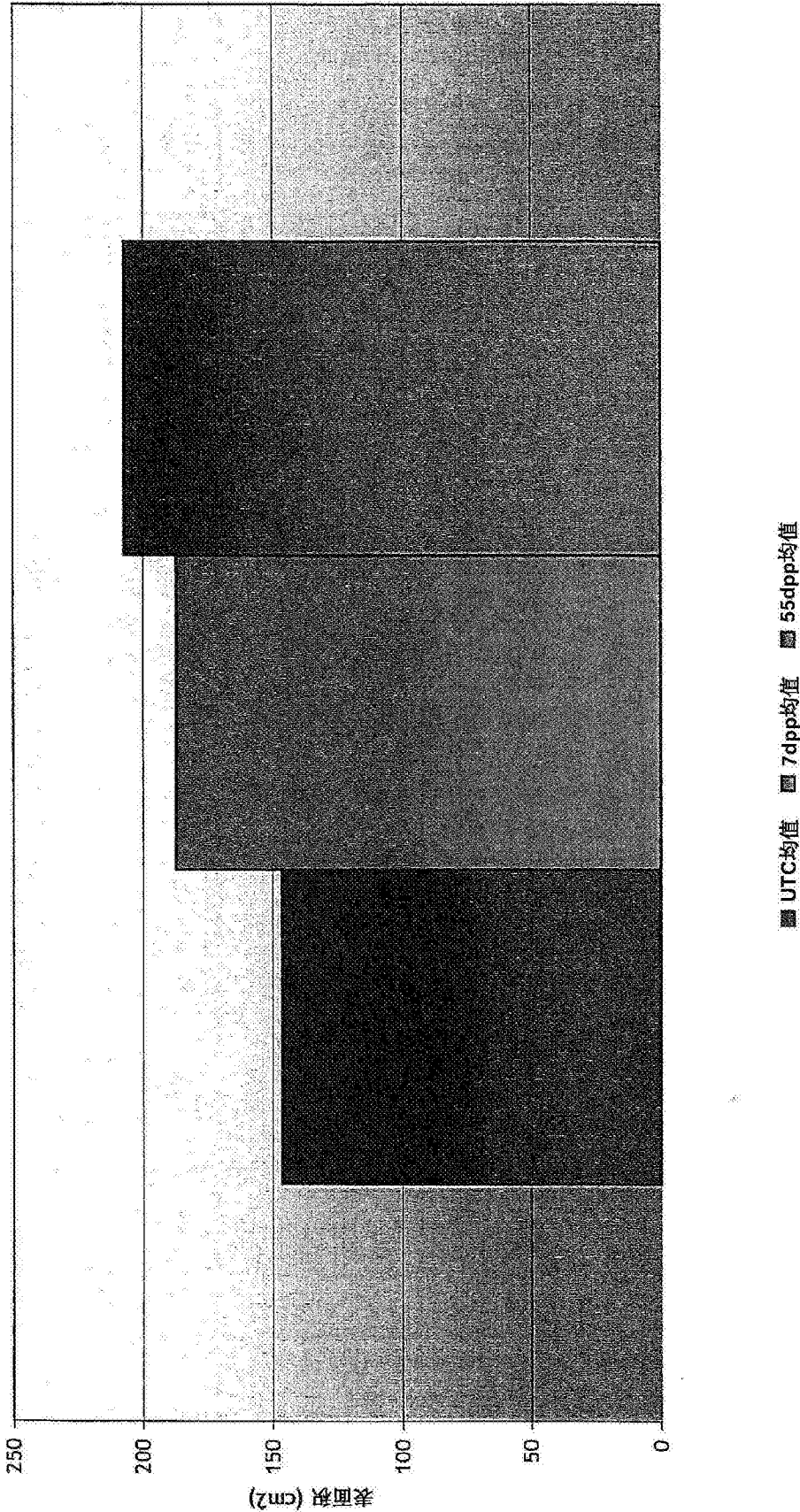


图3