



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105188351 B

(45)授权公告日 2019.01.15

(21)申请号 201480008972.3
 (22)申请日 2014.01.14
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 105188351 A
 (43)申请公布日 2015.12.23
 (30)优先权数据
 61/753,000 2013.01.16 US
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2015.08.14
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/IL2014/050047 2014.01.14
 (87)PCT国际申请的公布数据
 W02014/111932 EN 2014.07.24
 (73)专利权人 以色列农业和农村发展部,农业
 研究组织(ARO)(农业研究中心)
 地址 以色列贝特达冈
 (72)发明人 艾伦·R·格拉贝尔
 伊戈尔·埃拉德 (续)
 (74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
 公司 11227
 代理人 郑斌 彭鲲鹏
 (51)Int.Cl.
 A01N 61/00(2006.01) (续)
 (56)对比文件
 WO 01/07380 A1,2001.02.01,
 CN 102823918 A,2012.12.19,
 CN 101668417 A,2010.03.10,
 MURUGARAGAVAN R等.Characterization of
 distillery spentwash for its valuable
 nutrient substitute to dryland

agriculture.《JOURNAL OF ECOBIOLOGY,
 PALANI PARAMOUNT PUBL》.2009,第24卷(第2
 期),169-174.
 DOLORES RIVERO等.Inhibition of
 Induced DNA Oxidative Damage by Beers:
 Correlation with the Content of
 Polyphenols and Melanoidins.《J. Agric.
 Food Chem.》.2005,第53卷3637-3642.
 M.L. STECCHINI等.Effect of Maillard
 reaction products on the growth of
 selected food-poisoning micro-organisms.
 《Letters in Applied Microbiology》.1991,第
 13卷93-96.
 Hela Mahmoudi等.Varied tolerance to
 NaCl salinity is related to biochemical
 changes in two contrasting lettuce
 genotypes.《Acta Physiol Plant》.2011,第33
 卷(第5期),1613-1622.
 Jun-Hye Shin等.Rice aldehyde
 dehydrogenase7 is needed for seed
 maturation and viability.《Plant
 Physiology》.2009,第149卷905-915.
 崔畅等.蛋白黑素的研究进展.《食品科学》
 .2007,第28卷(第8期),517-520.
 Helen M. Woffenden等.Relationships
 between Antioxidant Activity, Color, and
 Flavor Compounds of Crystal Malt
 Extracts.《J. Agric. Food Chem》.2001,第49
 卷5524-5530. (续)

审查员 冀敏

权利要求书1页 说明书16页 附图15页

(54)发明名称
 类黑精及其用于改善植物特性的用途
 (57)摘要
 本发明涉及类黑精及其用于改善植物特性

的用途。本发明的方法和组合物特别地可用于防治植物真菌病害和干旱条件,以及促进植物生长。

CN 105188351 B

[接上页]

(72)发明人 达利亚·拉夫大卫
谢尔盖·塞加尔

(51)Int.Cl.

A01P 1/00(2006.01)

A01P 3/00(2006.01)

A01P 21/00(2006.01)

A01H 3/04(2006.01)

(56)对比文件

JOHN R.L. WALKER等.Diphenol Oxidases
Enzyme catalysed Browning and Plant
Disease Resistance.《Biotechnology and
Genetic Engineering Reviews》.1998,第15卷
(第1期),457-498.

Khripovich, A. A.等.Effect of copper
chloride on the Maillard reaction in
acidic medium.《Vestsi Natsyyanal'nai
Akademii Navuk Belarusi, Seryya
Khimichnykh Navuk》.2001,第2卷82-85.

KHRIPOVICH A.A.等.Chemical
composition of Aminogumat, a plant growth
regulator.《KHIMIYA TVERDOGO TOPLIVA》
.2003,第5卷3-8.

KHRIPOVICH A.A.等.Chemical
composition of Aminogumat, a plant growth
regulator.《KHIMIYA TVERDOGO TOPLIVA》
.2003,第5卷3-8.

1. 用于改善植物对真菌病原体的抗性、耐旱性或生长的方法,其包括以下步骤:
 - a. 在约150°C的温度下将蛋白质水解产物与一种或更多种还原糖1:1重量比的均匀粉末根据反应温度加热一段时间,以获得包含类黑精的褐色组合物,所述还原糖选自葡萄糖和木糖;以及
 - b. 以 10^{-5} 至 10^{-3} w/v的类黑精浓度向所述植物或其一部分施用所述组合物,其中所述真菌病原体为白粉病病原体或灰霉病病原体。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述类黑精通过喷洒、灌注、灌溉和滴灌施肥来施用。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述植物属于茄科或葫芦科。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述真菌病原体选自新番茄粉孢菌(*Oidium neolycopersici*)、单囊壳白粉菌(*Podosphaera xanthii*)和灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中施用多于一次所述类黑精。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中在不同日施用至少两次所述类黑精。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中将所述类黑精在植物生命周期的任意阶段施用至任意植物器官。
8. 通过以下方法获得的包含浓度为 10^{-5} 至 10^{-3} w/v类黑精的组合物,其用于改善植物对真菌病原体的抗性、耐旱性或生长:在约150°C的温度下将蛋白质水解产物与一种或更多种还原糖1:1重量比的均匀粉末加热直到获得褐色组合物,并且溶解于水中,所述还原糖选自葡萄糖和木糖。
9. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述组合物适于通过喷洒、通过灌注、通过灌溉和通过滴灌施肥来施用。
10. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述植物属于茄科或葫芦科。
11. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述真菌病原体为白粉病病原体或灰霉病病原体。
12. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述真菌病原体选自新番茄粉孢菌、单囊壳白粉菌和灰葡萄孢菌。

类黑精及其用于改善植物特性的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及类黑精及其用于改善植物特性的用途。具体地,本发明涉及用于防治植物真菌病害(fungal plant disease)、诱导植物对干旱条件的耐受性和促进植物生长的方法和包含类黑精的组合物。

背景技术

[0002] 类黑精是美拉德反应(Maillard reaction)或“非酶褐变反应”的聚合的有色最终产物,所述反应由将还原糖或碳水化合物与胺、氨基酸或蛋白质一起加热期间发生的一系列复杂反应组成。类黑精是造成焙烤食品、烘焙食品、烘烤食品、烤制食品、烧烤食品或褐变食品的褐色的化合物,并且在许多膳食液体(如酱油、蜂蜜、酒、啤酒和咖啡)中也很常见。类黑精是通过在美拉德反应过程中发生的环化、脱水、逆醇醛缩合反应(retroaldolisation)、重排、异构化和缩合而形成的[Wang,H-Y,Qian,H,Yao,W-R.Food Chemistry,2011,128:573-584]。

[0003] 类黑精的结构没有很好地确定,原因是不能单独地表征这些不均匀的大分子化合物。对于其结构提出了三种主要方案:(i)由通过缩聚反应连接的呋喃和/或吡咯的重复单元组成的聚合物;(ii)低分子量(LMW)有色物质通过 ϵ -氨基与蛋白质交联,产生高分子量(HMW)的有色类黑精;以及(iii)在美拉德反应早期形成的糖降解产物构成的骨架,其通过羟醛型缩合聚合并通过氨基化合物连接[Wang,H-Y,Qian,H,Yao,W-R.Food Chemistry,2011,128:573-584]。

[0004] 因为在许多食物中是几乎普遍存在的,所以对探究类黑精的膳食功能产生了兴趣。已发现其具有许多体外和体内的功能特性,包括:(i)自由基清除和抗氧化活性;(ii)抗微生物活性;(iii)金属螯合能力;(iv)抗微生物粘附和抗生物膜形成作用;(v)脂质过氧化抑制;以及(vi)对各种酶之活性的抑制或促进作用。

[0005] 除了在食物中普遍存在之外,早就认为类黑精存在于腐殖质(其为构成土壤中大部分天然有机物的褐色大分子材料)的基本成分之中。水溶性腐殖质(腐殖酸和灰黄霉酸)也是水性环境和大气气溶胶中有机物的重要部分。与腐殖酸和灰黄霉酸类似,类黑精在较宽的pH值范围中在水性溶液中表现出部分阴离子特征。可使用透析、超滤或凝胶渗透技术将其分离成粒度级分(size fraction),具有任意操作的截断分子量10000道尔顿或12400道尔顿,用于区别高分子量(HMW)类黑精和低分子量(LMW)类黑精。在高pH值下,HMW类黑精的溶解度增加。在非常低的pH值下,更深褐色的HMW类黑精沉淀,而浅稻草色的LMW类黑精保留在溶液中。HMW类黑精还可通过多价无机阳离子絮凝。与腐殖质相比,由于类黑精由氨基酸衍生,因此其具有大得多的水溶性并且具有大得多的N含量。

[0006] 早就已经报道了腐殖质对植物营养、种子萌发、发根(root initiation)和总植物生物量具有积极作用。例如,发现腐殖质螯合重要植物微量营养物(Fe和Zn)和增加其在营养液中的溶解度的能力,以使瓜类、大豆和黑麦草的生长增强。还发现腐殖酸对涉及在非缺铁型黄瓜植株中铁同化之主要分子物质的转录调节具有瞬时作用。发现腐殖酸特别是低分

子量腐殖酸显然通过促进参与硝酸盐支持系统之蛋白质分子的表达来提高小麦植株中硝酸盐摄入的速率。在黄瓜中,腐殖酸施用与增强的根部H⁺-ATPase活性、增加的硝酸盐地上部(shoot)浓度和降低的根部硝酸盐浓度有关,这些作用伴随有多种细胞分裂素和多胺的相伴增加和减少。报道称,腐殖酸诱导烟草BY-2悬浮细胞培养物中P饥饿的部分减轻,从而提高细胞磷酸总量、ATP和葡萄糖-6-磷酸水平以及分泌型酸性磷酸酶的活性。还观察到腐殖酸在玉米中影响根质膜H⁺-ATPase活性和表达,导致根生长促进和质子泵活化,这可能是由于从所述腐殖酸释放的生长素样植物生长启动子。腐殖质的生长素样活性的另一些证据是拟南芥(*Arabidopsis*)中生长素合成报道基因(DR5::GUS)的活化和早期生长素应答基因IAA19的后续增强的转录,从而引起侧根形成。

[0007] 关于类黑精对植物的生长或功能的作用没有可用的信息。

[0008] 白粉病(Powdery mildew)和灰霉病(Gray mold)是植物中真菌促进病害的两个实例。所述病害是普遍的并且可容易识别,对多种植物、树木和农作物造成了严重损害。

[0009] 白粉病由植物病原体(例如,新番茄粉孢菌(*Oidium neolycopersici*),一种专性寄生物,即,寄生物攻击活的宿主组织并且仅可在活的宿主组织上存活)造成。在相当高的湿度条件下有利于萌发和感染。真菌在仅仅几天中非常快速地传播。分生孢子通过风和雨短距离传播。白粉病真菌在植物组织的表面上生长。其用从宿主叶收集营养物和能量的特化细胞(称为吸器)穿入叶表面。在初始感染后仅仅60小时内就在叶表面上产生了分生孢子,并且其通过空气流被携带到另一片叶,从而其可通过萌发直接感染。

[0010] 灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)为另一类造成广泛植物病害的真菌病原体,其损害包括重要农作物(如番茄和黄瓜)在内的植物。灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)是灰霉病的病因。在相当高的湿度和相对凉的条件有利于灰葡萄孢菌的萌发和感染。在这些条件下,萌发和感染可在几小时之内发生。

[0011] 一般来说,当病害严重时,由于其可能在番茄、黄瓜或另一些作物上,所以可使用杀真菌喷雾来保护附近的健康植物。

[0012] 通常,避免高湿度条件是目前可用于降低病害传播可能性的最有效方式。然而,没有有效的解决方案用于一旦确定病害后防治患病植物的病害。

[0013] 干旱是植物在生长时面临的胁迫之一。干旱可能是由水的可得性有限或由于植物水分关系被扰乱且水使用效率降低而使植物无法吸收水并将水转移到株冠导致。其也可能是由高温或高蒸汽压亏缺导致的。形态学上,植物对干旱条件的反应包括生长减慢,例如,如在植物高度、叶大小和茎宽方面所观察到的。在严重干旱的条件下,植物将枯萎。在严重枯萎的情况下,再次灌溉植物后,叶也不能从胁迫中恢复,并因此枯萎导致了叶和其他植物器官的死亡。

[0014] 现在出乎意料地发现,从美拉德反应中获得的类黑精是可以大幅度改善植物特性的活性剂。

[0015] 因此,本发明的一个目的是提供类黑精和包含其的组合物,其可用于促进植物健康。

[0016] 本发明的另一个目的是提供类黑精和包含其的组合物,其用于防治植物病害。

[0017] 本发明的又一个目的是提供类黑精和包含其的组合物,其用于在干旱条件下保护植物。

[0018] 本发明的再一个目的是提供类黑精和包含其的组合物,其用于促进植物生长。

发明内容

[0019] 根据第一个方面,本发明涉及包含类黑精之用于改善植物特性的组合物,其中所述类黑精是美拉德反应的产物。所述类黑精由一种或更多种氨基酸和/或蛋白质与一种或更多种还原糖或含有还原糖之碳水化合物的任意组合制备。

[0020] 根据一个具体实施方案,本发明提供了用于改善植物对植物真菌病原体之抗性的组合物。根据另一个具体实施方案,本发明提供了用于改善植物之耐旱性的组合物。根据又一个具体实施方案,本发明提供了用于改善植物生长的组合物。

[0021] 在本发明的一些实施方案中,类黑精以 $10^{-5}\%$ w/v至 5% w/v的浓度范围存在。在本发明的另一些实施方案中,类黑精以 0.001% w/v至 0.1% w/v的浓度范围存在。

[0022] 应注意,本发明的组合物适合于通过喷洒(spray)、灌注(drench)、灌溉(irrigation)或滴灌施肥(fertigation)来施用。

[0023] 根据本发明的待处理植物属于茄科(Solanaceae family)或葫芦科(Cucurbitaceae family)。根据一个具体实施方案,根据本发明防治的病原体是白粉病病原体或灰霉病病原体。根据另一个具体实施方案,真菌病原体选自新番茄粉孢菌、单囊壳白粉菌(*Podosphaera xanthii*)和灰葡萄孢菌。

[0024] 根据第二个方面,本发明涉及用于改善植物特性的方法,其包括向植物或其一部分施用有效量的包含类黑精的组合物,其中所述类黑精是美拉德反应的产物。

[0025] 根据一个具体实施方案,本发明提供了用于改善植物对由真菌病原体导致的植物病害的抗性的方法。根据另一个具体实施方案,本发明提供了用于改善植物的耐旱性的方法。根据又一个具体实施方案,本发明提供了用于改善植物生长的方法。

[0026] 在本发明方法的一个实施方案中,向植物施用类黑精一次。在本发明方法的一个不同的实施方案中,在不同日施用至少两次类黑精。在本发明方法的另一个实施方案中,类黑精与灌溉用水或滴灌施肥用水一起施用。

[0027] 应注意,将根据本发明的类黑精在植物生命周期的任意阶段施用至任意植物器官。

[0028] 通过以下的本发明实施方案的说明性和非限制性描述,参照附图,将进一步理解本发明的所有上述和其他特征以及优点。在附图中,有时使用相同的标记来指示不同附图中的相同要素。

附图说明

[0029] 图1A至1B示出了在感染后11天,通过灌注(图1A)或喷洒(图1B)施用的 0.1% 不同类黑精(M1至M9)对番茄中灰霉病(灰葡萄孢菌)严重程度的作用。病害严重程度表示为11天进程中的病害进展曲线下面积(AUDPC)。条代表标准误差。

[0030] 缩写:C(对照)。

[0031] 图2A至2B示出了不同类黑精(3批M1和3批M3)对番茄中白粉病(新番茄粉孢菌)严重程度的作用。条代表标准误差。

[0032] 图2A证明了在感染后不同天数类黑精的作用。病害严重程度表示为感染面积

的%。

[0033] 图2B证明了在感染后19天进程中类黑精的作用。病害严重程度由病害进展曲线下面积(AUDPC)表示。条代表标准误差。

[0034] 图3A至3D示出了不同类黑精对番茄植株中白粉病(新番茄粉孢菌(*O. neolycopersici*))严重程度的作用。

[0035] 图3A证明了在感染后不同天数通过喷洒进行类黑精施用的作用。病害严重程度表示为感染面积的%。条代表标准误差。

[0036] 图3B证明了在感染后23天进程中通过喷洒进行类黑精施用的作用。病害严重程度表示为病害进展曲线下面积(AUDPC)。条代表标准误差。

[0037] 图3C证明了在感染后不同天数通过灌注进行类黑精施用的作用。病害严重程度表示为感染面积的%。条代表标准误差。

[0038] 图3D证明了在感染后23天的进程中通过灌注进行类黑精施用的作用。病害严重程度表示为感染面积的%和病害进展曲线下面积(AUDPC)。条代表标准误差。

[0039] 图4A至4B示出了不同类黑精的溶液喷洒对番茄中白粉病(新番茄粉孢菌)严重程度的作用。

[0040] 图4A证明了在感染后不同天数类黑精的作用。病害严重程度表示为感染面积的%。条代表标准误差。

[0041] 图4B证明了在感染后23天进程中类黑精的作用。病害严重程度表示为感染面积的%和病害进展曲线下面积(AUDPC)。条代表标准误差。

[0042] 图5示出了不同类黑精的溶液对处理后42天已确认的白粉病(新番茄粉孢菌)严重程度的作用。病害严重程度表示为感染面积的%。条代表标准误差。

[0043] 图6示出了超滤类黑精(M1.3)得到的类黑精高分子量(HMW)级分和未分级的类黑精对番茄中灰霉病(灰葡萄孢菌)严重程度的作用。HMW级分或未分级溶液的施用通过灌注和喷洒来进行。病害严重程度在感染后7天以感染面积的%评估。条代表标准误差。

[0044] 图7A至7C示出了不同类黑精溶液的灌注和喷洒对黄瓜中白粉病(单囊壳白粉菌)严重程度的作用。病害严重程度表示为感染后12天(A)和感染后23天(B)感染面积的%,以及23天进程中(C)的病害进展曲线下面积(AUPDC)。条代表标准误差。

[0045] 图8A至8C示出了通过灌注施用0.03%的超滤类黑精得到的类黑精高分子量(HMW)级分(标注为“分级的”)和未分级(标注为“原始的”)类黑精对黄瓜白粉病(单囊壳白粉菌(*P. xanthii*))严重程度的作用。

[0046] 图8A证明了感染后不同天数类黑精的作用。病害严重程度表示为感染面积的%。条代表标准误差。

[0047] 图8B证明了感染后23天类黑精的作用。病害严重程度表示为感染面积的%。条代表标准误差。

[0048] 图8C证明了感染后36天进程中类黑精的作用。病害严重程度表示为感染面积的%和病害进展曲线下面积(AUDPC)。条代表标准误差。

[0049] 图9示出了在最后一次灌溉后3周类黑精溶液的灌注对植物重量的作用。植物重量表示为原始重量(第0天)的百分比。条代表标准误差。

[0050] 图10示出了在最后一次灌溉后3周类黑精溶液喷洒对植物重量的作用。植物重量

表示为原始重量(第0天)的百分比。条代表标准误差。

[0051] 图11示出了在最后一次灌溉后2周类黑精溶液灌注和喷洒对叶长度的作用。叶长度表示为原始重量(第0天)的百分比。条代表标准误差。

[0052] 图12示出了在3周不灌溉之后进行灌溉后4小时类黑精溶液灌注和喷洒对枯萎严重程度程度的作用。枯萎表示为百分比。条代表标准误差。

[0053] 图13示出了在3周不灌溉之后进行灌溉后4小时类黑精溶液灌注和喷洒对每株植物活的叶数目的作用。枯萎表示为百分比。条代表标准误差。

[0054] 图14A至14C示出了在移植后48天中滴灌施肥溶液中施用的类黑精对番茄植株生长的作用。条代表标准误差。

[0055] 图14A:归一化的植物高度

[0056] 图14B:茎节(stem joint)数目

[0057] 图14C:叶长度

[0058] 图15示出了滴灌施肥溶液中施用的类黑精随时间对每株植物之番茄花数目的作用。条代表标准误差。

[0059] 图16A至16B示出了移植后4周(图16A)和移植后8周(图16B),滴灌施肥溶液中施用的类黑精对脱落(detach)的番茄叶上的灰葡萄孢菌严重程度程度的作用,以病害进展曲线下面积(AUDPC)的形式。条代表标准误差。

[0060] 图17示出了不同类黑精制剂的UV-Vis扫描。测量在ThermoScientific的UV-Vis分光光度计(Genesys 10UV)上于190至700nm之间进行。

[0061] 图18A至18D示出了不同类黑精制剂的荧光激发发射光谱。

[0062] 图18A:M1的荧光激发发射光谱。

[0063] 图18B:M3的荧光激发发射光谱。

[0064] 图18C:M7的荧光激发发射光谱。

[0065] 图18D:M9的荧光激发发射光谱。

[0066] 图19示出了作为浓度函数的M1水性溶液的表面张力(mN/m)。

[0067] 图20示出了多种类黑精制剂(M1、M3、M7和M9)的FTIR透射光谱。

[0068] 发明详述

[0069] 所公开的本发明提供了可用于改善植物特性的方法和组合物。所述方法和组合物具体地可用于预防和防治由真菌病原体(例如,叶真菌病原体)导致的植物病害,用于保护植物免于干旱条件,以及用于促进和改善植物生长。所述组合物包含类黑精,并且可通过喷洒、灌注、灌溉、滴灌施肥或任何其他施用方式来施用。

[0070] 术语“植物的特性”或“植物特性”涉及植物的生长、发育和/或强健。生长是指尺寸增长,发育是指经历发育阶段(例如,萌发、出芽、开花等)的过程,并且强健是指植物抵抗非生物胁迫和生物胁迫之一或二者的能力。非生物胁迫包括例如但不限于温度和干旱的环境条件。生物胁迫包括害虫(例如,昆虫、蠕虫或寄生植物等)和病原体(例如,真菌、细菌、病毒等)。

[0071] 术语“改善植物特性”涉及植物的任何特征提高到更期望和/或更有价值的状态,例如,改善的生长和发育、增强的对病原体的抗性、对非生物胁迫(如干旱和温度)更好的耐受性。

[0072] 术语“植物病害”是指由非生物胁迫和生物胁迫二者造成的病害。

[0073] 术语“防治植物病害”涉及降低宿主植物中的病害严重程度、发病率或症状。该术语还涵盖抑制病害的病因,如真菌病原体。

[0074] 术语“干旱条件”涉及在叶尺寸、茎延伸和根增殖方面降低植物生长,扰乱植物水分关系并降低水使用效率的干旱胁迫。当植物的水分损失超过该植物的根部吸收水的能力时,并且当植物的水分含量减少到足以干扰正常的植物过程时,就造成干旱胁迫。因此,术语“保护植物免于干旱条件”或者“诱导植物耐旱性”涉及降低植物对水供应不足和由水分损失增加造成之胁迫的反应。

[0075] 将植物生长定义为植物的叶和茎的数目和尺寸增加的过程。术语“促进植物生长”涉及刺激植物(总体上)或其任何器官(包括叶、茎、根、花和果实)的发育增加。

[0076] 应注意,在本说明书和所附权利要求中,单数形式的“类黑精”也包括两种或更多种类黑精的任意组合。

[0077] 类黑精是美拉德反应或“非酶褐变反应”的聚合且有色的最终产物,所述反应是将还原糖或碳水化合物与胺、氨基酸或蛋白质一起加热期间发生的一系列复杂反应。通常,类黑精是通过在美拉德反应进程中发生的环化、脱水、逆醇醛缩合反应、重排、异构化和缩合而形成的。

[0078] 虽然类黑精由几百种或更多种不同的化合物构成,其在制剂与制剂之间可不同,但是不同的制剂具有彼此非常类似的化学和物理特性,如下文中实施例15至19中详细描述。

[0079] 类黑精可通过本领域已知的多种不同方法来制备。制备类黑精的一种方法包括以下步骤:

[0080] (a) 提供固体形式的氨基酸混合物;

[0081] (b) 提供固体形式的还原糖;

[0082] (c) 以1:1的摩尔比组合所述混合物和糖;

[0083] (d) 研磨所述混合物和糖,以形成均匀粉末;以及

[0084] (e) 在50°C至300°C的温度下将步骤(d)中获得的粉末根据反应温度加热几周至几秒不等的时间,低温需要较长的时间,反之亦然。

[0085] 用于制备类黑精的另一些方法包括将以上步骤(a)和(b)的原料溶解于合适的溶剂(例如,水、醇、丙酮或其他极性溶剂)中,然后加热。

[0086] 类黑精还可通过在合适溶剂中萃取而从含类黑精的物质中分离,合适的溶剂如水(进行或不进行pH调节)、醇、丙酮和其他极性溶剂,包括溶剂混合物。

[0087] 在一个方面中,本发明提供了可通过上述第一种方法获得的类黑精,如标记为“M1”至“M9”的类黑精,或其任意组合。

[0088] 根据一个具体实施方案,将类黑精以水性溶液提供给植物。所述溶液可包含任何额外的可接受物质,包括但不限于肥料,以及抗害虫剂、抗真菌剂和抗微生物剂。

[0089] 根据本发明,溶液形式的多种类黑精可以通过灌注和/或喷洒和/或与肥料配制在一起或任何其他方式来施用,以防治植物的真菌病害和/或保护植物免于干旱条件和/或改善并加速植物生长。

[0090] 值得注意的是,可使用非常少量的类黑精以诱导其对经处理植物的有益作用。

[0091] 根据本发明发现,在植物上喷洒溶液M1至M3和M6至M8对防治灰霉病是有效的。与其他溶液相比,溶液M1和M3通过灌注方式施用在抑制病害方面是优越的。

[0092] 此外,根据本发明发现,通过灌注和/或通过喷洒或任何其他方式施用的多种类黑精类型的溶液可以用来保护植物免患白粉病。

[0093] 有利的是,发现类黑精对于在病害已确定后防治真菌病害也是有效的。

[0094] 类黑精可以以最终组合物或溶液的 $10^{-5}\%$ w/v至 5% w/v的浓度范围施用至植物。在本发明的一个实施方案中,发现 0.01% w/v至 0.1% w/v的类黑精溶液减轻了真菌病害的严重程度。还发现这些浓度对于诱导植物耐旱性是有效的。

[0095] 在另一个实施方案中,可以以 0.001% w/v的浓度将类黑精添加至肥料溶液。

[0096] 类黑精可以以任意频率施用至待处理的植物,例如,每日一次至三次。或者,可仅处理植物一次。也可将其定期提供给植物,例如,作为灌溉或施肥程序的一部分。根据一个具体实施方案,在不同的两日施用类黑精两次。根据另一个实施方案,在多日通过额外的施用来补充处理。

[0097] 根据本发明,可在植物生命周期的任意阶段(包括种子、萌发、植物生长、开花和结果)向植物施用类黑精。

[0098] 在根据本发明的方法中测试了类黑精的级分,并且未分级的类黑精和HMW级分均在防治真菌病害方面有效。

[0099] 在一个方面中,本发明提供了用于协助防治由真菌病原体导致的植物病害起始和进展的方法。所述方法包括向植物或其一部分施用有效量的包含类黑精的组合物。

[0100] 可根据本发明处理的植物是被子植物组(其为开花植物组)的成员。根据本发明的一个具体实施方案,所述植物包括但不限于葫芦科和茄科中属的成员。可根据本发明处理的植物类型的实例包括但不限于属于茄(Solanum)属和黄瓜(Cucumis)属的植物。

[0101] 类黑精在帮助保护植物免患由多种植物真菌病原体导致的病害方面是有效的。因此,本发明适用于消除多种植物真菌病原体(包括白粉病病原体和葡萄孢属(Botrytis spp.))。可被防治的真菌病原体的实例包括但不限于:新番茄粉孢菌、灰葡萄孢菌和单囊壳白粉菌。

[0102] 在本发明的一个实施方案中,当通过灌注、通过喷洒或在肥料水中施用时,类黑精溶液显著抑制了番茄和黄瓜植株上的白粉病和灰霉病。

[0103] 应注意,可将类黑精和包含其的组合物添加至现有的病害防治材料或肥料。

[0104] 根据本发明的类黑精在有机农业和常规农业中的使用代表了协助防治由真菌病原体导致的植物病害起始和进展的主要步骤。

[0105] 更具体地,已示出类黑精可使疾病严重程度降低高达90%。

[0106] 根据本发明的类黑精组合物改善了植物对干旱胁迫的耐受性和反应,从而表现出更好的植物生长,如通过增加的植物高度、重量、叶尺寸和茎宽,以及减少的枯萎所证明。在停止灌溉前经类黑精处理的植物显示出持续生长,尽管缺乏灌溉。

[0107] 此外,组合物可用于改善植物从干旱胁迫中恢复。在干旱胁迫下向植物施用类黑精溶液降低了枯萎严重程度并减少了死亡叶子的数目。

[0108] 在本发明的又一个方面中,发现类黑精对植物生长具有持续且积极的作用,如通过植物高度、节数、叶尺寸和花数目的显著增加所证明。通过本发明方法和组合物改善的另

外的植物特征包括种子萌发以及发根和根伸长。

[0109] 用于使用类黑精的合适形式是多样的,包括但不限于:(i)在添加或不添加表面活性剂的情况下将干粉或颗粒在任意适合植物的溶剂中混合并作为液体通过土壤灌注或叶喷洒来施用;(ii)作为粉末或颗粒直接施用到土壤表面;(iii)并入缓释固体中用于土壤施用;(iv)与另一些植物病害抑制活性成分复合在一起;(v)与肥料复合在一起;(vi)添加至土壤改良剂;以及更多形式。

[0110] 为了将类黑精施用至植物,可将其配制成可包含合适的惰性稀释剂或载体的组合物。

[0111] 根据本发明的类黑精可通过向植物施用物质的任何已知手段来施用。例如,其可在配制或未经配制的情况下直接施用至植物的任意部分或一部分(包括叶、茎、枝或根),在种子种植之前施用至种子或者施用至植物生长或待种植的其他介质(如土壤);或者可将类黑精喷洒至其上,喷粉(dust)至其上,通过浸渍施用,通过将组合物(如颗粒组合物)分布在或并入土壤或水性环境中来施用。

[0112] 还可将根据本发明的类黑精喷洒到植物上或者通过土地或空中灌溉系统来施用。

[0113] 类黑精可以以与肥料(例如,含氮肥料、含钾肥料或含磷肥料)以混合物使用,其可为溶液或固体的形式。所述混合物包含按重量计0.0001%至0.01%的类黑精,更具体地,为最终肥料的0.001%。

[0114] 类黑精的优势包括以下:

[0115] • 易于合成和合成的再现性。

[0116] • 能够在没有专业设备下容易地大量合成。

[0117] • 类黑精——多种预制食品(例如,蜂蜜、咖啡、蛋糕、炸洋葱、褐色的肉等)的常见组分——是无毒材料(GRAS,一般认为安全)。

[0118] • 类黑精对在任何使用阶段(制备、施用、收获)的农业工作者或者对农产品消费者没有表现出任何风险。在土壤中,类黑精分解为无毒的天然化合物,并因此不会表现出在土壤中累积的任何环境风险或危险。

[0119] • 类黑精是高度通用的,因为其可以以多种方式施用,例如,包括但不限于,叶喷洒、土壤灌注、干粉施用至土壤、颗粒施用至土壤。

[0120] 现在将参考具体实施例和材料来描述本发明。

实施例

[0121] 材料和方法

[0122] 制备类黑精

[0123] 将固体商用蛋白质水解产物(通过以酸、碱或酶使蛋白质裂解来制备的氨基酸混合物)与一种或更多种还原糖以1:1的水解产物与糖之重量比一起研磨,从而获得均匀细粉。在室温下快速进行研磨以减少具有吸湿性(吸收空气中的水)的水解产物的水吸收。在预热烘箱中于 $150 \pm 1^\circ\text{C}$ 下,将混合物在瓷皿中加热8分30秒,然后转移到具有硅胶的干燥器中以冷却到室温。在加热期间,水解产物中的氨基酸与糖通过美拉德反应进行反应,形成褐色类黑精。轻轻研磨经冷却的类黑精并将其转移到密封小瓶中用于储存。

[0124] 一般来说,单个氨基酸或水解产物(例如,由牛肉、酪蛋白、大豆、水稻等制得)中的

氨基酸混合物与还原糖(例如,单糖如葡萄糖、半乳糖或木糖等)、二糖(例如,乳糖或麦芽糖等)或多糖的任意组合可通过美拉德反应进行反应,形成类黑精。合成条件(包括温度、加热时间和溶剂(无水的、水、醇或其他溶剂))可变化。选择1:1的重量比是由于其代表氨基酸与还原糖的摩尔比为约1:1(与所选还原糖的分子量相比,考虑到蛋白质水解产物中氨基酸混合物的重量%和其各自的分子量)。这种近似虽然不精确,但是对于所测试的不同水解产物和还原糖效果都很好(表1)。

[0125] 一般来说,类黑精的基本组成根据所用的糖和氨基酸而明显不同。反应条件对类黑精的组成也具有显著影响。然而,在恒定反应条件下模型类黑精的基本组成仅受到反应物摩尔比的可以忽略的影响[Cämmerer B.和Kroh L.W.,Food chemistry,1995.53(1):55-59]。

[0126] 在以下实施例中,在与两种还原糖(葡萄糖和木糖,二者单独和一起)的混合物中测试了几种商用水解产物(见表1)。以下列出了所测试的不同水解产物和糖的组合:

[0127] 表1:类黑精溶液

[0128]

所测试类黑精溶液的名称	水解产物类型	糖类型
M1	胰蛋白胨 #3 CONDA Pronadisa Cat. # 1607.00	D-(+)-葡萄糖; Sigma-Aldrich Cat. # G8270; 纯度 >99.5%
M2	Bacto™ BD, 蛋白胨 Cat. # 211677	D-(+)-葡萄糖; Sigma-Aldrich Cat. # G8270; 纯度 >99.5%
M3	Bacto™ BD, 胰蛋白胨, 胰消化酪蛋白 Cat. # 211705	D-(+)-葡萄糖; Sigma-Aldrich Cat. # G8270; 纯度 >99.5%
M4	胰蛋白胨#3 CONDA Pronadisa Cat. # 1607.00	D-(+)-木糖; Sigma-Aldrich Cat. # X1500; 纯度>99%
M5	Bacto™ BD, 蛋白胨 Cat. # 211677	D-(+)-木糖; Sigma-Aldrich Cat. # X1500; 纯度>99%
M6	Bacto™ BD, 胰蛋白胨, 胰消化酪蛋白 Cat. # 211705	D-(+)-木糖; Sigma-Aldrich Cat. # X1500; 纯度>99%
M7	胰蛋白胨#3 CONDA Pronadisa Cat. # 1607.00	葡萄糖: 木糖 1:1 (与之前相同的糖)
M8	Bacto™ BD, 蛋白胨 Cat. # 211677	葡萄糖: 木糖 1:1 (与之前相同的糖)
M9	Bacto™ BD, 胰蛋白胨, 胰消化酪蛋白 Cat. # 211705	葡萄糖: 木糖 1:1 (与之前相同的糖)

[0129] 对于以下实验,以在水中0.01%、0.03%和0.1%的浓度测试类黑精。合成不同批次的给定制备物以确认合成过程和生物学作用的重复性。对每个连续批次进行连续编号(例如,M1、M1.1、M1.2是M1的第1、第2和第3批次)。

[0130] 在一个实施例中,使用3000道尔顿的超滤膜来浓缩高分子量(HMW)类黑精。然后用双蒸水稀释HMW渗余物并且使用同一膜超滤再浓缩两次。将仅含有HMW类黑精的最终渗余物(>3000道尔顿)在液氮中急速冷冻后通过冻干进行干燥。如果有任何低分子量反应物残余物的话,则在超滤程序后进行漂洗(称为渗滤),以有效地将其除去。以下将经清洁的高分子量级分称为“经清洁”材料或高分子量(HMW)类黑精。

[0131] 病害防治实验

[0132] 植物

[0133] 在苗圃中从种子生长出番茄和黄瓜植株并且在不加热的温室播种后40至50天移植到1升的盆中。用滴头(dripper)向植株按比例施用5:3:8NPK肥料,每天2至3次(计划灌溉用水的总N、P和K浓度分别为120mg/L、30mg/L和150mg/L;EC 2.2dS/m),允许25%至50%的排水(drainage)。在生长期中将植株在无害虫且无病害的温室中维持在20℃至30℃下,以及在自然光和50%至90%的相对湿度下,然后将其转移到在如下所述在完好叶或脱落叶上发生病原体感染后使得病害发生的区域中。

[0134] 病原体:生长、收获、感染和对所赋予的病害严重程度的评估

[0135] 诱导灰霉病的病原体

[0136] 在各自含有15mL PDA的90mm直径培养皿中的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA,Difco, Detroit,MI)上培养灰葡萄孢菌[Pers.:Fr.[Teleomorph:富克葡萄孢盘菌(*Botryotinia fuckeliana*) (de Bary) Whetzel](分离株BcI16;[Swartzberg D.等,Eur.J.Plant Pathol.,2008,120:289-297]),并在20℃下孵育。将接种物保持在PDA上并且每两周进行转移。通过在具有自来水的玻璃管中搅拌1cm²的具有菌丝体和分生孢子的琼脂而从在10至14日龄的培养物中收获灰霉病分生孢子。然后使混悬液通过粗棉布过滤。使用血细胞计数器和光学显微镜测定分生孢子的浓度,并将其调节至5×10⁵个分生孢子/ml。因为灰葡萄孢菌分生孢子的萌发和穿入需要碳和磷酸盐,所以将0.1%的葡萄糖与0.1%的KH₂PO₄一起添加至最终的分生孢子混悬液。这些补充剂已显示出促进灰葡萄孢菌分生孢子的萌发和随后的叶感染。

[0137] 对附着番茄叶的植株进行检查。将整个植株维持在20±1℃、97±3%RH和1020勒克斯(lux)光强度的湿度室中。通过向整个植株喷洒2mL的5×10⁵个分生孢子/ml的混悬液来感染植株。

[0138] 使用图鉴(pictorial key)评估每株植物的病害严重程度;0=无感染(所有叶都无症状)而100=所有叶全部由灰霉病症状所复盖(cover)。

[0139] 始终使生长室的温度保持在20±1℃和75%至90%RH。

[0140] 诱导白粉病的病原体

[0141] 从在商用温室中生长的番茄植株的嫩叶中分离番茄白粉病病原体新番茄粉孢菌。通过用无菌水漂洗感染叶以收获这种病原体的分生孢子。对于人工感染的番茄叶(生长室实验),在具有血细胞计数器的光学显微镜下测定这些分生孢子混悬液的浓度。将所有混悬液的浓度调节至10⁴个分生孢子/ml,然后每株植物使用5ml体积喷洒到植物上。所有混悬液都在分生孢子收获时起的10分钟至15分钟内施用至植物。采用手持式喷雾瓶施用混悬液并使植物干燥至多30分钟。始终使生长室的温度保持在20±1℃以及75%至90%RH和2030勒克斯光强度。

[0142] 使用图鉴评估番茄白粉病的严重程度;0=无感染(叶看起来健康)而100=叶被白粉病症状复盖。在三种不同植物高度下评估严重程度并且对整个植株进行平均。在叶上而没有在植物的其他部分上观察到大部分的病害症状,因此对叶感染进行监测。

[0143] 黄瓜白粉病

[0144] 从农作物的自然感染植株中或者从在温室中生长的黄瓜植株的嫩叶中收获黄瓜白粉病病原体单囊壳白粉菌[(Castagne) Braun&Shishkoff[=棕丝单囊壳(*Sphaerotheca fusca* (Fr.) Blumer) = *S. fuliginea* (Schlechtend.:Fr.) Pollacci]]。通过用无菌水漂洗感

染叶来收获这种病原体的分生孢子。

[0145] 对于黄瓜叶的实验性感染(生长室实验),在具有血细胞计数器的光学显微镜下测定这些分生孢子混悬液的浓度。将所有混悬液的浓度调节至 10^4 个分生孢子/ml,然后每株植物使用5ml体积喷洒到植物上。所有混悬液都在分生孢子收集时间起的10分钟至15分钟内施用至植物。采用手持式喷雾瓶施用混悬液并使植物干燥至多30分钟。始终使生长室的温度保持在 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 以及75%至90%RH和2030勒克斯光强度。

[0146] 使用图鉴评估黄瓜白粉病的严重程度;0=无感染(所有叶看起来健康)而100=所有叶被白粉病症状复盖。在三至六种不同植物高度下评估严重程度并且对整个植物进行平均。在叶上而没有在植物的其他部分上观察到大部分病害症状,因此对叶感染进行监测。

[0147] 类黑精处理

[0148] 类黑精处理由以3ml/植物进行喷洒或灌注组成。对照植物没有被感染,通过水进行处理并且保持在上述相同的条件下。

[0149] 统计分析

[0150] 将实验中的处理重复5至10次。随机布置每次处理的重复。在进一步分析前,对以百分比为单位的病害严重程度数据进行反正弦变换。使用ANOVA和Fisher保护的LSD检验(Fisher's protected LSD test)来分析病害严重程度数据。计算这些方法的标准误差(SE)并在进行单向方差分析后对病害水平进行统计分离($P \leq 0.05$)。对照实验示出了仅施用水而没有类黑精的病害严重程度。

[0151] 耐旱性实验

[0152] 植物

[0153] 从种子生长出番茄植株,并且在播种后40至50天将其移植到含有珍珠岩的1升的盆中。用滴头向植物按比例滴灌施肥5:3:8NPK肥料,每天2至3次(计划灌溉用水的总N、P和K浓度分别为120mg/L、30mg/L和150mg/L;EC 2.2dS/m),允许25%至50%的排水。在两个月的生长期中将植株维持在 20°C 至 30°C 的无害虫且无病害的温室中,然后转移到这样的区域中:其中没有使用灌溉,温度为 $22 \pm 1^\circ\text{C}$,光照持续时间为12h/天,并且将整个盆体装入塑料袋中以避免从根部蒸发。

[0154] 处理和评估

[0155] 在无灌溉的21天期间,对叶长度(cm)、顶生小叶面积(cm^2)、植物重量(克)和枯萎严重程度(标尺为0至100%,其中0=没有枯萎而100=植物完全枯萎)进行测量。

[0156] 在3周无灌溉后,灌溉植物至田间持水量(field capacity),使其恢复并获得膨压4小时,然后再次测量枯萎严重程度并对活的叶数目进行计数。

[0157] 在灌溉停止前三天和当天(-3和0)将类黑精溶液以0.01%和0.1%的浓度喷洒于植株或通过灌注施用至根部。另外,在一些实验中,喷洒处理包括两次以上的喷洒,在灌溉停止后第7天和第14天(+7,+14)。灌注中施用溶液的体积为每株植物5ml和喷洒为每株植物2ml。以与用类黑精处理相同的方式用水灌注或喷洒来处理对照植株。在该实验中使用M1。将类黑精溶解于水中至期望浓度。

[0158] 生长实验

[0159] 植物

[0160] 由苗圃获得约30至40天大的番茄幼苗并且移植到专门设计的10升盆中,用玻璃纤

维棉填充(line)在其中的下部三分之一,导致排水管也填满玻璃纤维棉。所述玻璃纤维棉的目的是改善生长介质(其为干净的石英砂)的排水。根据植物需要用滴头成比例地给植物滴灌施肥(通过灌溉用水施肥),每天2次。对浸出液(leachate)的电导率(EC)进行常规监测,并调节灌溉量使得浸出液的EC等于输入EC,从而能够使得足够的水施用并且避免盐在砂中的积累。

[0161] 处理和评估

[0162] 肥料溶液由0.2%的肥料,4-2.5-6(N-P₂O₅-K₂O;在溶液中给予80:50:120mg/L)组成。所述肥料还包含2%的Ca、0.5%的Mg和额外的微量元素。一半植物施以添加有0.001%(10mg/L)M1的肥料溶液,另一半仅接受肥料。每次处理为7个重复植株。移植后使植物在网室中生长48天的时期。

[0163] M1的总N含量为7%,这意味着其向肥料溶液添加了额外的0.7mg/L的N。与肥料N相比(80mg/L),这是可忽略的量。

[0164] 实施例1:

[0165] 多种类黑精溶液对灰葡萄孢菌感染之番茄植株中灰霉病严重程度的作用

[0166] 在种植后25天通过灰葡萄孢菌混悬液(如在“材料和方法”部分中描述)感染植物。在感染之前3天和1小时,将0.1%的多种类黑精类型的溶液(主要信息参见表1)喷洒或灌注两次。在高湿度条件下感染并孵育后11天对病害严重程度进行评估。

[0167] 发现在番茄植株上喷洒的M1至M3和M6至M8溶液在降低病害严重程度方面是有效的。与其他溶液相比,用溶液M1和M3灌注的施用在病害抑制方面是优越的(图1)。

[0168] 实施例2:

[0169] 多种类黑精类型的溶液的喷洒对新番茄粉孢菌感染之番茄植株中白粉病严重程度的作用

[0170] 在种植后33天通过新番茄粉孢菌(如在“材料和方法”部分所指出)感染番茄植株。在感染之前3天和1小时通过喷洒0.1%类黑精(主要信息参见表1)溶液处理植物两次。感染后经过19天进行番茄白粉病严重程度的评估。

[0171] 发现喷洒0.1%的多种类黑精抑制了番茄白粉病(图2)。

[0172] 实施例3:

[0173] 通过喷洒和灌注施用的多种类黑精类型的溶液对新番茄粉孢菌感染之番茄植株中白粉病严重程度的作用

[0174] 在种植后35天通过新番茄粉孢菌感染番茄植株。在感染之前3天和1小时通过灌注或喷洒0.1%类黑精溶液(主要信息参见表1)处理植物。感染后经过23天进行番茄白粉病严重程度的评估。

[0175] 发现喷洒0.1%的多种类黑精类型的溶液抑制了番茄白粉病,而且M1.1和M2显著更加有效。

[0176] 还发现通过灌注0.1%的M1.1和M3.1溶液进行施用抑制了番茄白粉病(图3)。

[0177] 实施例4:

[0178] 多种类黑精类型的溶液的喷洒对新番茄粉孢菌感染之番茄植株中白粉病严重程度的作用

[0179] 在种植后30天通过新番茄粉孢菌感染番茄植株。在感染之前3天和1小时通过喷洒

0.1%类黑精溶液处理植物。感染后经过18天进行番茄白粉病严重程度的评估。

[0180] 发现喷洒0.1%的多种类黑精类型的溶液抑制了番茄白粉病(图4)。

[0181] 实施例5:

[0182] 类黑精浓度对新番茄粉孢菌感染之番茄植株中白粉病严重程度的作用

[0183] 通过以两种浓度喷洒来施用两种类黑精溶液。在种植后20天通过新番茄粉孢菌的分生孢子混悬液感染植物。在感染之前3天和1小时施用浓度范围为0.03%至0.1%的类黑精溶液两次。在感染后42天评估病害。

[0184] 发现作为喷雾施用的这两种浓度的两种类黑精类型(主要信息参见表1)均有效抑制番茄白粉病(图5)。

[0185] 实施例6:

[0186] HMW类黑精对灰葡萄孢菌感染之番茄植株中灰霉病严重程度的作用

[0187] 将经清洁的和分级的类黑精(如上所述制备)的作用与常规类黑精的作用进行比较,以测试低分子量残留反应物或其他低分子量美拉德反应产物是否可能是病害抑制的原因,而不是聚合的类黑精。通过喷洒或灌注施用这两种类型(“清洁的”和“未清洁的”)。在种植后40天通过使用灰葡萄孢菌的分生孢子混悬液感染植物。在感染之前3天和1小时施用浓度为0.03%的类黑精溶液两次。在高的相对湿度条件下感染并孵育后7天对病害进行评估。

[0188] 发现这两种类黑精制备物(“清洁的”和“未清洁的”)在抑制番茄灰霉病方面同样有效。当通过喷洒或灌注施用, HMW类黑精溶液在防治病害方面有效(图6)。该实验表明,与任何(可能的)残留反应物或低分子量美拉德产物不同,类黑精确实是活性组分。

[0189] 实施例7:

[0190] 多种类黑精类型的溶液的灌注和喷洒对黄瓜植株中单囊壳白粉菌白粉病发生的作用

[0191] 在种植后3、11和18天通过类黑精处理黄瓜植株。在种植后23天期间对植株上自然发生的单囊壳白粉菌白粉病进行评估。

[0192] 发现通过灌注0.1%的多种类黑精类型的溶液(主要信息参见表1)和通过喷洒0.03%至0.1%的多种类黑精类型的溶液抑制了白粉病(图7)。

[0193] 实施例8:

[0194] HMW和未分级的类黑精类型的溶液对感染的黄瓜植株中之单囊壳白粉菌白粉病严重程度的作用

[0195] 在种植后33天通过单囊壳白粉菌感染黄瓜植株。通过以0.03%的浓度灌注施用HMW和未分级的类黑精溶液。在感染后36天期间对病害严重程度进行评估。

[0196] 发现当通过0.03%的溶液灌注来施用,类黑精类型的HMW和未清洁溶液(主要信息参见表1)二者都显著抑制了黄瓜白粉病的严重程度(图8)。

[0197] 实施例9:

[0198] 在干旱条件下类黑精对植物重量的作用

[0199] 通过喷洒到株冠或者通过灌注到根部通过0.01%至0.1%的M1溶液或水(对照)处理番茄植株。灌溉停止后三周,在相对灌溉停止的-3天、0天、7天和14天施用的灌注处理中(图9)和通过喷洒处理(图10),植物的重量增加。

[0200] 该结果证明,尽管缺乏灌溉,以类黑精处理的植物也继续生长。

[0201] 实施例10:

[0202] 在干旱条件下类黑精对叶生长的作用

[0203] 通过喷洒到株冠或者通过灌注到根部通过0.01%至0.1%的M1溶液或水(对照)处理番茄植株。灌溉后停止两周,通过在相对灌溉停止的-3天和0天施用的灌注和喷洒处理,叶长度增加(图11)。

[0204] 该结果证明,尽管缺乏灌溉,以类黑精溶液处理的植物也继续生长。

[0205] 实施例11:

[0206] 类黑精对于旱后重新浇水后的植物枯萎的作用

[0207] 通过喷洒到株冠或者通过灌注到根部通过0.01%至0.1%的M1溶液或水(对照)处理番茄植株。21天不给所述植株浇水,然后重新浇水。重新浇水后4小时,对枯萎严重程度(图12)和活的叶数目(图13)进行评估。用类黑精溶液进行喷洒或灌注处理降低了番茄植株的枯萎严重程度(图12)和叶的死亡率(图13)。

[0208] 该结果证明,类黑精对植物从干旱影响中恢复的积极作用。

[0209] 实施例12:

[0210] 类黑精对番茄植株高度、节的数目和叶长度的作用

[0211] 用具有0.001% (10mg/L) M1的肥料溶液或作为对照的单独肥料溶液给番茄植株施肥。定期向肥料溶液添加M1对植物生长具有持续且积极的作用,如在植物高度(图14A)、节的数目(图14B)和叶长度(图14C)方面所表现。伴随植物高度增加之节的数目和叶尺寸的增加表明,虽然植物在类黑精处理下更高,但其并没有黄化。

[0212] 实施例13:

[0213] 类黑精对番茄植株花数目的作用

[0214] 用具有0.001% (10mg/L) M1的肥料溶液或作为对照的单独肥料溶液给番茄植株施肥。图15中示出了自移植后33天开始,每株植物的花数目。该结果表明,经类黑精处理的植物的花数目显著更多。

[0215] 实施例14:

[0216] 在滴灌施肥溶液中施用的类黑精对灰葡萄孢菌感染之番茄植株中灰霉病严重程度的作用

[0217] 用具有0.001% (10mg/L) M1的肥料溶液或作为对照的单独肥料溶液给番茄植株施肥。在移植后4周和移植后8周从植物脱落叶。通过灰葡萄孢菌混悬液(如“材料和方法”部分中所述)感染脱落的叶。

[0218] 发现加到肥料水中的M1在移植后4周和8周均保护番茄植株免于灰霉病感染,从而表明其在植物的整个生命周期有效(图16)。

[0219] 实施例15:

[0220] 通过UV-Vis表征类黑精

[0221] 在ThermoScientific的UV-Vis分光光度计(Genesys 10UV)上于190nm至700nm之间测量双蒸水中的100mg/L类黑精溶液的UV-Vis吸收光谱。

[0222] 图17中显示的结果示出所有类黑精溶液的光谱都非常相似,表明最大吸光度在约200nm,然后到约240nm吸光度急剧下降,到约280nm至290nm吸光度增加,并且到700nm逐渐下降。

[0223] 实施例16:

[0224] 通过荧光激发发射光谱表征类黑精

[0225] 在Shimadzu RF-5301PC荧光分光光度计上于210nm至590nm的激发范围和220nm至600nm的发射范围中收集不同类黑精(M1、M3、M7和M9)的光谱。激发和发射狭缝为5nm,以高灵敏度,分辨率为2nm并且增量为5nm。水性溶液为22mg/L。

[0226] 图18A(M1)、图18B(M3)、图18C(M7)和图18D(M9)中显示的结果表明所有光谱都非常相似,具有在350/425nm激发/发射波长处的主峰,在225/450nm激发/发射波长处的第二峰,以及在275/360nm激发/发射波长处之小的第三次提高。

[0227] 实施例17:

[0228] 类黑精表征:在25°C下的水溶解度

[0229] 发现不同类黑精(M1和M3)在25°C下的溶解度为>70g/100mL水。

[0230] 高的水溶解度表明类黑精本质上基本为亲水性,并且反映了其作为亲水性糖与氨基酸之间的反应产物的来源。

[0231] 实施例18:

[0232] 类黑精表征:作为浓度函数的M1的水性表面张力

[0233] 基于Wilhelmy法通过Delta-Pi微张力计(Kibron,Helsinki,Finland)并利用小直径(0.51mm)的特殊合金丝在20°C下测定表面张力。

[0234] 根据图19中所示的结果,类黑精具有很小的表面活性,如通过以下事实所示出:在高达1000mg/L的浓度下,溶液的表面张力没有显著减小到低于纯水的表面张力(在20°C下为72.8mN/m)。即使在其最高浓度(约100g/100mL)下,类黑精溶液表面张力仅仅减少到约45mN/m。该行为可与表面活性剂进行对比,表面活性剂当以非常低的浓度存在时可大幅度并显著地减小水的表面张力。表面活性剂是两亲性有机化合物,这意味着其在分子中具有疏水性基团和亲水性基团二者,使得其聚集在水的表面上并使表面张力减小。与其高水溶解度一致,类黑精不是两亲性的并且不容易在水-空气表面处聚集。

[0235] 实施例19:

[0236] 类黑精表征:FTIR

[0237] 在400至4000 cm^{-1} 之间,用平均扫描次数为100和分辨率4 cm^{-1} (Bruker Tensor 27FTIR分光计)记录用KBr中0.3%w/w的类黑精制备之KBr压片的FTIR吸收光谱。

[0238] 图20中示出的结果表明所有不同的类黑精制备物(M1、M3、M7和M9)是类似的。FTIR光谱保留了前体糖的FTIR光谱的一般特征,并且由于与氨基酸反应而有某些变化。

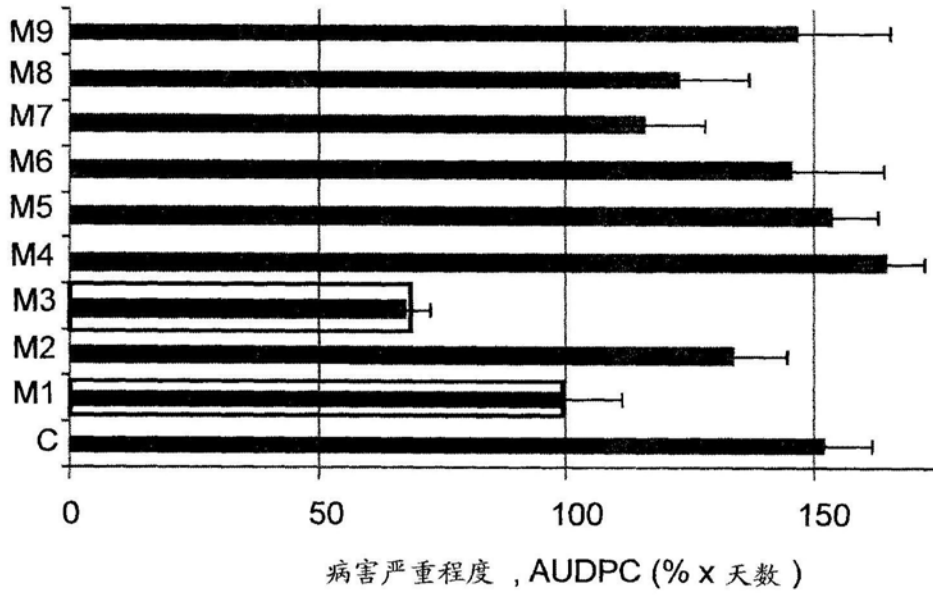


图1A

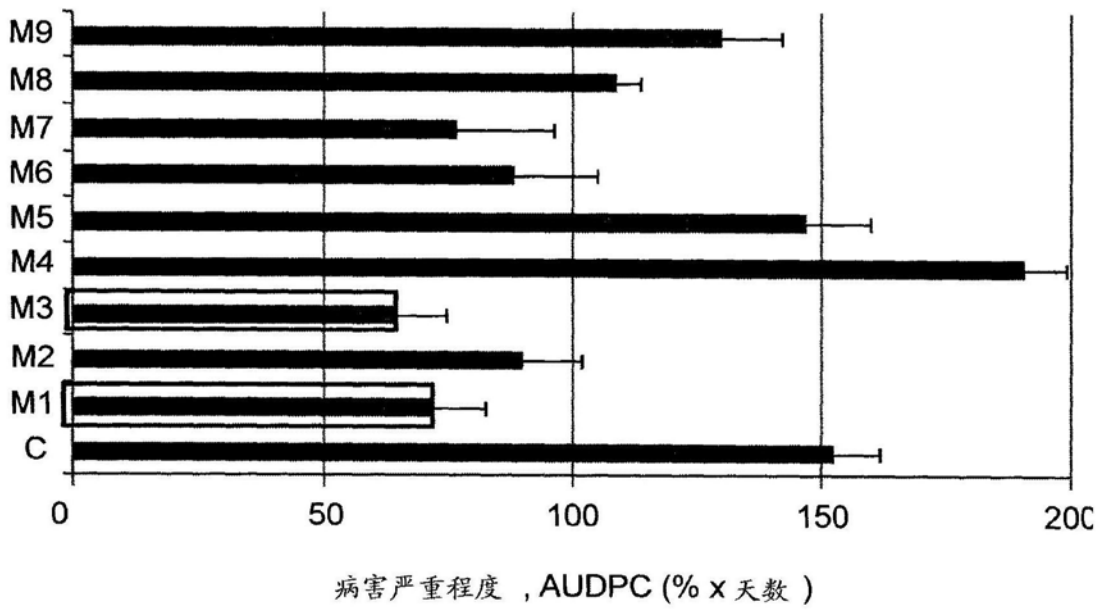


图1B

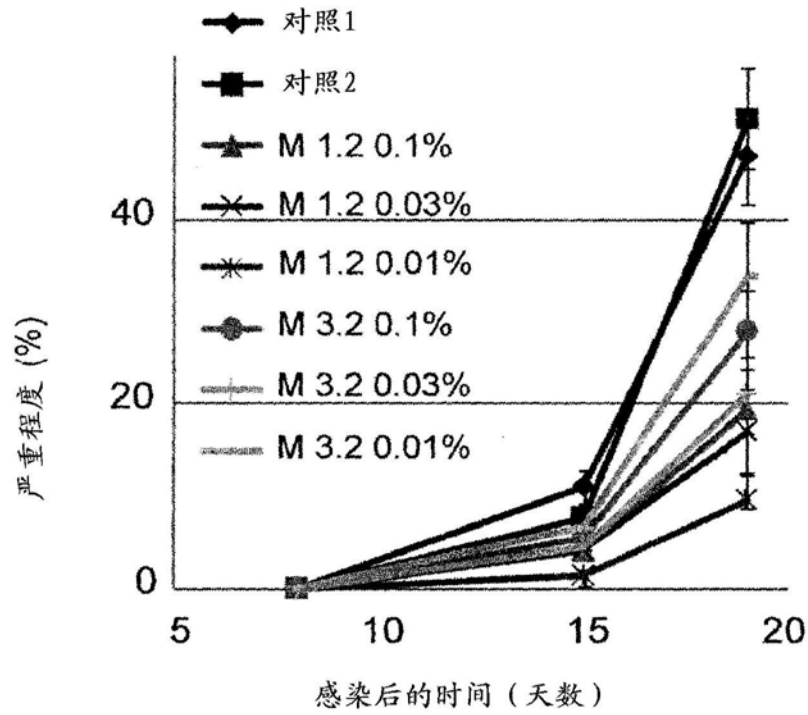


图2A

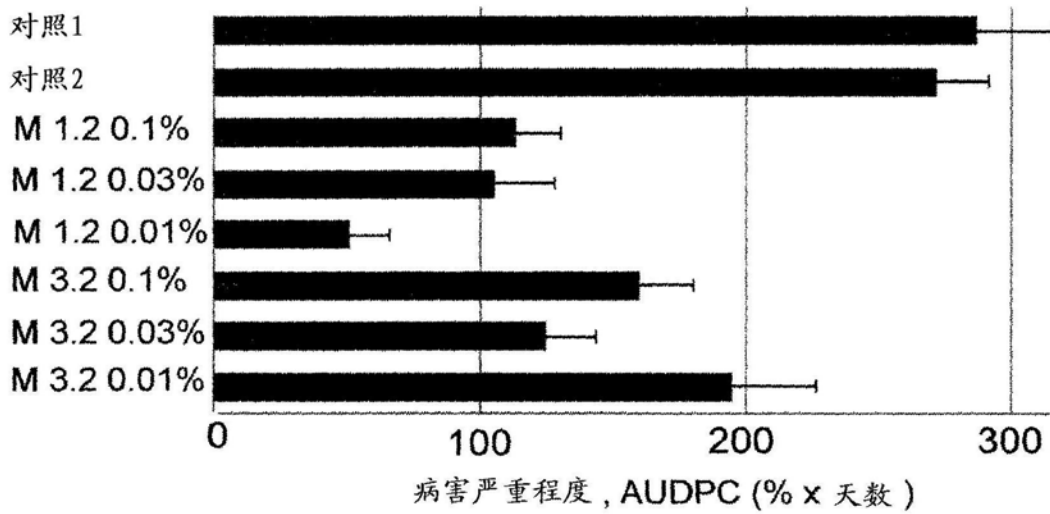


图2B

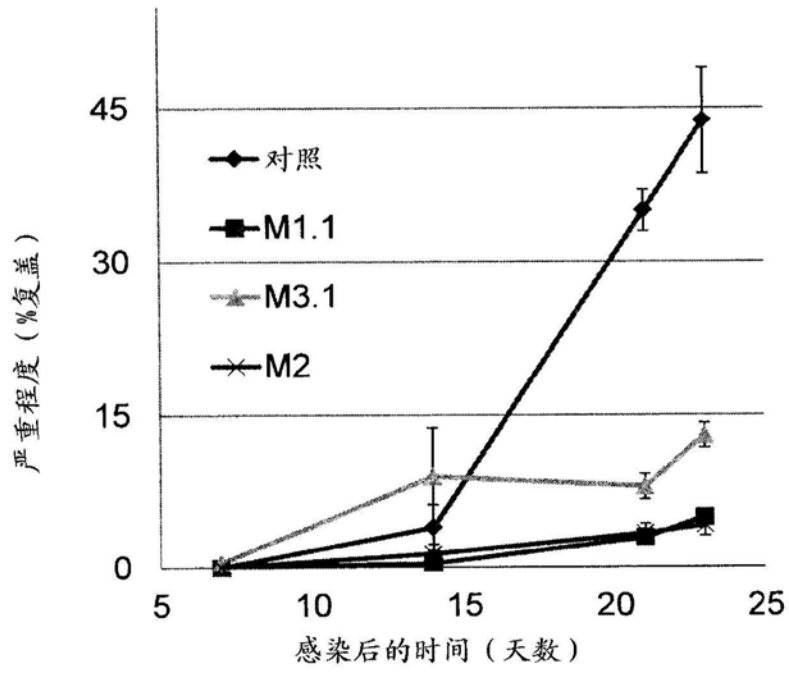


图3A

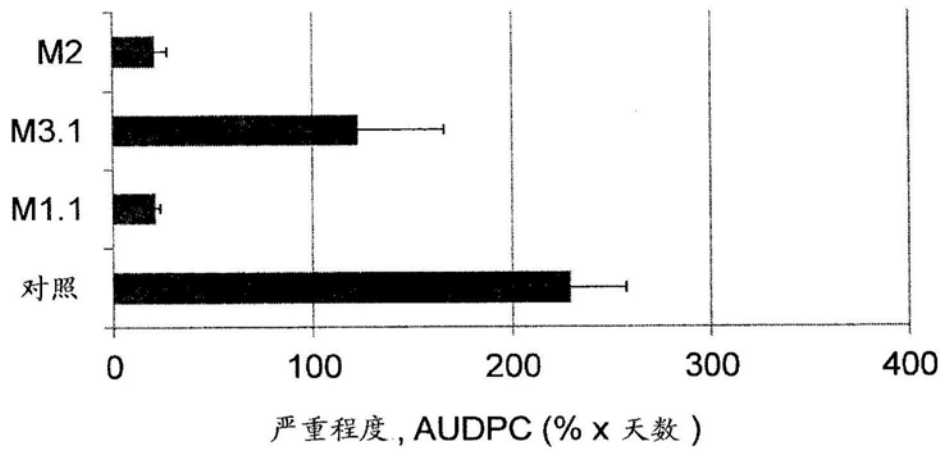


图3B

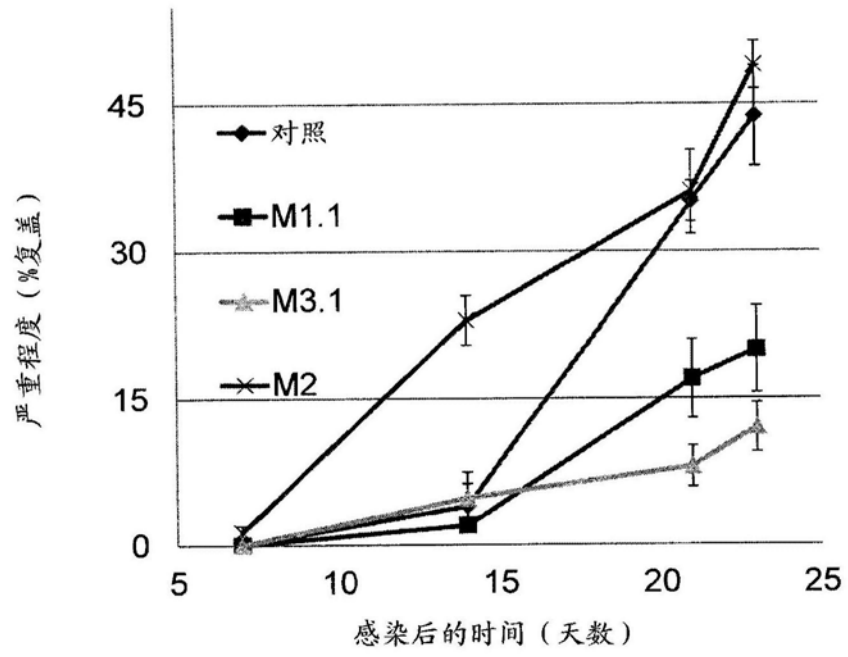


图3C

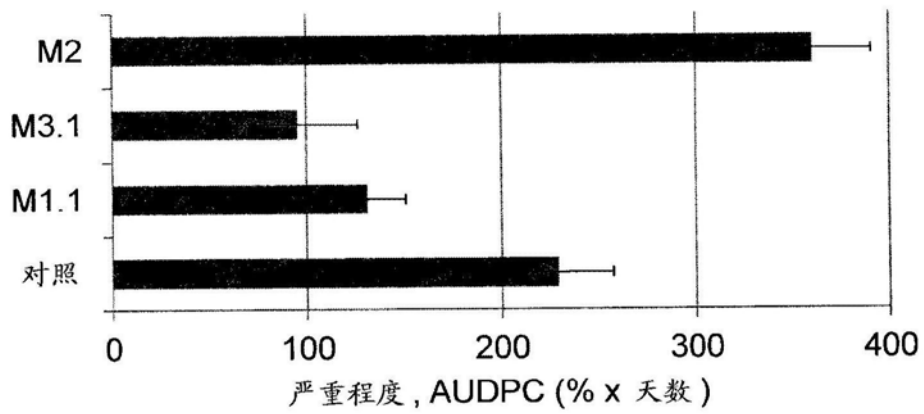


图3D

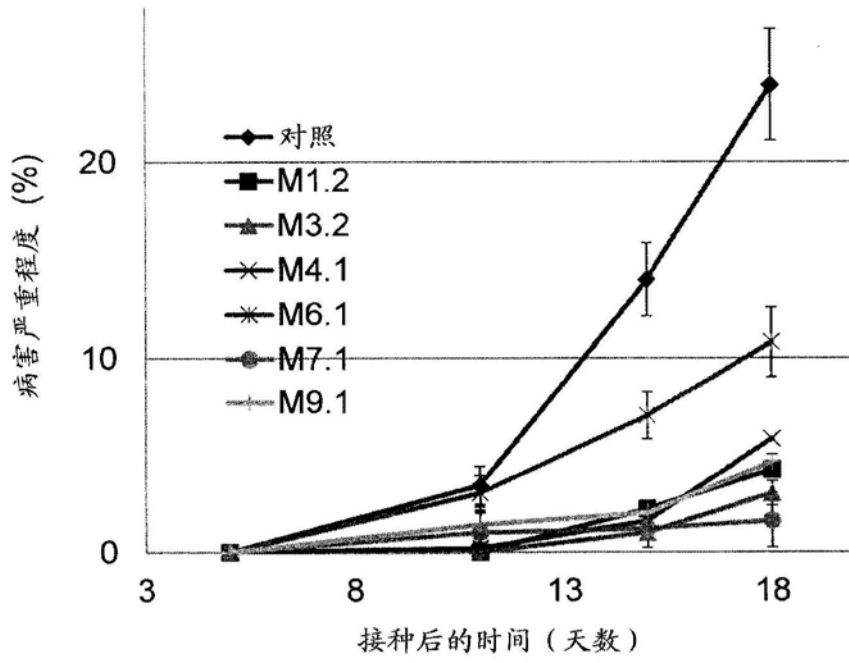


图4A

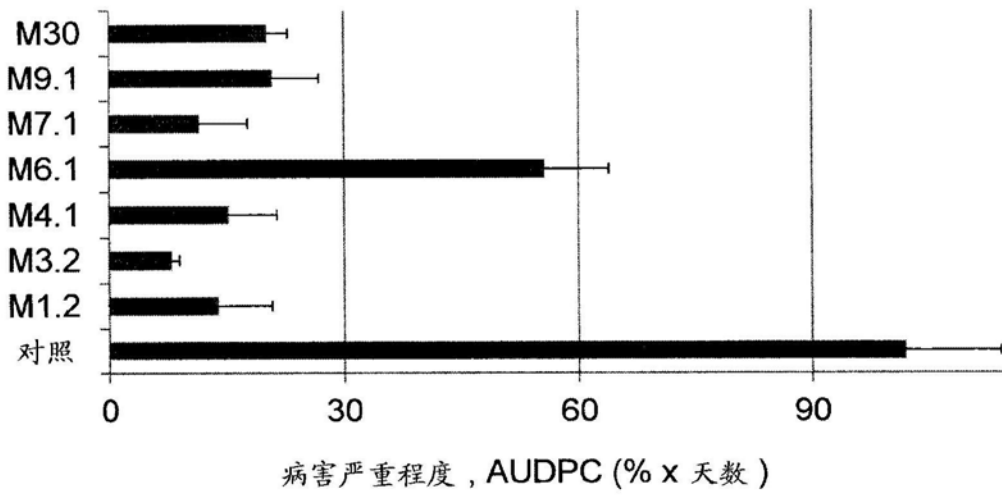


图4B

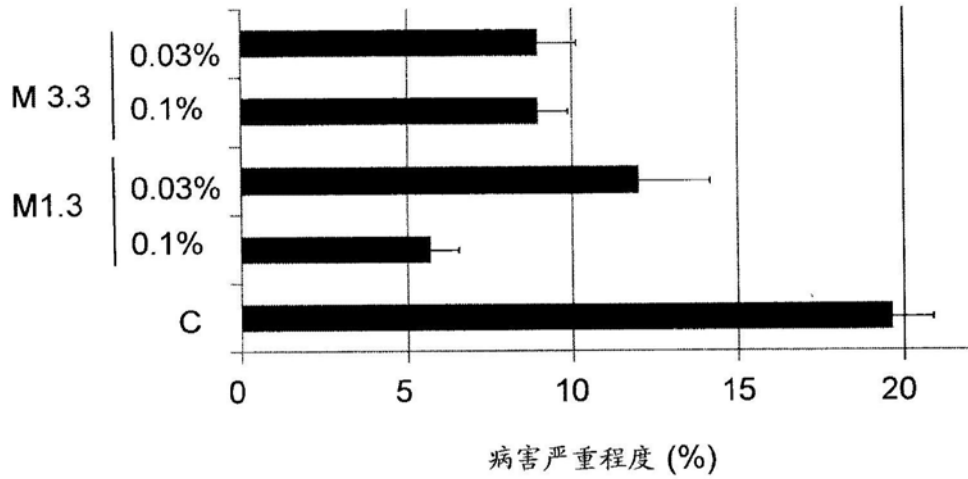


图5

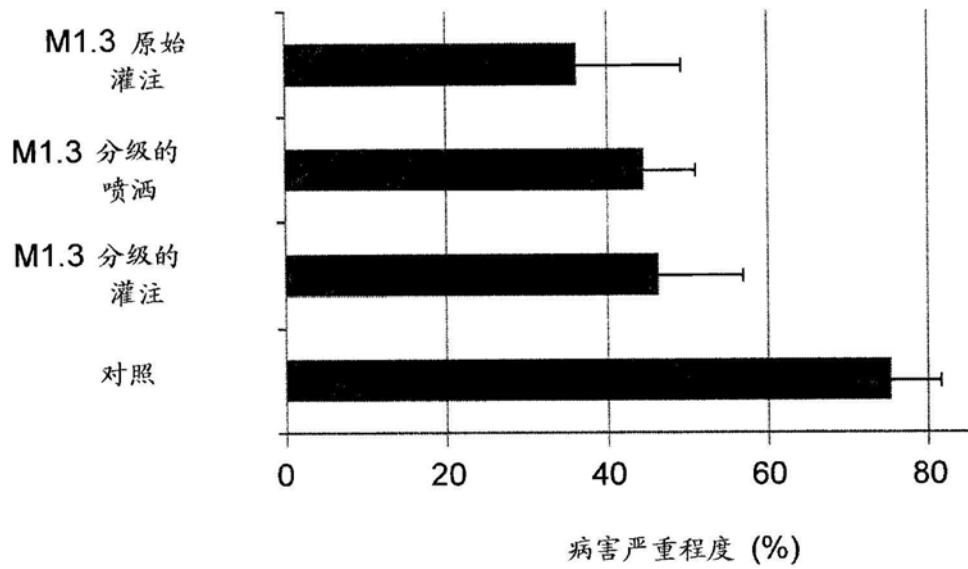


图6

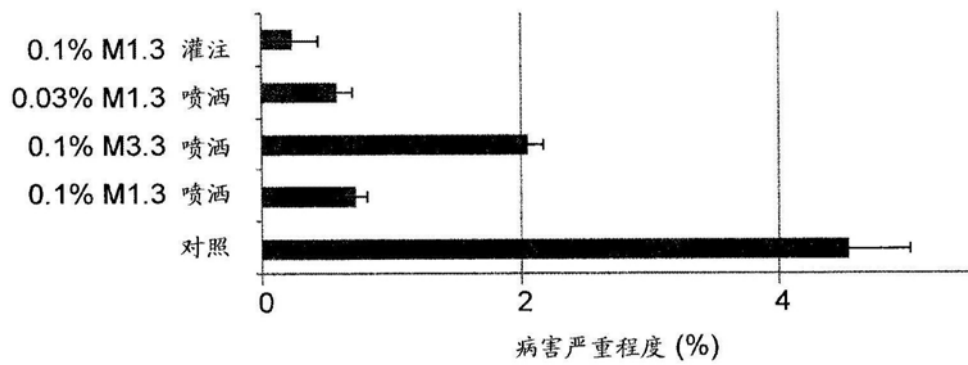


图7A

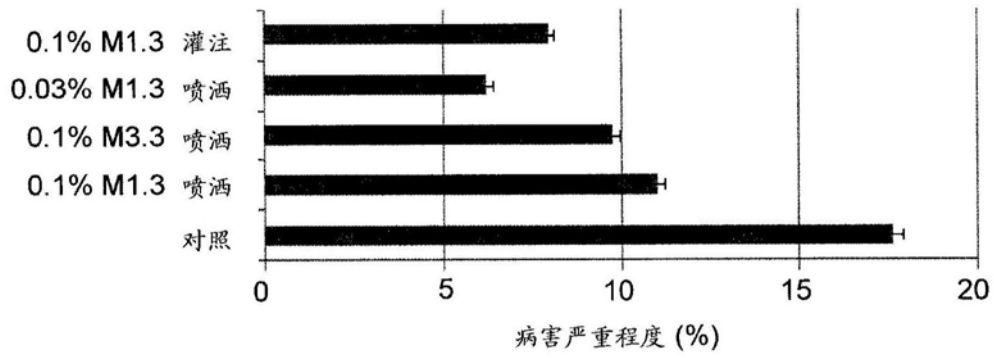


图7B

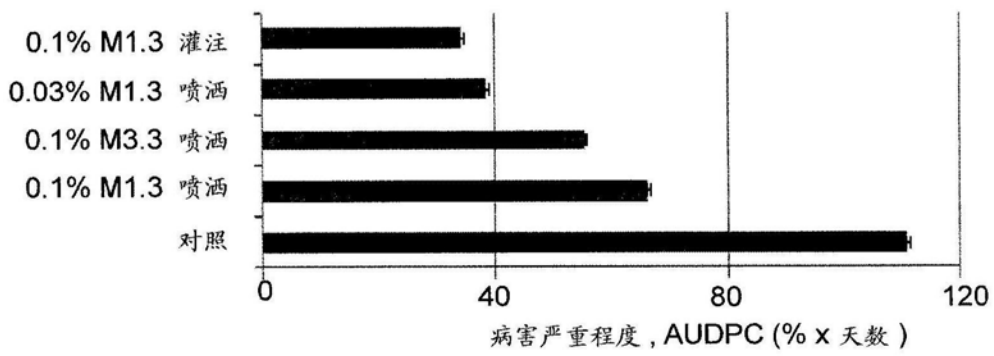


图7C

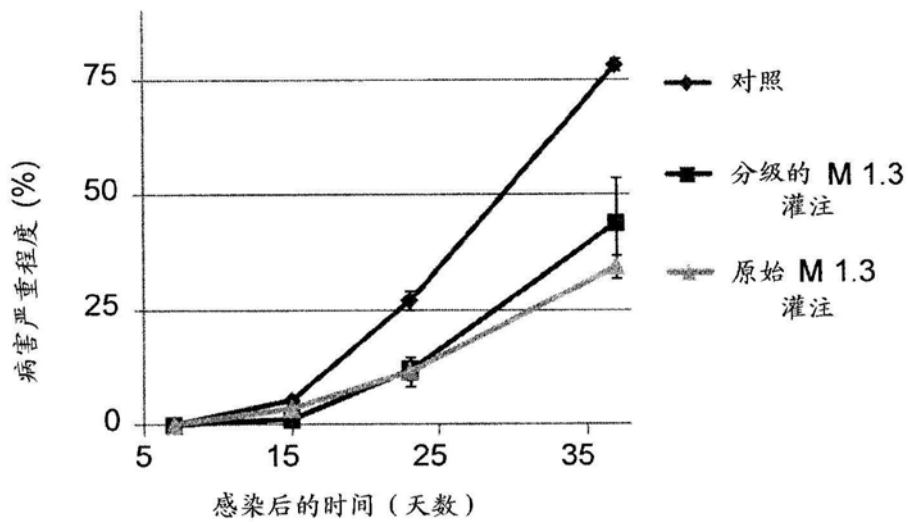


图8A

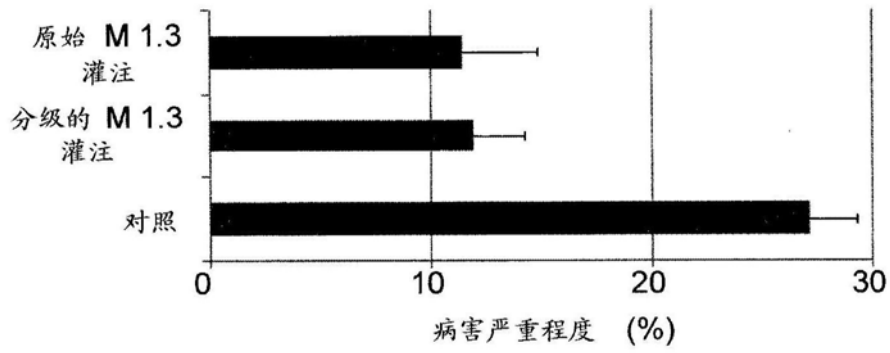


图8B

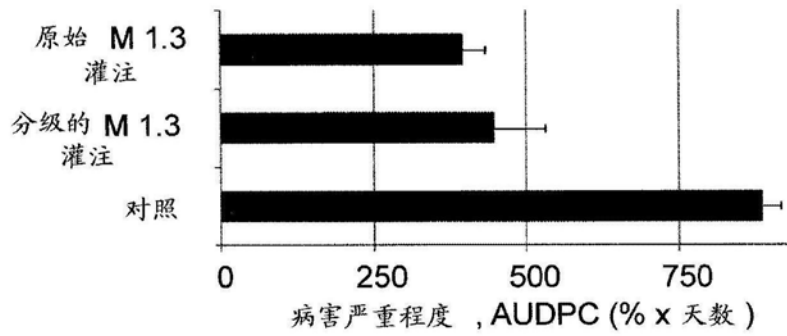


图8C

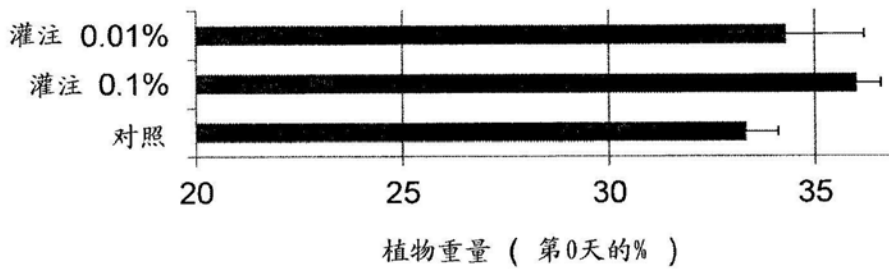


图9

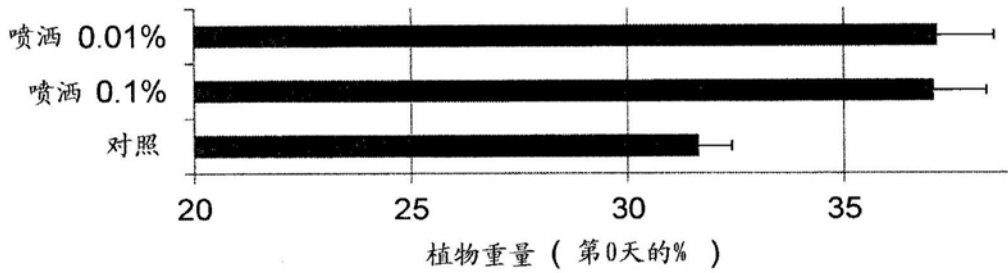


图10

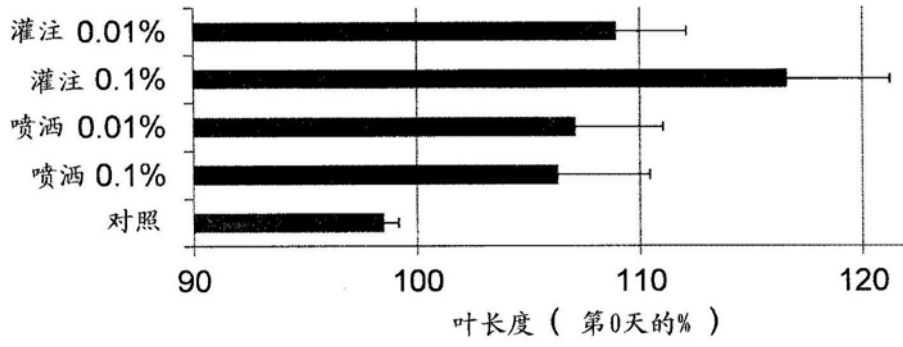


图11

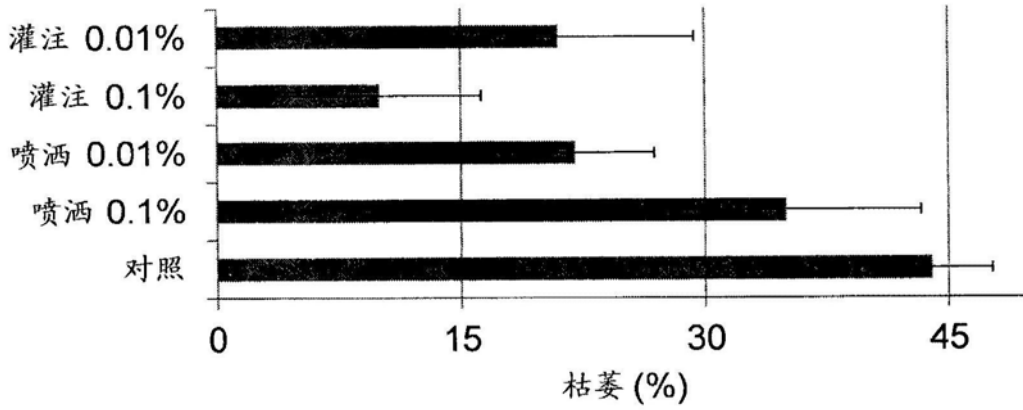


图12

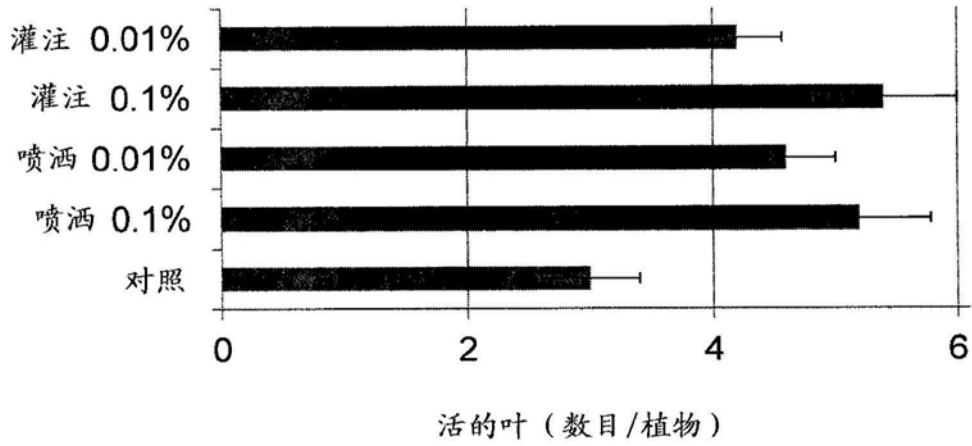


图13

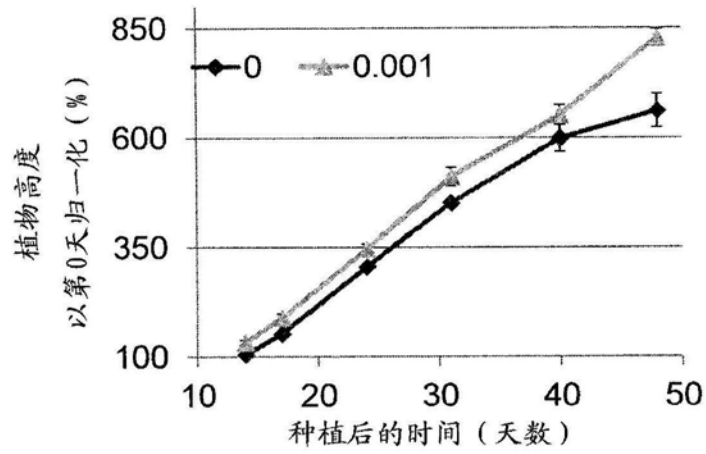


图14A

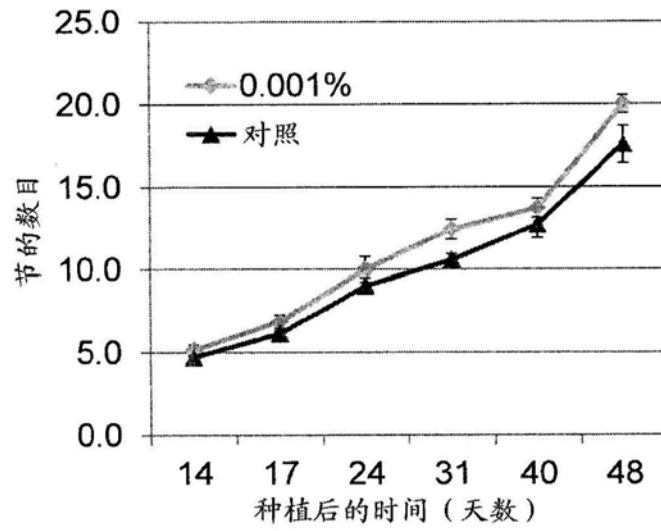


图14B

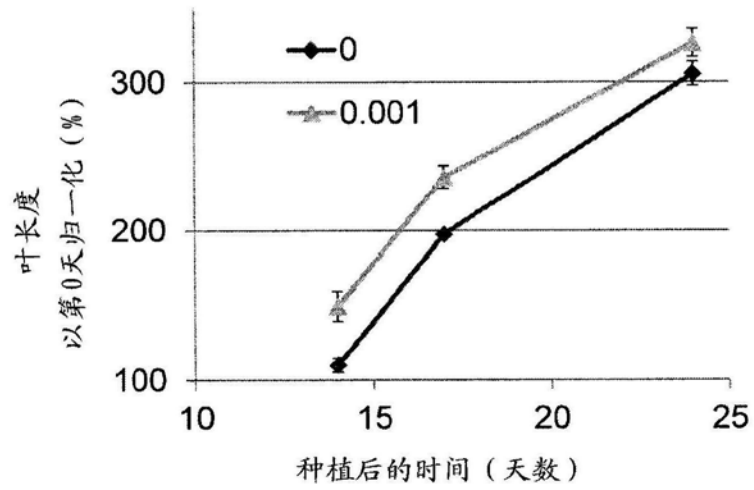


图14C

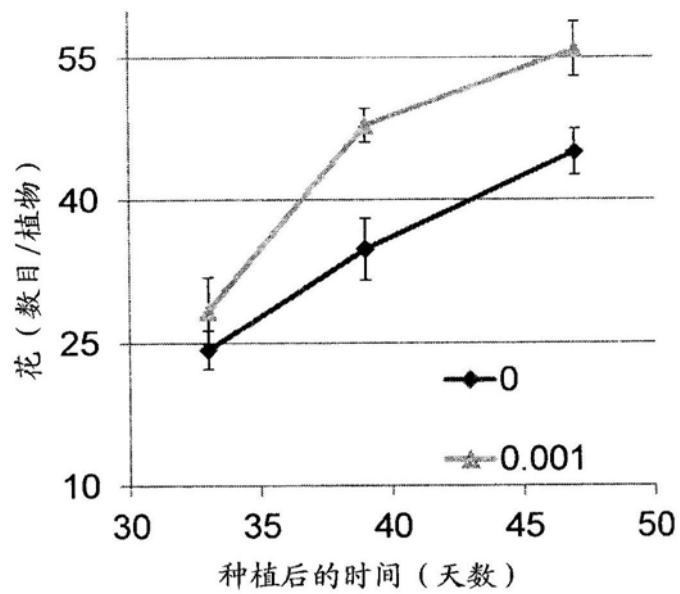


图15

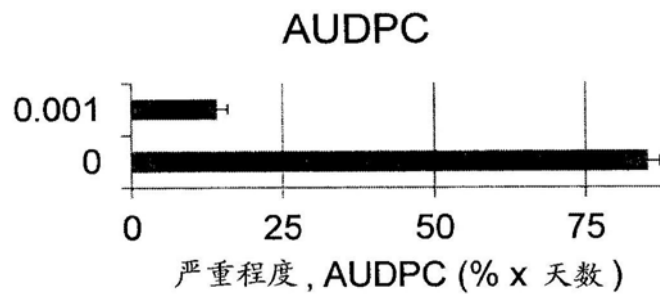


图16A

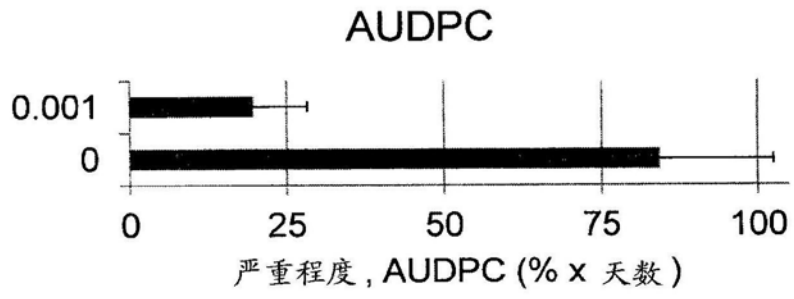


图16B

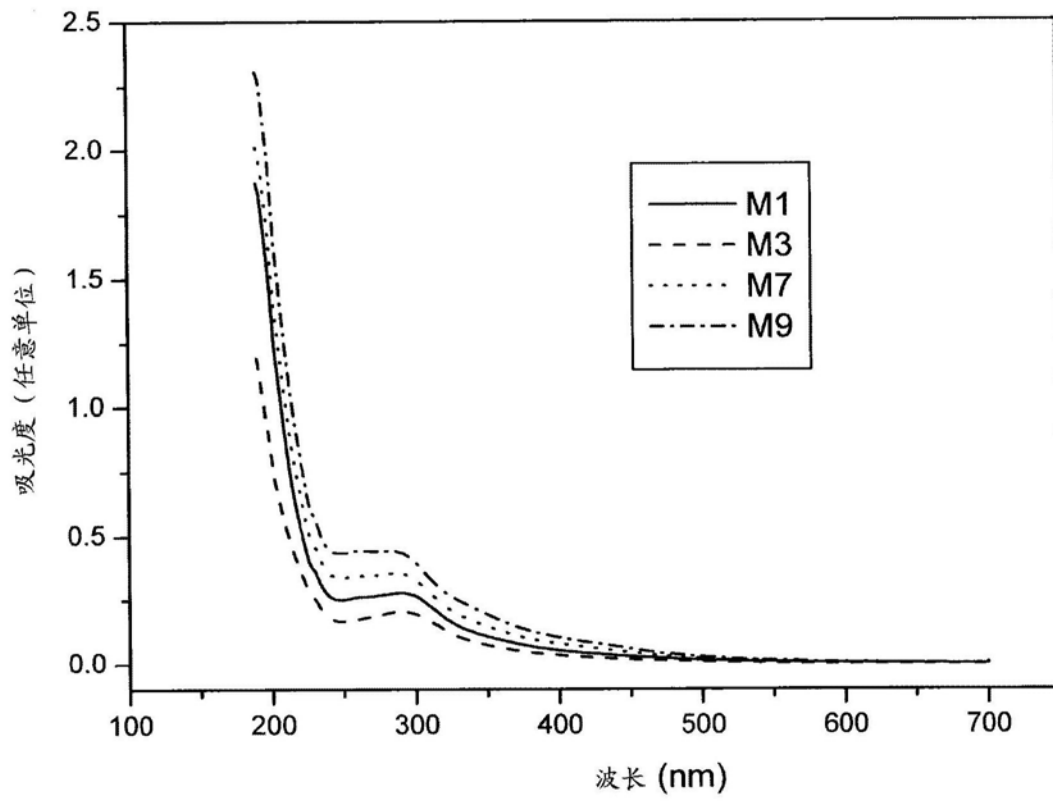


图17

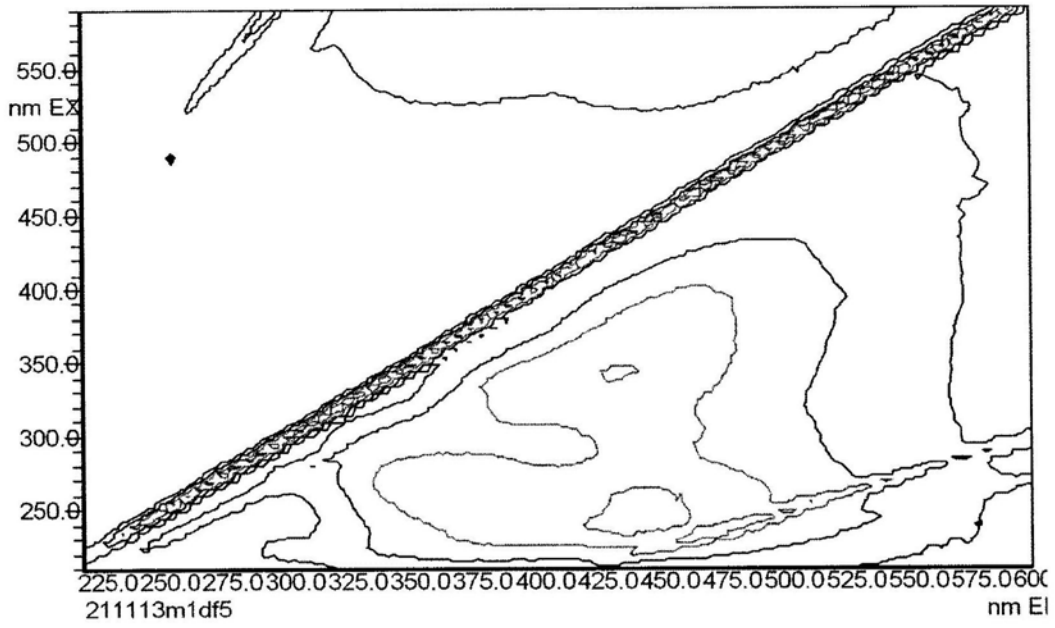


图18A

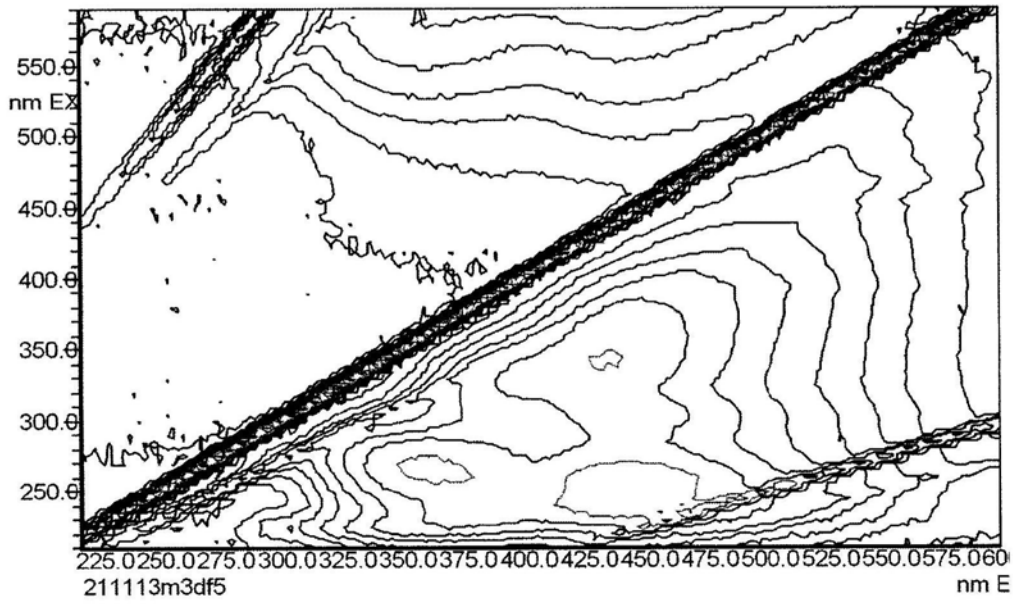


图18B



图18C

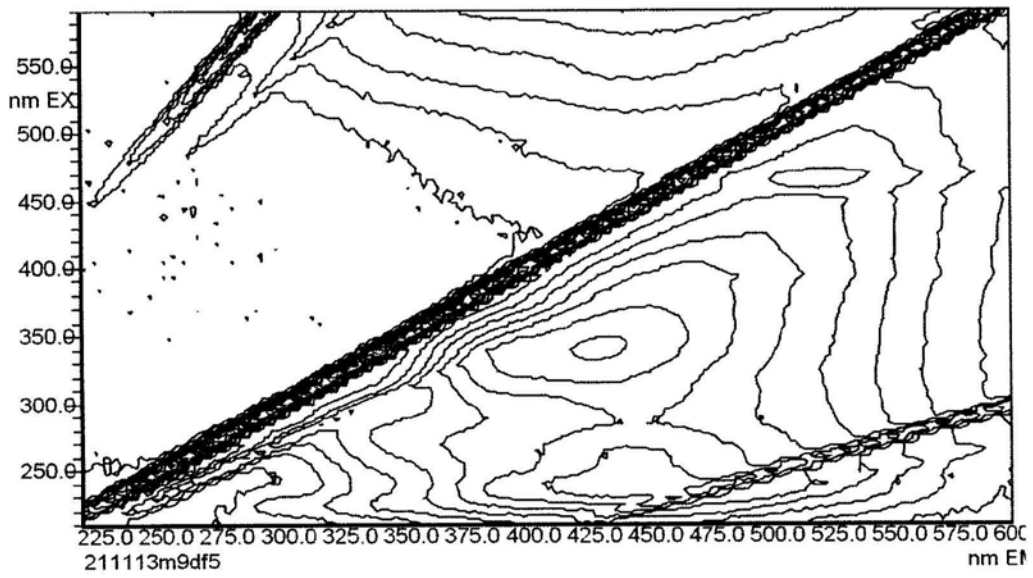


图18D

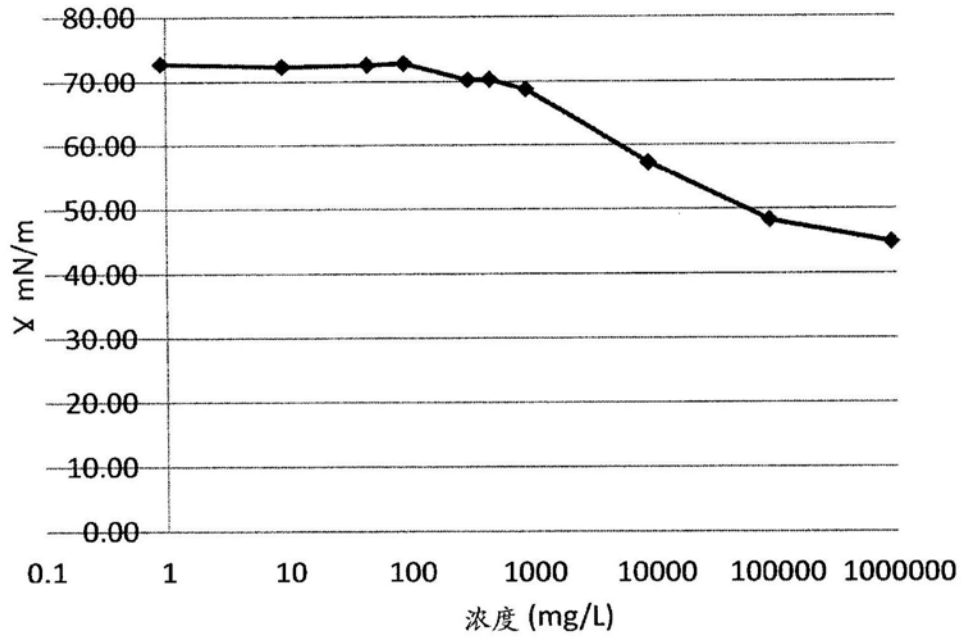


图19

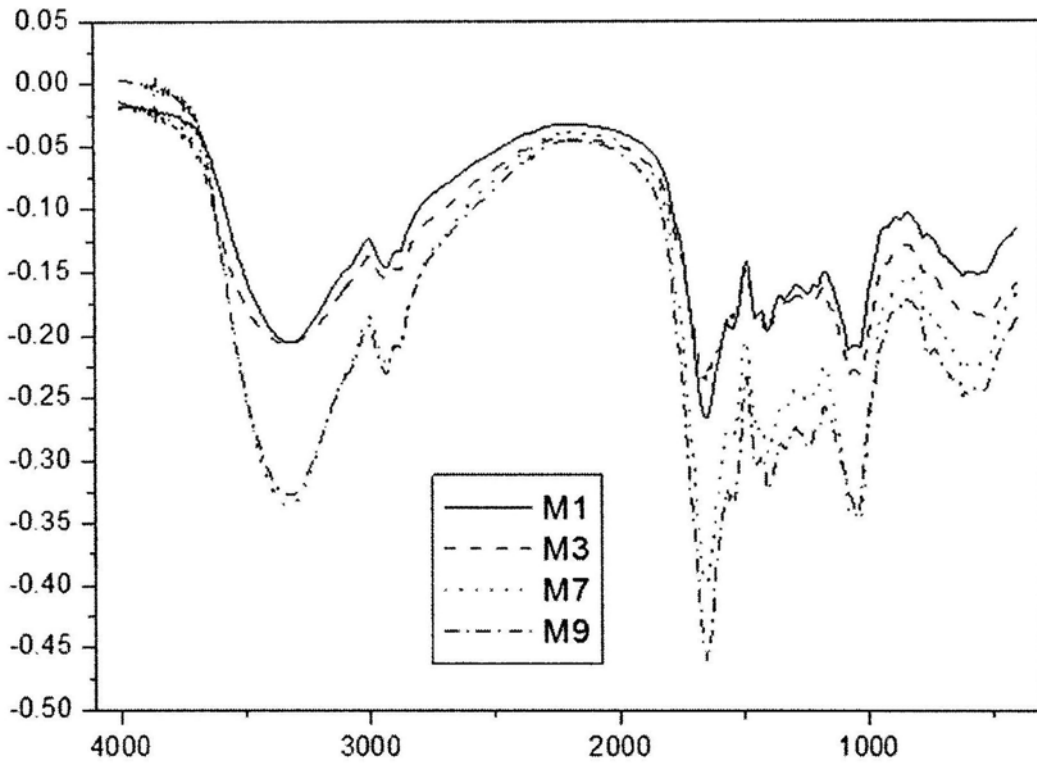


图20