(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114554853 A
(43)申请公布日 2022.05.27

(21)申请号 202080070665.3

(22)申请日 2020.08.07

(30)优先权数据
62/885,114 2019.08.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.04.07

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/045426 2020.08.07

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/030195 EN 2021.02.18

(71)申请人 博思特生物群落公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 维罗妮卡·加西亚
索菲亚·安德里科普洛斯
詹斯纳·佛罗兰德
凯利·特立尼达
克里斯蒂·皮亚蒙特
詹姆斯·皮尔斯 杰米·巴彻

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 韦昌金 武晶晶

(51)Int.Cl.
A01N 63/20(2020.01)
A01N 63/32(2020.01)
A01N 63/22(2020.01)
A01N 63/27(2020.01)
A01P 3/00(2006.01)
A23B 7/155(2006.01)
A01G 7/06(2006.01)
A01H 17/00(2006.01)
A01H 3/00(2006.01)

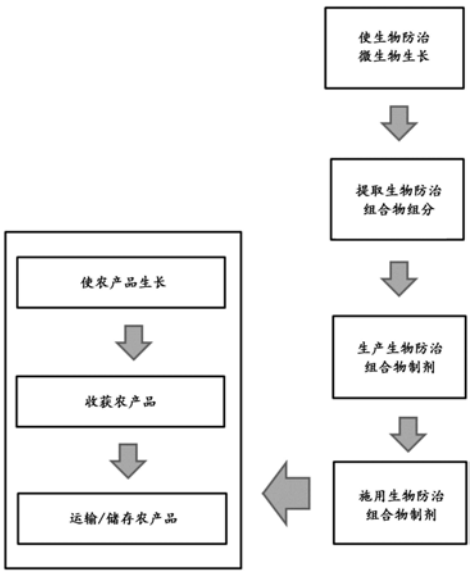
权利要求书4页 说明书30页 附图10页

(54)发明名称

用于植物以预防或减少真菌病原体的微生物组合物

(57)摘要

本文公开了针对植物真菌病原体的生物防治组合物及其用于预防或减少作物损失或食物腐败的方法。所述生物防治组合物可包含至少一种微生物,或所述至少一种微生物的次级代谢物,具有抗真菌或抗病原活性。本文公开的方法和组合物可以预防或抑制多种不同病原体的生长,包括青霉菌属病原体。所述生物防治组合物可施用于植物、种子或其农产品或用于运输或储存农产品的包装材料。



CN 114554853 A

1.一种生物防治组合物,其包含:

(i)至少一种微生物,或所述至少一种微生物产生的代谢物,和

(ii)载体,

其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23的16S rRNA序列具有大于99%同一性的16S rRNA序列,并且其中与未暴露于所述生物防治组合物的对照相比,所述生物防治组合物能够抑制青霉菌属种的生长。

2.根据权利要求1所述的生物防治组合物,其中至少一种微生物包含的所述16S rRNA序列与SEQ ID NO:1的16S rRNA序列具有大于99%的同一性。

3.根据权利要求1所述的生物防治组合物,其中所述16S rRNA序列与SEQ ID NO:22的16S rRNA序列具有大于99%的同一性。

4.根据权利要求1所述的生物防治组合物,其中所述16S rRNA序列与SEQ ID NO:23的16S rRNA序列具有大于99%的同一性。

5.一种生物防治组合物,其包含:

(i)至少一种微生物,或所述至少一种微生物产生的代谢物,和

(ii)载体,

其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:24的16S rRNA序列具有大于90%同一性的16S rRNA序列,或其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:25的内部转录间隔区(ITS)序列具有大于90%同一性的ITS序列,其中与未暴露于所述生物防治组合物的对照相比,所述生物防治组合物能够抑制青霉菌属种的生长。

6.根据权利要求5所述的生物防治组合物,其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:24的16S rRNA序列具有大于90%同一性的所述16S rRNA序列。

7.根据权利要求5所述的生物防治组合物,其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:24的16S rRNA序列具有大于99%同一性的所述16S rRNA序列。

8.根据权利要求5所述的生物防治组合物,其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:25的内部转录间隔区(ITS)序列具有大于90%同一性的ITS序列。

9.根据权利要求5所述的生物防治组合物,其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:25的内部转录间隔区(ITS)序列具有大于99%同一性的ITS序列。

10.根据权利要求5所述的生物防治组合物,其中所述至少一种微生物为至少两种微生物,其包含含有与SEQ ID NO:24的所述16SrRNA序列具有大于90%同一性的所述16S rRNA序列的第一微生物和含有与SEQ ID NO:25的所述ITS序列具有大于90%同一性的所述ITS序列的第二微生物。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的生物防治组合物,其中与未暴露于所述生物防治组合物的所述对照相比,所述青霉菌属种的生长抑制通过所述生物防治组合物所针对的农产品中的损伤大小或组织坏死的减少来显示。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的生物防治组合物,其中相对于未暴露于所述生物防治组合物的对照,所述生物防治组合物能够将所述青霉菌属种的生长抑制5%或更多。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的生物防治组合物,其中相对于未暴露于所述生物防治组合物的对照,所述生物防治组合物能够将所述青霉菌属种的生长抑制10%或更多。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的生物防治组合物，其中相对于未暴露于所述生物防治组合物的对照，所述生物防治组合物能够将所述青霉菌属种的生长抑制20％或更多。

15.根据权利要求1-13中任一项所述的生物防治组合物，其中相对于未暴露于所述生物防治组合物的对照，所述生物防治组合物能够将所述青霉菌属种的生长抑制25％或更多。

16.根据权利要求1-13中任一项所述的生物防治组合物，其中所述青霉菌是扩展青霉菌。

17.根据权利要求1-13中任一项所述的生物防治组合物，其中所述青霉菌是指状青霉菌。

18.根据权利要求1-17中任一项所述的生物防治组合物，其中所述生物防治组合物包含营养细胞。

19.根据权利要求1-17中任一项所述的生物防治组合物，其中所述生物防治组合物包含孢子。

20.根据权利要求1-19中任一项所述的生物防治组合物，其中所述载体选自：油、水、蜡、树脂、高岭土、硅藻土或谷物粉。

21.根据权利要求1-19中任一项所述的生物防治组合物，其中所述载体是水。

22.根据权利要求1-21中任一项所述的生物防治组合物，其中所述生物防治组合物配制成液体形式。

23.根据权利要求1-21中任一项所述的生物防治组合物，其中所述生物防治组合物配制成固体形式。

24.根据权利要求1-21中任一项所述的生物防治组合物，其中所述生物防治组合物配制成粉末形式。

25.一种减少或预防病原体在植物、种子、花或其农产品上生长的方法，其包括：将前述权利要求中任一项所述的生物防治组合物施用于所述植物、种子、花或其农产品。

26.一种减少或预防病原体在植物、种子、花或其农产品上生长的方法，其包括：将前述权利要求中任一项所述的生物防治组合物施用于与所述植物、种子、花或其农产品邻近的对象或区域。

27.根据权利要求25-26中任一项所述的方法，其中所述施用在收获所述植物、种子、花或农产品之前进行。

28.根据权利要求25-26中任一项所述的方法，其中所述施用在收获所述植物、种子、花或农产品之后进行。

29.根据权利要求26所述的方法，其中与所述植物邻近的所述区域包括用于使所述植物、种子、花或其农产品生长的土壤。

30.根据权利要求26所述的方法，其中与所述植物邻近的所述对象包括用于储存或运输所述植物、种子、花或农产品的包装。

31.根据权利要求25-30中任一项所述的方法，其中所述施用通过喷洒所述生物防治组合物进行。

32.根据权利要求25、27-28中任一项所述的方法，其中所述施用通过将植物、种子、花

或农产品浸入所述生物防治组合物中进行。

33.根据权利要求25-32中任一项所述的方法，其中所述植物选自：扁桃、杏、苹果、朝鲜蓟、香蕉、大麦、甜菜、黑莓、蓝莓、西兰花、抱子甘蓝、卷心菜、大麻、芸苔、辣椒、胡萝卜、芹菜、菩茎菜、樱桃、柑橘、玉米、葫芦、海枣、无花果、亚麻、大蒜、葡萄、香草、香料、羽衣甘蓝、莴苣、薄荷、油棕、橄榄、洋葱、豌豆、梨、桃、花生、木瓜、欧洲防风、美洲山核桃、柿子、李子、石榴、马铃薯、榲桲、小萝卜、覆盆子、玫瑰、水稻、黑刺李、高粱、大豆、菠菜、草莓、甘薯、烟草、番茄、芜菁、胡桃和小麦。

34.根据权利要求25-33中任一项所述的方法，其中所述植物是苹果。

35.根据权利要求25-32中任一项所述的方法，其中所述植物为苹果属的成员。

36.根据权利要求25-32中任一项所述的方法，其中所述植物为柑橘属的成员。

37.根据权利要求33所述的方法，其中所述柑橘包含桔子、柠檬、酸橙、脐橙、柚子或其杂种。

38.一种抑制病原体生长的方法，其包括：

将生物防治组合物施用于苹果，其中所述生物防治组合物包含：

(i)至少一种微生物，或所述至少一种微生物产生的代谢物，和

(ii)载体，

其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23的16S rRNA序列具有大于99％同一性的16S rRNA序列，并且其中与未暴露于所述生物防治组合物的对照相比，所述生物防治组合物能够抑制扩展青霉菌的生长。

39.根据权利要求38所述的方法，其中至少一种微生物包含的所述16S rRNA序列与SEQ ID NO:1的16S rRNA序列具有大于99％的同一性。

40.根据权利要求38所述的方法，其中所述16S rRNA序列与SEQ ID NO:22的16S rRNA序列具有大于99％的同一性。

41.根据权利要求38所述的方法，其中所述16S rRNA序列与SEQ ID NO:23的16S rRNA序列具有大于99％的同一性。

42.一种抑制病原体生长的方法，其包括：

将生物防治组合物施用于苹果，其中所述生物防治组合物包含：

(i)第一微生物和第二微生物，或由所述第一微生物或所述第二微生物产生的代谢物，和

(ii)载体，

其中所述第一微生物包含与SEQ ID NO:24的所述16S rRNA序列具有大于90％同一性的所述16S rRNA序列，并且所述第二微生物包含与SEQ ID NO:25的所述ITS序列具有大于90％同一性的所述ITS序列，并且其中相对于未暴露于所述生物防治组合物的对照，所述生物防治组合物能够抑制扩展青霉菌的生长。

43.根据权利要求42所述的方法，其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:24的16S rRNA序列具有大于90％同一性的所述16SrRNA序列。

44.根据权利要求42所述的方法，其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:24的16S rRNA序列具有大于99％同一性的所述16SrRNA序列。

45.根据权利要求42所述的方法，其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:25的内

部转录间隔区(ITS)序列具有大于90%同一性的ITS序列。

46.根据权利要求42所述的方法,其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:25的内部转录间隔区(ITS)序列具有大于99%同一性的ITS序列。

47.一种抑制病原体生长的方法,其包括:

将生物防治组合物施用于柑橘植物,其中所述生物防治组合物包含:

(i)至少一种微生物,或所述至少一种微生物产生的代谢物,和

(ii)载体,

其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23的16S rRNA序列具有大于99%同一性的16S rRNA序列,并且其中与未暴露于所述生物防治组合物的对照相比,所述生物防治组合物能够抑制扩展青霉菌菌种的生长。

48.根据权利要求43所述的方法,其中至少一种微生物包含的所述16S rRNA序列与SEQ ID NO:1的16S rRNA序列具有大于99%的同一性。

49.根据权利要求43所述的方法,其中所述16S rRNA序列与SEQ ID NO:22的16S rRNA序列具有大于99%的同一性。

50.根据权利要求43所述的方法,其中所述16S rRNA序列与SEQ ID NO:23的16S rRNA序列具有大于99%的同一性。

51.一种抑制病原体生长的方法,其包括:

将生物防治组合物施用于柑橘植物,其中所述生物防治组合物包含:

(i)第一微生物和第二微生物,或由所述第一微生物或所述第二微生物产生的代谢物,和

(ii)载体,

其中所述第一微生物包含与SEQ ID NO:24的所述16S rRNA序列具有大于90%同一性的所述16S rRNA序列,并且所述第二微生物包含与SEQ ID NO:25的所述ITS序列具有大于90%同一性的所述ITS序列,并且其中相对于未暴露于所述生物防治组合物的对照,所述生物防治组合物能够抑制扩展青霉菌菌种的生长。

52.根据权利要求51所述的方法,其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:24的16S rRNA序列具有大于90%同一性的所述16SrRNA序列。

53.根据权利要求51所述的方法,其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:24的16S rRNA序列具有大于99%同一性的所述16SrRNA序列。

54.根据权利要求51所述的方法,其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:25的内部转录间隔区(ITS)序列具有大于90%同一性的ITS序列。

55.根据权利要求51所述的方法,其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:25的内部转录间隔区(ITS)序列具有大于99%同一性的ITS序列。

用于植物以预防或减少真菌病原体的微生物组合物

交叉引用

[0001] 本申请要求于2019年8月9日提交的美国临时申请号62/885,114的优先权,其通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0002] 真菌病原体造成重大的农业损失,导致作物损失、食物浪费和经济损失。具有抗真菌特性的微生物已经被开发作为生物防治剂,以减少由这些真菌病原体造成的作物损失和食物腐败。市售产品可能未显示出期望的植物或真菌特异性或有效性。此外,对于农产品,尤其是有机农产品的采后保护存在有限的选择。阻止真菌生长的生物防治组合物可以提供目前可用产品的替代品。

发明内容

[0003] 在一个方面,本公开内容提供了一种生物防治组合物,其包含:(i)至少一种微生物或至少一种微生物产生的代谢物,以及(ii)载体,其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23的16S rRNA序列具有大于99%同一性的16S rRNA序列,并且其中与未暴露于所述生物防治组合物的对照相比,所述生物防治组合物能够抑制青霉菌属种的生长。在一些实施方案中,所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:1的16S rRNA序列具有大于99%同一性的16S rRNA序列。在一些实施方案中,16S rRNA序列与SEQ ID NO:22的16S rRNA序列具有大于99%的同一性。在一些实施方案中,16S rRNA序列与SEQ ID NO:23的16S rRNA序列具有大于99%的同一性。

[0004] 在一个方面,本公开内容提供了一种生物防治组合物,其包含:(i)至少一种微生物或至少一种微生物产生的代谢物,以及(ii)载体,其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:24的16S rRNA序列具有大于90%同一性的16S rRNA序列,或其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:25的内部转录间隔区(ITS)序列具有大于90%同一性的ITS序列,其中与未暴露于所述生物防治组合物的对照相比,所述生物防治组合物能够抑制青霉菌属种的生长。在一些实施方案中,所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:24的16S rRNA序列具有大于90%同一性的16S rRNA序列。在一些实施方案中,所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:24的16S rRNA序列具有大于99%同一性的16S rRNA序列。在一些实施方案中,所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:25的内部转录间隔区(ITS)序列具有大于90%同一性的ITS序列。在一些实施方案中,所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:25的内部转录间隔区(ITS)序列具有大于99%同一性的ITS序列。在一些实施方案中,所述至少一种微生物为至少两种微生物,其包含含有与SEQ ID NO:24的16S rRNA序列具有大于90%同一性的16S rRNA序列的第一微生物和含有与SEQ ID NO:25的ITS序列具有大于90%同一性的ITS序列的第二微生物。在一些实施方案中,与未暴露于生物防治组合物的对照相比,青霉菌属种的生长抑制通过生物防治组合物所针对的农产品中的损伤大小或组织坏死的减少显示。在一些实施方案中,相对于未暴露于生物防治组合物的对照,生物防治组合物能够将青霉菌属

种的生长抑制5％或更多。在一些实施方案中，相对于未暴露于生物防治组合物的对照，生物防治组合物能够将青霉菌属种的生长抑制25％或更多。在一些实施方案中，青霉菌属为扩展青霉菌属。在一些实施方案中，青霉菌属为指状青霉菌(Penicillium digitatum)。在一些实施方案中，生物防治组合物包含营养细胞。在一些实施方案中，生物防治组合物包含孢子。在一些实施方案中，载体选自：油、水、蜡、树脂、高岭土、硅藻土或谷物粉。在一些实施方案中，载体是水。在一些实施方案中，将生物防治组合物配制成液体形式。在一些实施方案中，将生物防治组合物配制成液体形式。在一些实施方案中，将生物防治组合物配制成粉末形式。

[0005] 在另一方面，本公开内容提供一种减少或预防病原体在植物、种子、花或其农产品上生长的方法，包括：将生物防治组合物施用于植物、种子、花或其农产品。

[0006] 在另一方面，本公开内容提供一种减少或预防病原体在植物、种子、花或其农产品上生长的方法，包括：将生物防治组合物施用于与植物、种子、花或其农产品邻近的对象或区域。在一些实施方案中，在收获植物、种子、花或农产品之前进行施用。在一些实施方案中，在收获植物、种子、花或农产品之后进行施用。在一些实施方案中，与植物邻近的区域包括用于使植物、种子、花或其农产品生长的土壤。在一些实施方案中，与植物邻近的对象包括用于储存或运输植物、种子、花或农产品的包装。在一些实施方案中，通过喷洒生物防治组合物进行施用。在一些实施方案中，通过将植物、种子、花或农产品浸入生物防治组合物中进行施用。在一些实施方案中，植物选自：扁桃、杏、苹果、朝鲜蓟、香蕉、大麦、甜菜、黑莓、蓝莓、西兰花、抱子甘蓝、卷心菜、大麻、芸苔、辣椒、胡萝卜、芹菜、碧芰菜、樱桃、柑橘、玉米、葫芦、海枣、无花果、亚麻、大蒜、葡萄、香草、香料、羽衣甘蓝、莴苣、薄荷、油棕、橄榄、洋葱、豌豆、梨、桃、花生、木瓜、欧洲防风、美洲山核桃、柿子、李子、石榴、马铃薯、榲桲、小萝卜、覆盆子、玫瑰、水稻、黑刺李、高粱、大豆、菠菜、草莓、甘薯、烟草、番茄、芜菁、胡桃和小麦。在一些实施方案中，植物为苹果。在一些实施方案中，植物为苹果属的成员。在一些实施方案中，植物为柑橘属的成员。在一些实施方案中，柑橘包含桔子、柠檬、酸橙、脐橙、柚子或其杂种。

[0007] 在另一方面，本公开内容提供了一种抑制病原体生长的方法，包括：将生物防治组合物施用于苹果，其中所述生物防治组合物包含：(i)至少一种微生物或由至少一种微生物产生的代谢物，以及(ii)载体，其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23的16S rRNA序列具有大于99％同一性的16S rRNA序列，并且其中与未暴露于所述生物防治组合物的对照相比，所述生物防治组合物能够抑制扩展青霉菌菌种的生长。

[0008] 在另一方面，本公开内容提供了一种抑制病原体生长的方法，包括：将生物防治组合物施用于苹果，其中所述生物防治组合物包含：(i)第一微生物和第二微生物，或所述第一微生物或第二微生物产生的代谢物，以及(ii)载体，其中所述第一微生物包含与SEQ ID NO:24的16S rRNA序列具有大于90％同一性的16S rRNA序列并且所述第二微生物包含与SEQ ID NO:25的ITS序列具有大于90％同一性的ITS序列，并且其中与未暴露于所述生物防治组合物的对照相比，所述生物防治组合物能够抑制扩展青霉菌菌种的生长。在另一方面，本公开内容提供了一种抑制病原体生长的方法，包括：将生物防治组合物施用于柑橘植物，其中所述生物防治组合物包含：(i)至少一种微生物或由至少一种微生物产生的代谢物，以及(ii)载体，其中所述至少一种微生物包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23

的16S rRNA序列具有大于99％同一性的16S rRNA序列，并且其中与未暴露于所述生物防治组合物的对照相比，所述生物防治组合物能够抑制扩展青霉菌菌种的生长。

[0009] 在另一方面，本公开内容提供了一种抑制病原体生长的方法，包括：将生物防治组合物施用于柑橘植物，其中所述生物防治组合物包含：(i)第一微生物和第二微生物，或所述第一微生物或第二微生物产生的代谢物，以及(ii)载体，其中所述第一微生物包含与SEQ ID NO:24的16S rRNA序列具有大于90％同一性的16S rRNA序列，并且所述第二微生物包含与SEQ ID NO:25的ITS序列具有大于90％同一性的ITS序列，并且其中与未暴露于所述生物防治组合物的对照相比，所述生物防治组合物能够抑制扩展青霉菌菌种的生长。

[0010] 本公开内容的另一方面提供了一种包括机器可执行代码的非暂时性计算机可读介质，所述机器可执行代码在由一个或多个计算机处理器执行时实现上文或本文别处的任何方法。

[0011] 本公开内容的另一方面提供了一种系统，其包括一个或多个计算机处理器和与其耦联的计算机存储器。所述计算机存储器包括机器可执行代码，所述机器可执行代码在由一个或多个计算机处理器执行时实现上文或本文别处的任何方法。

[0012] 通过以下详细描述，本公开内容的其他方面和优点对于本领域技术人员将变得明显，其中仅显示和描述了本公开内容的说明性实施方案。如将认识到的，本公开内容能够具有其他不同的实施方案，并且其若干细节能够在各明显方面进行修改，所有这些均不背离本公开内容。因此，附图和描述本质上应被认为是说明性的，而不是限制性的。

援引并入

[0013] 本说明书中所提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文，其程度如同具体地和单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请的整体均通过引用而并入。只要通过引用并入的出版物和专利或专利申请与本说明书中包含的公开内容相矛盾，说明书旨在取代和/或优先于任何此类矛盾的材料。

附图说明

[0014] 在所附权利要求书中具体阐述了本发明的新颖特征。通过参考以下对利用本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述和附图，将会获得对本发明的特征和优点的更好的理解，在这些附图(本文中也称为“图”)中：

[0015] 图1示出了使用和产生生物防治组合物的方法的示意图。

[0016] 图2图示了经处理和未处理的富士(Fuji)和嘎啦(Gala)苹果的平均损伤大小。

[0017] 图3图示了经处理和未处理的富士和嘎啦苹果的苹果腐烂。

[0018] 图4A-图4B图示了经处理和未处理的富士苹果的平均损伤大小和平均坏死重量。

[0019] 图5图示了感染后6天的富士苹果。

[0020] 图6A-图6B图示了经处理和未处理的嘎啦苹果的平均损伤大小和平均坏死重量。

[0021] 图7图示了感染后6-7天的嘎啦苹果。

[0022] 图8A示出了生物防治组合物的铺板位置(plating location)的示意图。图8B示出了生物防治组合物在柑橘培养基板上生长的照片。

[0023] 图9示出了柑橘培养基板上指状青霉菌的抑制的照片。

[0024] 图10示出了柑橘培养基板上指状青霉菌的抑制的照片。

具体实施方式

[0025] 尽管本文已经示出和描述了本发明的各种实施方案，但是对于本领域技术人员明显的是，这些实施方案仅作为示例提供。在不背离本发明的情况下，本领域技术人员可以想到许多变化、改变和替换。应理解，可采用本文所述的本发明实施方案的各种替代方案。

[0026] 本文提供了用于植物上用于预防或减少病原体的微生物、微生物聚生体或微生物集合的组合物、制剂及其使用方法。本文所述的组合物、制剂和方法还涉及用于在植物上用于预防或减少病原体的产生自或包含微生物、微生物聚生体或微生物集合的上清液或培养组合物。这些组合物可称为生物防治组合物。特别地，组合物和制剂及其使用方法可对真菌病原体有效。真菌病原体可以是青霉菌属的成员。例如，真菌病原体可以是扩展青霉菌，也称为青霉(Blue Mold)。在另一个实例中，真菌病原体可以是指状青霉菌。真菌病原体可以是灰葡萄孢菌(Botrytis cinerea)。

[0027] 植物可以是花、种子或农产品。植物、花、种子或其农产品可以是扁桃、杏、苹果、朝鲜蓟、香蕉、大麦、甜菜、黑莓、蓝莓、西兰花、抱子甘蓝、卷心菜、大麻、芸苔、辣椒、胡萝卜、芹菜、菩茎菜、樱桃、柑橘、玉米、葫芦、海枣、无花果、亚麻、大蒜、葡萄、香草、香料、羽衣甘蓝、莴苣、薄荷、油棕、橄榄、洋葱、豌豆、梨、桃、花生、木瓜、欧洲防风、美洲山核桃、柿子、李子、石榴、马铃薯、榲桲、小萝卜、覆盆子、玫瑰、水稻、黑刺李、高粱、大豆、菠菜、草莓、甘薯、烟草、番茄、芜菁、胡桃和小麦。植物可以是柑橘属或苹果属的成员。例如，植物可以是桔子、柠檬或脐橙。植物可以是苹果。植物可以是特定的栽培品种。例如，苹果可以是富士苹果。

[0028] 微生物聚生体的选择

[0029] 可以使用用于鉴定或选择包含微生物聚生体的生物防治组合物的方法。例如，可以使用如美国专利公开号20180127796中公开的方法用于鉴定或选择微生物聚生体。在一些情况下，多种微生物可以一起生长。在一些情况下，所述方法可以包括稀释样品以形成多个稀释物，其中多个稀释物中的稀释物包括多种微生物的子集。稀释物可以生成多个子集，其中使多种微生物的不同微生物相互作用。可以对多种微生物的子集进行培养，使得微生物可以增殖。可以对子集进行测序反应，使得可以获得微生物的序列。从测序反应中，可以获得菌种、菌株或其他分类学信息。鉴定特定微生物的序列在本文其他地方讨论。子集可以经受不同的培养时间，使得可以在不同的时间进行测序反应，以监测特定菌种、菌株或其他分类学类别的存在和/或相对丰度。通过观测特定菌种、菌株或其它分类学类别的存在和/或相对丰度的变化，可以确定多种微生物之间的相互作用。例如，与不和第二微生物一起培养时的相对丰度相比，第一微生物与第二微生物一起培养时可能具有更高的相对丰度。在该实例中，第一微生物可能与第二微生物相互作用使得第一微生物的总体生存能力提高。可以各自对多个稀释物进行测序反应，使得可以鉴定每个稀释物的微生物，并且可允许多重、高通量方法。

[0030] 可以稀释多种微生物，使得多种微生物的子集一起生长。在一些情况下，可以进行系列稀释多种微生物以形成样品的多个系列稀释物。样品的多个系列稀释物中的微生物可能是由于分散或偶然性造成的。在不同的实施方案中，多个系列稀释物可以是不同的。在一些实施方案中，样品的多个系列稀释物可以包括或者是约1:10、1:100、1:1000、1:10000、1:100000、1:1000000、1:10000000、1:100000000、1:1000000000或者这些值中的任何两个之间的数值或范围的样品稀释物。在一些实施方案中，样品的多个系列稀释物可以包括至少

或至多1:10、1:100、1:1000、1:10000、1:100000、1:1000000、1:10000000、1:100000000或1:1000000000的样品稀释物。例如,可以使用例如缓冲液将样品稀释10倍形成1:10样品稀释物。可以将1:10样品稀释物稀释10倍形成1:100样品稀释物。多个系列稀释物可以包括1:10样品稀释物、1:100样品稀释物以及类似地制备的其他样品稀释物。作为另一实例,可以使用例如缓冲液将样品稀释10倍形成1:10样品稀释物。可以将样品稀释100倍形成1:100样品稀释物。多个系列稀释物可以包括1:10样品稀释物、1:100样品稀释物以及类似地制备的其他样品稀释物。

[0031] 在一些实施方案中,在第一培养条件下培养多个样品稀释物包括在第一培养条件下以多个持续时间培养多个样品稀释物,持续时间可以在小至一分钟、多至一年的范围内变化。

[0032] 可以对多种微生物进行测序反应,并且可以鉴定特定的微生物。在培养子集持续一段时间后,子集中每种微生物的总百分比表示可以从培养开始时的百分比改变。例如,在培养的不同时期之后,在其他微生物中保持存活的微生物可以表明培养物的微生物之间的共生关系或相互作用,并且这些微生物可以形成微生物聚生体。可以通过与本文其他地方所述的用于鉴定至少一种微生物的功效的方法类似的方式测试微生物聚生体抑制真菌病原体生长的功效。

[0033] 特定微生物的分离也可用于本文其他地方所述的方法或组合物。例如,可以对多种微生物进行系列稀释,使得可以分离出特定微生物的菌落。可以各自在液体、半固体或固体培养基中培养系列稀释物。在诸如琼脂平板的半固体或固体培养基上,多种微生物可以形成菌落。菌落能够很好地分散,因此菌落可以包含单个菌株或微生物菌种。也可以使用诸如离心法的物理分离方法来进行特定微生物的分离。例如,可以在液体培养基中培养多种微生物并离心,从而将微生物从培养物中分离。也可以使用特定的生长条件分离特定的微生物。例如,当在厌氧条件下培养时,特定的微生物与另一种微生物相比可能具有更高的生存能力。当在富含特定营养物的培养基中培养时,特定的微生物与另一种微生物相比可能具有高的生存能力。

用于预防或减少作物损失和食物腐败的组合物

[0034] 本文公开了能够预防或减少真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长的生物防治组合物。术语“农产品”在本文中可以用于指植物的可食用部分,例如叶、茎、种子、根、花或果实。在本文中术语“植物”可以用于指植物的任何部分,例如叶、茎、种子、根或果实。预防或减少真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长可以减少在从植物收获农产品之前、期间或之后的作物损失和食物腐败。

[0035] 至少一种微生物可以是细菌或酵母。至少一种微生物可以包括来自选自以下属的微生物:芽孢杆菌属(Bacillus)、伯克氏菌属(Burkholderia)、Cutaneotrichosporon、Cyberlindnera、葡糖醋杆菌属(Gluconacetobacter)、葡糖酸杆菌属(Gluconobacter)、有孢汉逊酵母属(Hanseniaspora)、Paraburkholderia、假单胞菌属(Pseudomonas)、有孢圆酵母属(Torulaspora)及其任何组合。

[0036] 至少一种微生物可以包括选自以下的微生物:解淀粉芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、贝莱斯芽孢杆菌(Bacillus velezensis)、Cutaneotrichosporon jirovecii、Cutaneotrichosporon moniliiforme、

Cutaneotrichosporon mucoides、拟威尔嗜杀酵母(Cyberlindnera mrakii)、Cyberlindnera saturnus、产液葡糖醋杆菌(Gluconacetobacter liquefaciens)、蜡色葡糖杆菌(Gluconobacter cerinus)、葡萄汁有孢汉逊酵母(Hanseniaspora uvarum)、Paraburkholderia phytofirmans、荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens)、腓特烈斯贝假单胞菌(Pseudomonas frederiksbergensis)、亚麻假单胞菌(Pseudomonas lini)、米氏假单胞菌(Pseudomonas migulae)、戴尔凯氏有孢圆酵母(Torulaspora delbrueckii)及其任何组合。

[0037] 至少一种微生物可以是来自芽孢杆菌属的微生物。至少一种微生物可以是来自伯克氏菌属的微生物。至少一种微生物可以是来自Cutaneotrichosporon属的微生物。至少一种微生物可以是来自Cyberlindnera属的微生物。至少一种微生物可以是来自葡糖醋杆菌属的微生物。至少一种微生物可以是来自葡糖酸杆菌属的微生物。至少一种微生物可以是来自有孢汉逊酵母属的微生物。至少一种微生物可以是来自Paraburkholderia属的微生物。至少一种微生物可以是来自假单胞菌属的微生物。至少一种微生物可以是来自有孢圆酵母属的微生物。

[0038] 至少一种微生物可以是解淀粉芽孢杆菌。至少一种微生物可以是枯草芽孢杆菌。至少一种微生物可以是贝莱斯芽孢杆菌。至少一种微生物可以是Cutaneotrichosporon jivrovecii。至少一种微生物可以是Cutaneotrichosporon moniliiforme。至少一种微生物可以是Cutaneotrichosporon mucoides。至少一种微生物可以是拟威尔嗜杀酵母。至少一种微生物可以是Cyberlindnera saturnus。至少一种微生物可以是产液葡糖醋杆菌。至少一种微生物可以是蜡色葡糖杆菌。至少一种微生物可以是葡萄汁有孢汉逊酵母。至少一种微生物可以是Paraburkholderia phytofirmans。至少一种微生物可以是Paraburkholderia fluroescens。至少一种微生物可以是Paraburkholderia frederiksbergensis。至少一种微生物可以是亚麻假单胞菌。至少一种微生物可以是米氏假单胞菌。至少一种微生物可以是戴尔凯氏有孢圆酵母。

[0039] 至少一种微生物可以包括与选自以下的微生物的rRNA呈至少约70％、75％、80％、85％、87％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物：解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、贝莱斯芽孢杆菌、Cutaneotrichosporon jirovecii、Cutaneotrichosporon moniliiforme、Cutaneotrichosporon mucoides、拟威尔嗜杀酵母、Cyberlindnera saturnus、产液葡糖醋杆菌、蜡色葡糖杆菌、葡萄汁有孢汉逊酵母、Paraburkholderia phytofirmans、荧光假单胞菌、腓特烈斯贝假单胞菌、亚麻假单胞菌、米氏假单胞菌、戴尔凯氏有孢圆酵母及其任何组合。rRNA可以是16S rRNA、23S rRNA、内转录间隔区(ITS)或其组合。至少一种微生物可以是来自一种或多种微生物菌种的微生物菌株的组合。

[0040] 生物防治组合物可以包含：(i)至少一种微生物或至少一种微生物的次级代谢产物，以及(ii)载体，并且其中至少一种微生物具有与选自SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:9的16S rRNA序列呈大于98％同一性的16S rRNA序列，或者其中至少一种微生物具有与选自SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:20的ITS序列呈大于98％同一性的ITS序列，或者其中至少一种微生物具有与SEQ ID NO:18的ITS序列呈大于90％同一性的ITS序列。

[0041] 微生物可以包含与选自以下的序列呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、

97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的RNA序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID 23、SEQ ID 24和SEQ ID 25。

[0042] 生物防治组合物还可以包括第二微生物,其中第二微生物与至少一种微生物不相同。第二微生物可以包含与选自以下的序列呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的RNA序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO 23、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO 25。在一些情况下,第一微生物和第二微生物是相同的菌种。例如,第一微生物和第二微生物可以都是解淀粉芽孢杆菌。在进一步的非限制性实例中,如本文公开的生物防治组合物可以包括第一微生物和第二微生物,以及任选地多于两种微生物、相同菌种的每种不同菌株。在一些情况下,第一微生物和第二微生物不是相同的菌种。例如,第一微生物可以是蜡色葡糖杆菌并且第二微生物可以是葡萄汁有孢汉逊酵母。在一些情况下,第一微生物和第二微生物不是相同的属。在一些情况下,第一微生物和第二微生物不属于相同的科。在一些情况下,第一微生物和第二微生物不属于相同的目。在一些情况下,第一微生物和第二微生物不属于相同的纲。在一些情况下,第一微生物和第二微生物不属于相同的门。在一些情况下,第一微生物和第二微生物不属于相同的界。

[0043] 在一个实施方案中,至少一种微生物包括与来自芽孢杆菌属种的rRNA序列呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。芽孢杆菌属种可以是解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌或贝莱斯芽孢杆菌。rRNA序列可以是16S序列。在一个实施方案中,至少一种微生物包括与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:23呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。

[0044] 在一个实施方案中,至少一种微生物包括与来自葡糖醋杆菌属种的rRNA序列呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。葡糖醋杆菌属种可以是产液葡糖醋杆菌。rRNA序列可以是16S序列。在一个实施方案中,至少一种微生物包括与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ IS NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。

[0045] 在一个实施方案中,至少一种微生物包括与来自葡糖酸杆菌属种的rRNA序列呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。葡糖酸杆菌属种可以是蜡色葡糖杆菌。rRNA序列可以是16S序列。在一个实施方案中,至少一种微生物包括与SEQ ID NO:24呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。

[0046] 在一个实施方案中,至少一种微生物包括与来自伯克氏菌属种或

Paraburkholderia菌种的rRNA序列呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。Paraburkholderia菌种可以是Paraburkholderia phytofirmans。rRNA序列可以是16S序列。在一个实施方案中，至少一种微生物包括与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:9呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。

[0047] 在一个实施方案中，至少一种微生物包括与来自假单胞菌属种的rRNA序列呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。假单胞菌属种可以是荧光假单胞菌、亚麻假单胞菌、米氏假单胞菌或腓特烈斯贝假单胞菌。rRNA序列可以是16S序列。在一个实施方案中，至少一种微生物包括与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:22呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。

[0048] 在一个实施方案中，至少一种微生物包括与SEQ ID NO:8呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。

[0049] 在一个实施方案中，至少一种微生物包括与来自Cyberlindnera菌种的rRNA序列呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。Cyberlindnera菌种可以是Cyberlinderna saturnus或Cyberlindera mrakkii。rRNA序列可以是ITS序列。在一个实施方案中，至少一种微生物包括与SEQ ID NO:17呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。

[0050] 在一个实施方案中，至少一种微生物包括与来自有孢汉逊酵母属种的rRNA序列呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。有孢汉逊酵母属种可以是葡萄汁有孢汉逊酵母。rRNA序列可以是ITS序列。在一个实施方案中，至少一种微生物包括与SEQ ID NO:18或SEQ ID:25呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。在一个实施方案中，至少一种微生物包括与SEQ ID NO:18或SEQ ID:25呈至少90％序列同一性的至少一种微生物。在一个实施方案中，至少一种微生物包括与SEQ ID NO:18或SEQ ID:25呈至少95％序列同一性的至少一种微生物。在一个实施方案中，至少一种微生物包括与SEQ ID NO:18或SEQ ID:25呈至少99％序列同一性的至少一种微生物。

[0051] 在一个实施方案中，至少一种微生物包括与来自有孢圆酵母属种的rRNA序列呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。有孢圆酵母属种可以是戴尔凯氏有孢圆酵母。rRNA序列可以是ITS序列。在一个实施方案中，至少一种微生物包括与SEQ ID NO:19呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。

[0052] 在一个实施方案中，至少一种微生物包括与来自Cutaneotrichosporon菌种的rRNA序列呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同一性的至少一种微生物。Cutaneotrichosporon菌种可以是Cutaneotrichosporon moniliiforme、Cutaneotrichosporon jirovecii或Cutaneotrichosporon mucoides。rRNA序列可以是ITS序列。在一个实施方案中，至少一种微生物包括与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21呈至少约85％、87％、90％、92％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或100％序列同

一性的至少一种微生物。

[0053] 生物防治组合物可以包含包括多种微生物的微生物聚生体。多种微生物可以是至少两种微生物、至少三种微生物、至少四种微生物、至少五种微生物、至少六种微生物、至少七种微生物、至少八种微生物、至少九种微生物或至少十种微生物。多种微生物中的每种微生物可以是不同的微生物。生物防治组合物可以包含来自包括多种微生物的微生物聚生体的次级代谢产物，其中多种微生物是至少两种微生物、至少三种微生物、至少四种微生物、至少五种微生物、至少六种微生物、至少七种微生物、至少八种微生物、至少九种微生物或至少十种微生物。

[0054] 至少两种微生物可以包括选自以下的至少两种微生物：具有选自SEQ ID SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24的16S rRNA序列的微生物以及具有选自SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO 25的ITS序列的微生物。至少两种微生物可以包括具有选自SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:9的16S rRNA序列的第一微生物，或者其中第一微生物具有与选自SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:20的组的ITS序列呈大于98％同一性的ITS序列，或者其中第一微生物具有与SEQ ID NO:18的ITS序列呈大于90％同一性的ITS序列。至少两种微生物可以包括具有与SEQ ID NO:18呈大于90％同一性的ITS序列的第一微生物，并且第二微生物可以是葡糖醋杆菌属种。葡糖醋杆菌属种可以是产液葡糖醋杆菌。葡糖醋杆菌属种可以是具有选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16的16S rRNA序列的葡糖醋杆菌属种。至少两种微生物可以包括葡糖酸杆菌属种的第一微生物和有孢汉逊酵母属种的第二微生物。至少两种微生物可以包括第一微生物蜡色葡糖杆菌和第二微生物葡萄汁有孢汉逊酵母。

[0055] 至少两种微生物可以包括具有与SEQ ID NO:24呈大于90％同一性的16S序列的第一微生物和具有与SEQ ID NO:25呈大于90％同一性的ITS序列的第二微生物。至少两种微生物可以包括具有与SEQ ID NO:24呈大于95％同一性的16S序列的第一微生物和具有与SEQ ID NO:25呈大于95％同一性的ITS序列的第二微生物。至少两种微生物可以包括具有与SEQ ID NO:24呈大于98％同一性的16S序列的第一微生物和具有与SEQ ID NO:25呈大于98％同一性的ITS序列的第二微生物。

[0056] 至少三种微生物可以包括具有与SEQ ID:23呈大于99％同一性的16S rRNA序列的第一微生物、具有与SEQ ID:23呈大于99％同一性的16S rRNA序列的第二微生物、具有与SEQ ID:23呈大于99％同一性的16S rRNA序列的第三微生物，其中第一微生物、第二微生物和第三微生物包含不相同的基因组。在一些情况下，基因组的区别可以在于单核苷酸多态性(SNP)。在一些情况下，基因组的区别可能在于多于一个SNP。在一些情况下，基因组的区别可能在于每个基因组中基因的数量。在一些情况下，基因组的区别可能在于重排(诸如插入、缺失、重排序、重构)或者基因组区域或基因的溶原性或无活性噬菌体、插入序列、重复基因组序列或其他不同的含量。在一些情况下，细胞DNA含量的区别可能在于包含一种或多种质粒，菌株与菌株之间的质粒可能不同。在一些情况下，基因组可以编码基因的不同同种型。例如，如基因表达的蛋白可能含有点突变、缺失、插入，其可能影响蛋白的功能。例如，由

基因表达的蛋白可能含有点突变、缺失、插入，其可能不影响蛋白的功能，或者其可能基本上不影响蛋白的功能。

[0057] 至少三种微生物可以包括选自以下至少三种微生物：具有选自SEQ ID SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的16S rRNA序列的微生物以及具有选自SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:25的ITS序列的微生物。至少三种微生物可以包括具有选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:9或SEQ ID 23的16S rRNA序列或者选自SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20的ITS序列的至少一种微生物。

[0058] 至少四种微生物可以包括选自以下的至少四种微生物：具有选自SEQ ID SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的16S rRNA序列的微生物以及具有选自SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:25的ITS序列的微生物。至少四种微生物可以包括具有选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:23的16S rRNA序列或者选自SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20的ITS序列的至少一种微生物。

[0059] 至少五种微生物可以包括选自以下的至少五种微生物：具有选自SEQ ID SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的16S rRNA序列的微生物以及具有选自SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:25的ITS序列的微生物。至少五种微生物可以包括具有选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:9或SEQ ID 23的16S rRNA序列或者选自SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20的ITS序列的至少一种微生物。

[0060] 表1说明了微生物菌株标识、推定的微生物属或种以及本文所述的相应SEQ ID NO。至少一种微生物可以是表1中的微生物。表2说明了对应于这些SEQ ID NO的序列。

表1.具有抗真菌活性的微生物菌株

微生物菌株标识	推定的微生物属或种	SEQ ID NO.	16S或ITS
28B; BC8	解淀粉芽孢杆菌	SEQ ID NO: 1	16S
74A.1; BC12	产液葡糖醋杆菌	SEQ ID NO: 2	16S
41A2	*Paraburkholderia* 或伯克氏菌属	SEQ ID NO: 3	16S
253A; B253	产液葡糖醋杆菌	SEQ ID NO: 4	16S
254A; B254; BC13	产液葡糖醋杆菌	SEQ ID NO: 5	16S
B125.D, 125B	荧光假单胞菌	SEQ ID NO: 6	16S
41A; F41A	*Paraburkholderia* 或伯克氏菌属	SEQ ID NO: 7	16S
41A.1; F41A.1	未知	SEQ ID NO: 8	16S
41A.2; F41A.2; BC10	*Paraburkholderia* 或伯克氏菌属	SEQ ID NO: 9	16S
B31	亚麻假单胞菌	SEQ ID NO: 10	16S
233B; BC11	产液葡糖醋杆菌	SEQ ID NO: 11	16S
234B; B234	产液葡糖醋杆菌	SEQ ID NO: 12	16S
239B; B239	产液葡糖醋杆菌	SEQ ID NO: 13	16S
B240; BC15	产液葡糖醋杆菌	SEQ ID NO: 14	16S
B125B2; B125.B2	假单胞菌属种	SEQ ID NO: 15	16S
258B; BC14	产液葡糖醋杆菌	SEQ ID NO: 16	16S

1C; BC1	拟威尔嗜杀酵母或 *Cyberlindnera saturnus*	SEQ ID NO: 17	ITS
74.2; BC2	葡萄汁有孢汉逊酵母	SEQ ID NO: 18	ITS
74.3; BC9	戴尔凯氏有孢圆酵母	SEQ ID NO: 19	ITS
125B; B125B1A	*Cutaneotrichosporon moniliiforme*	SEQ ID NO: 20	ITS
125B.1; B125B1	*Cutaneotrichosporon* 或 *Trichosporon*	SEQ ID NO: 21	ITS
BC16	假单胞菌属种	SEQ ID NO: 22	16S
BC17	解淀粉芽孢杆菌	SEQ ID NO: 23	16S
BC18	蜡色葡糖杆菌	SEQ ID NO: 24	16S
BC18	葡萄汁有孢汉逊酵母	SEQ ID NO: 25	ITS

表2.序列

SEQ ID NO	**序列**
SEQ ID NO: 1	CAAGCGTTGTCCGGAATTNTTGGGCGTAAAGGGCTNCGCAGGCGGTTTNCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCT
SEQ ID NO: 2	CGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTATGGACAGTCAGATGTGAAATTCCTGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTCCAAAACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGT

	AGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAG GCGGCAACCTGGCTCATAACTGACGCTGA
SEQ ID NO: 3	CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGT GCGCAGGCGGTTCGCTAAGACAGATGTGA AATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATT TGTGACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAG GGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAA ATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATG GCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGA CGCTCATGCA
SEQ ID NO: 4	AAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTG GGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTATGGAC AGTCAGATGTGAAATTCCTGGGCTTAACCT GGGGGCTGCATTTGATACGTCCAAACTAG AGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAG TGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGA AGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTG GCTCATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGC GTGG
SEQ ID NO: 5	GAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACT GGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTATGGA CAGTCAGATGTGAAATTCCTGGGCTTAACC TGGGGGCTGCATTTGATACGTCCAAACTAG AGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAG TGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGA AGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTG GCTCATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGC GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCC

	GTAGTCCCTGTCTCTTATACACATCTCCGA GCCCACGAGACA
SEQ ID NO: 6	GCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA AAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGG ATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA CTGCATTCAAAACTGTCGAGCTAGAGTATG GTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACAC CAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGAT ACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGA GCAAACAGGATTAGATACCCCCGTAG
SEQ ID NO: 7	GTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGG AATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCG GTTCGCTAAGACAGATGTGAAATCCCCGG GCTTAACCTGGGAACTGCATTTGTGACTGG CGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGA ATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGA GATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCA GCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCA CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA TACCCCCGTAGTCCCTGTCTCTTATACACA TCTCCGAGCCCACGAGACA
SEQ ID NO: 8	GCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA AAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGA TGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC TGCATTCAAAACTGACAAGCTAGAGTATG GTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACAC CAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGAT

	ACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGA GCAAACAGGATTAGATACCCCCGTAGTCC CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACG AGACA
SEQ ID NO: 9	TGTTTTGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGGTGTCAGCAGCCGCGGTAATAC GTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT GGGCGTAAAGCGTGCGCAGGNGNNTCGCT AAGACAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAAC CTGGGAACTGCATTTGTGACTGGCGGGCTA GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCAC GTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGG AGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCT GGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAG CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCC GGTAGTCCCTGTCTCTTATACACATCTCCG AGCCCACGAGACA
SEQ ID NO: 10	CAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA AGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGAT GTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACT GCATTCAAAACTGTCGAGCTAGAGTATGGT AGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATAC TGACACTGAGGTGCGAAAGCGT
SEQ ID NO: 11	TTGTTTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATA AGAGACAGGTGTCAGCCGCCGCGGTAATA CGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGAC TGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTATGG

	ACAGTCAGATGTGAAATTCCTGGGCTTAAC CTGGGGGCTGCATTTGATACGTCCAAACTA GAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCA GTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGG AAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCT GGCTCATAACTGACGCTGAGGCGNGAAAG CGTGGGGAG
SEQ ID NO: 12	AAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTG GGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTATGGAC AGTCAGATGTGAAATTCCTGGGCTTAACCT GGGGGCTGCATTTGATACGTCCAAACTAG AGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAG TGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGA AGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTG GCTCATAACTGACGCTGAGGCGC
SEQ ID NO: 13	AAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTG GGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTATGGAC AGTCAGATGTGAAATTCCTGGGCTTAACCT GGGGGCTGCATTTGATACGTCCAAACTAG AGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAG TGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGA AGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTG GCTCATAACTGACGCTGAGGCG
SEQ ID NO: 14	AAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTG GGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTATGGAC AGTCAGATGTGAAATTCCTGGGCTTAACCT GGGGGCTGCATTTGATACGTCCAAACTAG AGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAG TGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGA

	AGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTG GCTCATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGC GT
SEQ ID NO: 15	TGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA AAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGG ATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA CTGCATTCAAAACTGTCGAGCTAGAGTATG GTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACAC CAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGAT ACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGA GC
SEQ ID NO: 16	AGGGGGCTAGCGTTNCTCGGAATGACTGG GCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTATGGACA GTCAGATGTGAAATTCCTGGGCTTAACCTG GGGGCTGCATTTGATACGTCCAAACTAGA GTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAGT GTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAA GAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGG CTCATAACTGACGCTGAGGCGCGA
SEQ ID NO: 17	AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGT ATTCTTCGGTGCAGCCAGCGCTTCCACAGC GCGGCAGCCCAAACCTTACACACTGTGATT AGTTTTTTCTACTATTTACTTTGGCTGCACG AAGTGGCCAAAGGTTCTTAAACACAAAAG ATTTATATCTTTTTTTACAAAATTTAGTCAA TGNAGTTTTAATACTATNATCTTTCAAAAC TTT

SEQ ID NO: 18	AATNGCGCNGCTTCTTTAGAGTGTCGCAGT AAAAGTAGTCTTGCTTGAATCTCAGTCAAC GCTACACACATTCGGAGTTTTTTTATTTTAT TTTATTTCTTTCGCTTTTGATTCAAAGGGTC CAGGCCAAAAACCAACCCCAACCATTTTA ATTTANTANTATTTTTTTAACCTAACCCAA ATTTCCTACCGAAATTTTTAAATTATTTNA AACCTTTCA
SEQ ID NO: 19	CCATTAAGAAGAAATTCTATATGAATGAA GTTAGAGGACGTCTAAAGATACTGTAAGA GAGGATCTGGTTCAAGACCAGCGCTTAATT GCGCGGTTGCGGCTNGGTTCGCCTTTTGCG GAACATGTCTTTTCTCGTTGTTAACTCTACT TCAACTTCTACAACACTGTGGAGTTTTCTA CACAACTTTTCTTCTTTGGGAAGATACGTC TTGTGCGTGCTTCCCAGAGGTGACAAACAC AAACAACTTTTTATTATTATAAACCAGTCA AAACCAATTTCGTTATGAAATTAAAAATAT TTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCCTGTCTC TTATACACATCTCC
SEQ ID NO: 20	GTGAATTGCTCTCTGAGCGTTAAACTATAT CCATCTACACCTGTGAACTGTTGATTGACT TCGGTCGAATTACTTTTACAAACATTGTGT AATGAACGTCATGTTATTATAACAAAAAAT AAC
SEQ ID NO: 21	TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC GGAAGGATCATTAGTGAATTGCTCTCTGAG CGTTAAACTATATCCATCTACACCTGTGAA

	CTGTTGATTGACTTCGGTCAATTACTTTTAC AAACATTGTGTAATGAACGTCATGTTATTA TAACAAAAATAACTTTCAACAACGGA
SEQ ID NO: 22	CAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA AGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGAT GTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACT GCATTCAAAACTGTCGAGCTAGAGTATGGT AGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATAC TGACACTGAGGTGCGAAAGCGT
SEQ ID NO: 23	ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAT TGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTT AAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAAC CGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACT TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCA CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC TGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAA GCGTGGGGAGCGAACAG
SEQ ID NO: 24	CGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGAC TGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTAT GCAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAA CCTGGGAACTGCATTTGAGACGCATAGACT AGAGGTCGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCC AGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGG GAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACC TGGCTCGATACTGACGCTGAGGCGCGAAA GCGTGGGGAGCAAACAG

SEQ ID NO: 25	AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCT GCGGAAGGATCATTAGATTGAATTATCATT GTTGCTCGAGTTCTTGTTTAGATCTTTTACA ATAATGTGTATCTTTATTGAAGATGTGCGC TTAATTGCGCTGCTTCTTTAAAGTGTCGCA GTGAAAGTAGTCTTGCTTGAATCTCAGTCA ACGCTACACACATTGGAGTTTTTTTACTTT AATTTAATTCTTTCTGCTTTGAATCGAAAG GTTCAAGGCAAAAAACAAACACAAACAAT TTTATTTTATTATAATTTTTTAAACTAAACC AAAATTCCTAACGGAAATTTTAAAATAATT TAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC TCT

[0061] 至少一种微生物可以在培养物中生长。至少一种微生物可以从培养物中分离和纯化。从培养物中纯化的至少一种微生物可以包括至少一种微生物的营养细胞或孢子。培养物可以是固体或半固体培养基。培养物可以是液体培养基。培养物可以是生物反应器。可以使用任何合适的生物反应器。生物反应器的实例包括但不限于烧瓶、连续搅拌釜式生物反应器(CSTR)、无泡生物反应器、气升式反应器和膜生物反应器。在一些情况下,培养物的上清液包含至少一种微生物的次级代谢产物。至少一种微生物的次级代谢产物可以从上清液中分离和纯化。在一些情况下,可以施用上清液作为如本文其他地方所述的生物防治组合物。

[0062] 至少一种微生物可能会受到其他微生物的影响。当一起培养时,微生物可能协同表现,使得与单独培养时相比,当一起培养时,抗真菌特性得到改善。例如,当与另一种微生物一起培养时,至少一种微生物可能具有增加的生存能力。当与另一种微生物一起培养时,至少一种微生物可能具有增加的增殖。至少一种微生物可以利用另一种微生物产生的化学物质或代谢产物。至少一种微生物可以直接与另一种微生物相互作用。例如,至少一种微生物与另一种微生物可以形成生物膜或多细胞结构。当与另一种微生物一起培养时,至少一种微生物可以产生和/或分泌增加量的次级代谢产物。例如,至少一种微生物可以产生中间代谢产物,其又被另一种微生物加工,产生次级代谢产物。本文其他地方公开的方法可用于鉴定可受益于与另一种微生物一起培养的微生物,以及鉴定包含第一微生物和第二微生物的生物防治组合物,其中第二微生物与第一微生物不相同。

[0063] 生物防治组合物可以包含至少一种微生物的一种或多种次级代谢产物。一种或多种次级代谢产物可以具有其自身的抗真菌特性。一种或多种次级代谢产物可以与生物防治组合物中的其他微生物一起具有抗真菌特性。一种或多种次级代谢产物可以从至少一种微生物的培养物的上清液中分离出来。一种或多种次级代谢产物可以包括脂肽、二肽、氨基多元醇、蛋白质、嗜铁素、吩嗪化合物、聚酮或其组合。

[0064] 脂肽可以是线性脂肽或环脂肽(CLP)。脂肽的实例包括但不限于表面活性素、丰原素、伊枯草菌素、massetolide、amphisin、节活性素、tolassin、syringopeptide、丁香霉素、恶臭溶菌素、杆菌霉素、bacillopeptin、杆菌肽、多粘菌素、达托霉素、抗霉枯草菌素、库尔斯塔克素、张力蛋白、制磷脂菌素、黏液菌素和棘白菌素。棘白菌素可以是棘白菌素B(ECB)。在一些实施方案中,次级代谢产物是表面活性素、丰原素、伊枯草菌素或其组合。

[0065] 二肽可以是杆菌溶素或chlorotetain。聚酮可以是defficidin、大环内酰亚胺(macrolactin)、bacillaene、butyrolactol A、Soraphen A、hippolachnin A或forazoline A。次级代谢产物可以是氨基多元醇。氨基多元醇可以是zwittermicin A。次级代谢产物可以是蛋白质。蛋白质可以是抗菌蛋白质(bacisubin)、枯草菌素或fungicin。

[0066] T嗜铁素可以是绿脓菌荧光素、thioquinolobactin或绿脓菌螯铁蛋白。吩嗪化合物可以是吩嗪-1-羧酸、1-羟基吩嗪或吩嗪-1-甲酰胺。次级代谢产物可以是几丁质酶、纤维素酶、淀粉酶或葡聚糖酶。次级代谢产物可以是挥发性抗真菌化合物。

[0067] 生物防治组合物可以被配制为液体制剂或干燥制剂。液体制剂可以是可流动的或水性的悬浮液。液体制剂可以包含悬浮在水、油或其组合(乳液)中的至少一种微生物或其次级代谢产物。干燥制剂可以是可湿性粉末、干片、粉尘或颗粒。可以将可湿性粉末作为悬浮液施用至植物、种子、花或其农产品。可以将粉尘干涂至植物、种子或其农产品,诸如干涂至种子或叶子。可以干涂颗粒,或者可以将颗粒与水混合以形成悬浊液。至少一种微生物或其次级代谢产物可以被配制为微胶囊,其中至少一种微生物或其次级代谢产物具有惰性保护层。惰性保护层可以包括任何合适的聚合物。

[0068] 生物防治组合物还可以包括附加的化合物。附加的化合物可以是载体、表面活性剂、润湿剂、渗透剂、乳化剂、铺展剂、粘着剂、稳定剂、营养剂、粘合剂、干燥剂、增稠剂、分散剂、UV保护剂或其组合。载体可以是液体载体、矿物载体或有机载体。液体载体的实例包括但不限于植物油或水。矿物载体的实例包括但不限于高岭土或硅藻土。有机载体的实例包括但不限于谷物粉。表面活性剂可以是阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂或非离子表面活性剂。表面活性剂可以是吐温20或吐温80。润湿剂可以包括聚氧乙烯酯、乙氧基硫酸盐,或其衍生物。在一些情况下,将润湿剂与非离子表面活性剂混合。渗透剂可以包括碳氢化合物。铺展剂可以包括脂肪酸、胶乳、脂肪醇、作物油(例如,棉籽油)或无机油。粘着剂可以包括乳化聚乙烯、聚合树脂、脂肪酸、石油馏分或预糊化玉米粉。油可以是椰子油、棕榈油、蓖麻油或羊毛脂。稳定剂可以是乳糖或苯甲酸钠。营养剂可以是糖蜜或蛋白胨。粘合剂可以是阿拉伯树胶或羧甲基纤维素。干燥剂可以是硅胶或无水盐。增稠剂可以包括聚丙烯酰胺、聚乙烯聚合物、多糖、黄原胶或植物油。分散剂可以是微晶纤维素。UV保护剂可以是氧苯酮、荧光增白剂blankophor BBH或木质素。

[0069] 生物防治组合物还可以包括吡啶二羧酸。

[0070] 至少一种微生物可以包括有效量的从液体培养物中分离和纯化的经分离和纯化的微生物。来自液体培养物的至少一种微生物可以经风干、冷冻干燥、喷雾干燥或流化床干燥以产生干燥制剂。干燥制剂可以在液体中重构以产生液体制剂。

[0071] 生物防治组合物可以被配制使得至少一种微生物在被施用/或递送至目标生境(例如土壤、植物、种子和/或农产品)后可以被复制。

[0072] 生物防治组合物可以具有至少一周、一个月、六个月、至少一年、至少两年、至少三

年、至少四年或至少五年的贮存期限。贮存期限可以指示生物防治组合物保持其抗真菌特性的至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少99％或100％的时间长度。生物防治组合物可以在室温下、在4℃或4℃以下、在0℃或0℃以下或者在-20℃或-20℃以下储存。

[0073] 生物防治组合物可以包含孢子。含有孢子的组合物可以通过本文所述的方法施用。含有孢子的组合物可以延长生物防治组合物的贮存期限。含有孢子的组合物可以在目标生境的低pH或低温下存活。例如，含孢子的组合物可以在较冷的温度(例如，低于10℃)下施用至土壤，并且可以对于在较高温度(例如，20℃)下种植的种子具有抗真菌特性。孢子可以变成营养细胞，使它们具有营养细胞的任何优点。

[0074] 生物防治组合物可以包含营养细胞。含有营养细胞的组合物可以通过本文所述的方法施用。营养细胞可以增殖并提高组合物的功效。例如，生物防治组合物中的营养细胞可以在施用后增殖，从而增加暴露于生物防治组合物的植物的表面积。在另一实例中，生物防治组合物中的营养细胞可以在施用后增殖，从而增加生物防治组合物存活的时间量，并因此延长生物防治组合物具有功效的时间。营养细胞可以增殖并与真菌病原体竞争营养。营养细胞可以主动地产生一种或多种具有抗真菌特性的次级代谢产物。营养细胞可以变成孢子，使它们具有孢子的任何优点。

[0075] 生物防治组合物可以具有抗真菌活性，诸如预防真菌病原体的生长或者减少真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长。生物防治组合物可以预防真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长至少1天、至少2天、至少3天、至少4天或至少5天。生物防治组合物可以预防真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天或至少10天。生物防治组合物可以预防真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长超过10天。

[0076] 相对于真菌病原体在未暴露于生物防治组合物的植物、种子、花或其农产品的对照上的生长，生物防治组合物可以减少真菌病原体在植物、种子或其农产品上的生长。对照可以是未向其施用抗真菌剂的植物、种子或其农产品，或者可以是已经向其施用市售抗真菌剂的植物、种子、花或其农产品。市售抗真菌剂的实例包括但不限于枯草芽孢杆菌菌株QST713(Serenade®)、枯草芽孢杆菌菌株GB02(Kodiak®)、枯草芽孢杆菌菌株MBI 600(Subtilex®)、短小芽孢杆菌(Bacillus pumilus)菌株GB34(YieldShield)、地衣芽孢杆菌(Bacillus licheniformis)菌株SB3086(EcoGuard®)。生物防治组合物可以减少真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长至少1天、至少2天、至少3天、至少4天或至少5天。生物防治组合物可以减少真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天或至少10天。生物防治组合物可以减少真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长超过10天。相对于真菌病原体在对照上的生长，生物防治组合物可以减少真菌病原体的生长至少25％。相对于真菌病原体在对照上的生长，生物防治组合物可以减少真菌病原体的生长至少60％。相对于真菌病原体在对照上的生长，生物防治组合物可以减少真菌病原体的生长至少25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％或更多。

[0077] 在本文公开的各个方面，生物防治组合物可用于减少真菌病原体在植物上的生长。植物可以是花、种子或农产品。植物、花、种子或其农产品可以是扁桃、杏、苹果、朝鲜蓟、

香蕉、大麦、甜菜、黑莓、蓝莓、西兰花、抱子甘蓝、卷心菜、大麻、辣椒、胡萝卜、芹菜、碧芰菜、樱桃、柑橘、玉米、葫芦、海枣、无花果、大蒜、葡萄、香草、香料、羽衣甘蓝、莴苣、油棕、橄榄、洋葱、豌豆、梨、桃、花生、木瓜、欧洲防风、美洲山核桃、柿子、李子、石榴、马铃薯、榲桲、小萝卜、覆盆子、玫瑰、水稻、黑刺李、高粱、大豆、菠菜、草莓、甘薯、烟草、番茄、芜菁、胡桃和小麦。植物可以是柑橘属或苹果属的成员。例如，植物可以是桔子、柠檬、脐橙或其杂种。植物可以是苹果。植物可以是特定的栽培品种。例如，苹果可以是富士苹果。

用于预防或减少食物腐烂和食物腐败的方法和组合物

在收获前使用生物防治组合物处理植物、种子、花或其农产品

[0078] 所述方法可有效抑制真菌病原体的生长。相对于未暴露于生物防治组合物的对照，所述方法可能够将真菌病原体的生长抑制或减少25％或更多。相对于未暴露于生物防治组合物的对照，所述方法可能够将真菌病原体的生长抑制或减少60％或更多。相对于未暴露于生物防治组合物的对照，所述方法和组合物可能够将真菌病原体的生长抑制或减少至少1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、17％、20％、25％、30％、35％、40％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、97％、98％、99％、99.5％或更多。

[0079] 预防或减少真菌病原体在植物、种子或其农产品上生长的方法可以包括在收获前向植物、种子、花或农产品施用包含本文所述的至少一种微生物或其一种或多种次级代谢产物以及载体的生物防治组合物。收获农产品可以指从植物的剩余部分除去植物的可食用部分，或者可以指除去整个植物，随后除去可食用部分。

[0080] 在收获前施用生物防治组合物可以包括使用生物防治组合物撒粉、注入、喷涂或刷涂植物、种子或其农产品。施用生物防治组合物可以包括将生物防治组合物添加至滴线、灌溉系统、化学灌溉系统、喷雾剂或浸剂。在一些情况下，将生物防治组合物施用至植物的根、植物的种子、植物的叶子、植物周围的土壤或者植物的可食用部分(其在本文中也称为植物的农产品)。

[0081] 所述方法还可以包括向植物施用肥料、除草剂、农药、其他生物防治剂或其组合。在一些情况下，肥料、除草剂、农药、其他生物防治剂或其组合在生物防治组合物之前、在生物防治组合物之后或者与生物防治组合物同时施用。

[0082] 预防或减少真菌病原体生长的方法可以包括向种子施用包含如本文所述的至少一种微生物或其次级代谢产物以及载体的生物防治组合物。可以在种植前、种植期间或种植后发芽前向植物的种子施用生物防治组合物。例如，可以在种植前将生物防治组合物施用至种子的表面。在一些情况中，在种植前进行的种子处理可以包括向生物防治组合物中添加着色剂或染料、载体、粘合剂、粘着剂、消泡剂、润滑剂、营养剂或其组合。

[0083] 预防或减少真菌病原体生长的方法可以包括向土壤施用包含本文所述的至少一种微生物或其次级代谢产物以及载体的生物防治组合物。可以在将种子播种到土壤之前、之后或期间，或者在将植物转移到新的地点之前，将生物防治组合物施用至土壤。在一个实例中，在种植之前向土壤添加土壤改良剂，其中土壤改良剂使得植物的生长得到改善，并且其中土壤改良剂包含生物防治组合物。在一些情况下，土壤改良剂还包含肥料。

[0084] 预防或减少真菌病原体生长的方法可以包括向根部施用包含本文所述的至少一种微生物或其次级代谢产物以及载体的生物防治组合物。可以将生物防治组合物直接施用

至根部。直接向植物的根部施用的实例可以包括将根浸入包含生物防治组合物的溶液中。可以将生物防治组合物间接施用至根部。间接向植物的根部施用的实例可以包括将生物防治组合物喷涂在植物基部附近,其中生物防治组合物渗透土壤到达根部。

[0085] 图1示出了使用生物防治组合物的方法的通用示意图。微生物可以生长用于生物防治组合物。可以任选地提取生物防治组合物的活性组分,或可以控制微生物的生长,使得不同的组分可以用于生物防治组合物。例如,可以离心微生物生长物,并且可以收集上清液和微生物颗粒(microbe pellet)。上清液或微生物可以用作生物防治组合物。可以将另外的化合物添加到生物防治组合物中,并且可以制备制剂。该制剂可以例如增加储存期限或允许施用生物防治组合物。同时,可以使植物生长。植物可以从种子或从移植物生长而来。可以收获植物的农产品并且可以运输收获的农产品。配制的生物防治组合物可以在植物生长过程的任何阶段或在收获或运输过程中施用于植物。例如,可以将生物防治组合物施用于植物的种子或根部。在另一个实例中,生物防治组合物可在收获前、收获期间、收获后施用于农产品,或施用于用于运输农产品的包装。在施用生物防治组合物后,植物对病原菌感染或生长的抵抗力可增强。

在收获后使用生物防治组合物处理其农产品

[0086] 预防或减少真菌病原体在农产品上生长的方法可以包括在收获农产品之前或之后向农产品施用包含本文所述的至少一种微生物或其次级代谢产物以及载体的生物防治组合物。

[0087] 在收获之前或之后施用生物防治组合物可以包括使用生物防治组合物撒粉、浸渍、滚动、注入、擦抹、喷涂或刷涂植物的农产品。可以在收获前立即或收获后立即或者在收获的1天、2天、3天、4天、5天、6天或1周内将生物防治组合物施用至农产品。在一些情况下,通过进行收获的实体、在收获之前或收获后立即处理农产品的过程中、通过包装农产品的实体、通过运输农产品的实体或者通过商业展示待售农产品的实体或消费者来施用生物防治组合物。

[0088] 在收获后施用生物防治组合物还可以包括将生物防治组合物结合到收获后处理农产品的过程中。可以在收获后立即处理农产品,例如在一次或多次清洗中。一次或多次清洗可包括使用其中已加入漂白剂(氯)和/或碳酸氢钠的水或者臭氧化水。还可以使用油、树脂或者结构基质或化学基质处理农产品。可以将生物防治组合物与油、树脂或者结构基质或化学基质混合用于施用。可以在干燥农产品之前或之后处理农产品。例如,可将生物防治组合物添加到用于涂覆农产品的蜡、阿拉伯树胶或其他涂料中。可以在该过程的任何时候添加生物防治组合物,包括在清洗的一步中,作为新清洗的一部分,或者与蜡、阿拉伯树胶或农产品的其他涂料混合。

[0089] 生物防治组合物的可能制剂。

[0090] 为了提高生物防治组合物的储存期限和易于施用,可以使用特定的制剂。制剂可以包含蔗糖、丙三醇、羧甲基纤维素(CMC)、阿拉伯树胶、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、藻酸盐、琼脂、λ-和κ卡拉胶、果胶、壳聚糖、豆胶、脱脂奶、淀粉或海藻糖。所述制剂可以包含最高100%的组合物的给定组分量。该制剂可以含有特定量的给定组分。例如,给定的组分可以占组合物的至少0.1%、1%5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%,或更多。例如,给定的组分可以占至少组合物的不超过

0.1%、1%5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更少。

[0091] 例如,羧甲基纤维素(CMC)的量可以是1:5w/v。在另一个实例中,阿拉伯树胶的浓度可以高达40%w/v。制剂可以是各种液体或固体状态,或可以是可雾化的。例如,该制剂可以是冷冻干燥的粉末。例如,制剂可以是液体或最初是液体,然后进行冻干。

[0092] 给出以下实施例的目的是为了说明本发明的各实施方案,并不意欲以任何方式限制本发明。本实施例连同本文描述的方法目前代表优选的实施方案,是示例性的,并且不旨在限制本发明的范围。本领域技术人员将想到其中的变化和包含在由权利要求的范围限定的本发明的精神内的其他用途。

实施例

[0093] 实施例1:使用BC8、BC16、BC17和BC18保护苹果免受扩展青霉菌感染。

[0094] 受伤和接种的苹果在密闭容器中培育,并在害虫攻击后4、6和8天评估疾病发生率和疾病严重程度。测量从接种伤口扩散的可见感染的直径以评估疾病严重程度。

[0095] 首先通过将水果浸入10%消毒剂溶液(bleach solution)中持续8分钟对苹果进行消毒。经消毒的苹果用蒸馏水漂洗3次并干燥30分钟。使用无菌的4mm宽的木塞钻孔器对苹果进行人工创伤,并在苹果中切出3mm深的孔。苹果被分成几组,一组有四个苹果,并拍照。对于每种处理,通过将水果浸入相应BC组合物(BC8、BC16、BC17或BC18)的1/4稀释液中1分钟的处理对水果进行接种。使处理物干燥至少3小时。通过用消毒湿巾擦拭容器准备水果储存容器,并使其干燥20分钟。容器底部装有200mL去离子水。培养皿的一侧用于将水果接种面朝上,并将水果放入有盖的容器中。将扩展青霉菌涂在伤口部位。四个苹果未接种(25μL无菌水)。对于所有处理,每个苹果接种25μL的1.0e5孢子/mL(2.5e4绝对孢子)的溶液。在储存后4、6和8天评估感染的进展情况。为了分析感染情况,读取损伤直径,并拍摄苹果的照片。此外,通过称重整个苹果、切除坏死区域并再次称重苹果以评估感染组织的克数来测量感染程度。

[0096] 实验条件如表3所示,在6个条件下:BC8的孢子、BC16、BC17的孢子、BC18、未经处理的未感染病原体的对照(UTC无病原体)和未经处理的病原体感染的对照苹果(UTC含病原体),在嘎啦和富士苹果上进行,每种条件重复四次。

[0097] 表3:对苹果的处理条件

处理条件名称	制剂	苹果类型	
BC8孢子	BC8:解淀粉芽孢杆菌(SEQ ID NO:1)孢子于PBS中	嘎啦	4次重复
BC16	BC16:假单胞菌属种(SEQ ID NO:22)于发酵液中(营养肉汤加丙三醇)	嘎啦	4次重复

BC17 孢子	BC17：解淀粉芽孢杆菌(SEQ ID NO:23) 孢子于PBS 中	嘎啦	4 次重复
BC18	BC18：蜡色葡糖杆菌和葡萄汁有孢汉逊酵母(SEQ ID NO: 24 和 25) (约50:50 比率)于 PBS 中	嘎啦	4 次重复
未经处理的对照 (UTC) - 无病原体		嘎啦	4 次重复
未经处理的对照 (UTC) 含病原体		嘎啦	4 次重复
BC8 孢子	BC8：解淀粉芽孢杆菌(SEQ ID NO:1)) 孢子于PBS 中	富士	4 次重复
BC16	BC16：假单胞菌属种(SEQ ID NO: 22)于发酵液中(营养肉汤加丙三醇)	富士	4 次重复
BC17 孢子	BC17：解淀粉芽孢杆菌(SEQ ID NO:23) 孢子于PBS 中	富士	4 次重复
BC18	BC18：蜡色葡糖杆菌和葡萄汁有孢汉逊酵母(SEQ ID NO: 24 和 25) (约50:50 比率)于 PBS 中	富士	4 次重复
未经处理的对照 (UTC) - 无病原体		富士	4 次重复

未经处理的对照(UTC)含病原体		富士	4次重复

[0098] 图2示出了在包括富士(3)和嘎啦(3)苹果在内的六个实验中通过损伤直径测量的苹果腐烂。阴性对照(对照(-))未接种且未处理,而阳性对照(对照(+))已接种且未处理。没使用相同字母标注的箱形图具有显著差异(p＝0.01)。在感染后6天进行测量。

[0099] 图3示出了在包括富士(3)和嘎啦(3)苹果在内的六个实验中通过腐烂组织的重量测量的苹果腐烂。阴性对照未接种且未处理,而阳性对照已接种且未处理。没使用相同字母标注的箱形图有显著差异(p＝0.01)。在感染后6天进行测量。

[0100] 图4A示出了通过平均损伤直径评估的富士苹果腐烂。图4B示出了通过平均坏死重量评估的富士苹果腐烂。阴性对照未接种且未处理,而阳性对照已接种且未处理。没使用相同字母标注的条形图有显著差异(p＝0.05)。在感染后6天进行测量。

[0101] 通过测量感染的大小或重量,BC18处理的苹果示出比未经处理的苹果明显更不容易腐烂。在富士和嘎啦苹果中可以看出BC18介导的抗腐烂保护。与未经处理的(+)对照相比,BC18处理示出了可显著保护富士苹果免于扩展青霉菌腐烂。BC18处理还显著保护嘎啦苹果免于扩展青霉菌腐烂。嘎啦苹果的处理结果与未接种的(-)对照苹果相当。此外,使用候选物处理的苹果没有发现不利影响。没有观察到苹果表面具有异常气味或变色。

[0102] 图5是富士苹果感染后6天的照片。并且图7是嘎啦苹果感染后6-7天的照片。图6A示出了由平均损伤直径评估的嘎啦苹果腐烂。图6B示出了通过平均坏死重量评估的嘎啦苹果腐烂。阴性对照未接种且未处理,而阳性对照已接种且未处理。没使用相同字母标注的条形图具有显著差异(p＝0.05)。在感染后6天进行测量。

[0103] 实施例2:通过BC18组分菌株保护苹果免于扩展青霉菌腐烂

[0104] 受伤和接种的苹果在密闭容器中培养。在害虫攻击后6天评估疾病发生率和疾病严重程度。测量从接种伤口扩散的可见感染的直径以评估疾病严重程度。组成BC18的两种菌株(蜡色葡糖杆菌＝BC18A和葡萄汁有孢汉逊酵母＝BC18B)以与单一菌株相同的方式进行测试。此外,还测试了各种比例的BC18组分。实验条件如表4所示,8个条件(BC18、BC18微生物A(BC18A)、BC18微生物B(BC18B)、BC18微生物A和微生物B以第一比例的微生物A和B的量(BC18A+B比例1))、BC18微生物A和微生物B以第二比例的微生物A和B的量(BC18A+B比例2))、BC18微生物A和微生物B以第三比例的微生物A和B的量(BC18A+B比例3)、未经处理的未感染病原体的对照(UTC无病原体)和未经处理的病原体感染的对照苹果(UTC含病原体),每个条件对嘎啦苹果进行4次重复。

表4:苹果的BC18处理条件

处理条件	制剂	苹果类型	
BC18	蜡色葡糖杆菌和葡萄汁有孢汉逊酵母于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中	嘎啦	4次重复
BC18A	蜡色葡糖杆菌于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中	嘎啦	4次重复
BC18B	葡萄汁有孢汉逊酵母于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中	嘎啦	4次重复
BC18A+B; 1:2比率	蜡色葡糖杆菌和葡萄汁有孢汉逊酵母以1:2的比率于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中	嘎啦	4次重复
BC18A+B; 2:1比率	蜡色葡糖杆菌和葡萄汁有孢汉逊酵母以2:1的比率于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中	嘎啦	4次重复
BC18A+B; 1:1	蜡色葡糖杆菌和葡萄汁有孢汉逊酵母以1:1的比率于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中	嘎啦	4次重复
未经处理的对照(无病原体)		嘎啦	4次重复
未经处理的对照含病原体		嘎啦	4次重复

[0105] 首先通过将水果浸入10％消毒剂溶液中持续8分钟对苹果进行消毒。经消毒的苹果用蒸馏水漂洗3次并干燥30分钟。使用无菌的4mm宽的木塞钻孔器对苹果进行人工创伤，并在苹果中切出3mm深的孔。苹果被分成几组，一组有四个苹果，并拍照。对于每种处理，通过将水果浸入相应BC组合物的1/4稀释液中1分钟的处理对水果进行接种。使处理物干燥至少3小时。通过用消毒湿巾擦拭容器准备水果储存容器，并使其干燥20分钟。容器底部装有200mL去离子水。培养皿的一侧用于将水果接种面朝上，并将水果放入有盖的容器中。将扩展青霉菌涂在伤口部位。四个苹果未接种(25μL无菌水)。对于所有处理，每个苹果接种25μL的1.0e5孢子/mL(2.5e4绝对孢子)的溶液。在储存后4、6和8天评估感染的进展情况。为了分析感染情况，读取损伤直径，并拍摄苹果的照片。此外，通过称重整个苹果、切除坏死区域并再次称重苹果以评估感染组织的克数来测量感染程度。

[0106] 确定了BC18A和BC18B的最佳比例以及BC18A和BC18B的相对贡献。可以观察到共培养的协同效应，可以将其与单独生长的菌株进行比较。由于抗真菌代谢物的相互刺激，可以

观察到协同效应。

[0107] 实施例3:BC8、BC16、BC17和BC18保护草莓免于灰葡萄孢菌腐烂

[0108] 受伤并接种的草莓在密闭容器中培育,并在害虫攻击后4、6和8天评估发病率和疾病严重程度。测量从接种伤口扩散的可见感染的直径以评估疾病严重程度。实验条件见表5,在6个条件下:BC8的孢子、BC16、BC17的孢子、BC18微生物、未经处理的未感染病原体的对照(UTC无病原体)和未经处理的病原体感染的对照苹果(UTC含病原体),每个条件在草莓上重复四次。

表5:草莓的处理条件

处理条件	制剂	
BC8孢子	BC8:解淀粉芽孢杆菌(SEQ ID NO:1)孢子于PBS中	4次重复
BC16	BC16:假单胞菌属种(SEQ ID NO: 22)于发酵液中(营养肉汤加丙三醇)	4次重复
BC17孢子	BC17:解淀粉芽孢杆菌(SEQ ID NO:23)孢子于PBS中	4次重复
BC18	BC18:蜡色葡糖杆菌和葡萄汁有孢汉逊酵母(SEQ ID NO: 24和25)(约50:50比率)于PBS中	4次重复
UTC无病原体		4次重复
UTC含病原体		4次重复

[0109] 首先通过将水果浸入10%消毒剂溶液中持续8分钟对草莓进行消毒。经消毒的草莓用蒸馏水漂洗3次并干燥30分钟。使用无菌的4mm宽的木塞钻孔器对草莓进行人工创伤,并在草莓中切出3mm深的孔。草莓被分成几组,一组有四个草莓,并拍照。对于每种处理,通过将水果浸入相应BC组合物的1/4稀释液中1分钟的处理对水果进行接种。使处理物干燥至少3小时。通过用消毒湿巾擦拭容器准备水果储存容器,并使其干燥20分钟。容器底部装有200mL去离子水。培养皿的一侧用于将水果接种面朝上,并将水果放入有盖的容器中。将灰葡萄孢菌涂在伤口部位。四个草莓未接种(25μL无菌水)。对于所有处理,每个草莓接种25μL的1.0e5孢子/mL(2.5e4绝对孢子)的溶液。在储存后4、6和8天评估感染的进展情况。为了分析感染情况,读取损伤直径,并拍摄苹果的照片。此外,通过称重整个苹果、切除坏死区域并再次称重苹果以评估感染组织的克数来测量感染程度。

[0110] 实施例4.BC8、BC17和BC18在体外对各种基于柑橘的培养基上的指状青霉菌的抑制。

[0111] 基于柑橘的培养基由均质的水果组织、水和琼脂制成。通过混合每种水果组织类

型以产生桔子、柠檬或脐橙的相应培养基，制成均质的水果组织。使用搅拌机制备6种类型的培养基：桔子皮、完整桔子、柠檬皮、完整柠檬、脐橙皮或完整脐橙。完整培养基包括果皮和果肉，而果皮培养基由果皮制成且不带果肉。对基于柑橘的培养基进行高压灭菌后，将柑橘培养基倒入培养皿中，制备固体培养基板。

[0112] 为了确定BC8、BC17和BC18微生物聚生体在柑橘琼脂培养基上的生长能力，将4uL的每种微生物聚生体点样到固体柑橘培养基板上，如图8A所示。培养基在室温下生长4天。柑橘培养基板的照片示于图8B，示出了4天后BC8、BC17和BC18的生长。BC8和BC17在任何板上均未显示出明显的可见菌落生长，而BC18在所有柑橘培养基类型上均显示出菌落生长。

[0113] 测试了包含解淀粉芽孢杆菌的微生物BC8、包含芽孢杆菌属种的BC17微生物以及包含蜡色葡糖杆菌和葡萄汁有孢汉逊酵母的微生物聚生体BC18在如上文所述制备的各种基于柑橘的培养基上抑制指状青霉菌(P.digitatum)生长的能力。

[0114] 使用50uL的孢子悬浮液以500个孢子/板或5000个孢子/板的浓度将指状青霉菌菌苔铺展到板上。菌苔干燥后，将中心塞切入每个板中。通过从工作储备板中挑选单个菌落并将其接种到1.5mL过滤灭菌的去离子水中来制备候选悬浮液。将100uL微生物聚生体接种到中心塞中。将板在室温下培育4-5天。通过测量真菌菌苔上的清除区域评估指状青霉菌的抑制程度。没有接种微生物聚生体的对照板用于示出0％的抑制。

[0115] 接种后第4天的结果显示出在具有500个孢子/板接种浓度(图9)和5000个孢子/板接种浓度(图10)的指状青霉菌板中。两种浓度的结果相当，尽管在接种浓度为500个孢子/板的板中指状青霉菌的生长抑制更为明显(图9)。BC8在任何测试的柑橘琼脂板上均未显示出对指状青霉菌的抑制作用。BC17在多种培养基上显示出对指状青霉菌的抑制作用。

[0116] 对于BC17来说，其对桔子皮培养基具有强的抑制作用，而对完整桔子培养基具有最小的抑制作用。对柠檬皮培养基没有明显的抑制作用，对完整柠檬培养基具有明显的抑制作用。在脐橙皮和完整脐橙培养基上没有明显的指状青霉菌抑制作用(图9和图10)。

[0117] BC18在桔子皮培养基上显示出对指状青霉菌几乎没有抑制作用，而对完整桔子培养基显示出明显的抑制作用。对柠檬皮培养基的抑制作用最小，对完整柠檬培养基没有抑制作用。对于脐橙皮和完整脐橙培养基，BC18显示出对指状青霉菌的明显抑制作用(图9和图10)。尽管在柑橘类水果培养基上没有可见的BC8和BC17生长，但仍观察到对病原体的抑制，这表明具有抑制特性的生物防治组合物的潜在代谢物。

[0118] 尽管已经在本文中示出和描述了本发明的优选实施方案，但是对于本领域技术人员而言明显的是，这些实施方案仅以示例的方式提供。在不脱离本发明的情况下，本领域技术人员现在将想到许多变化、改变和替换。应该理解，可以使用本文描述的实施方案的各种替代方案。旨在由以下权利要求限定本发明的范围，并且由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

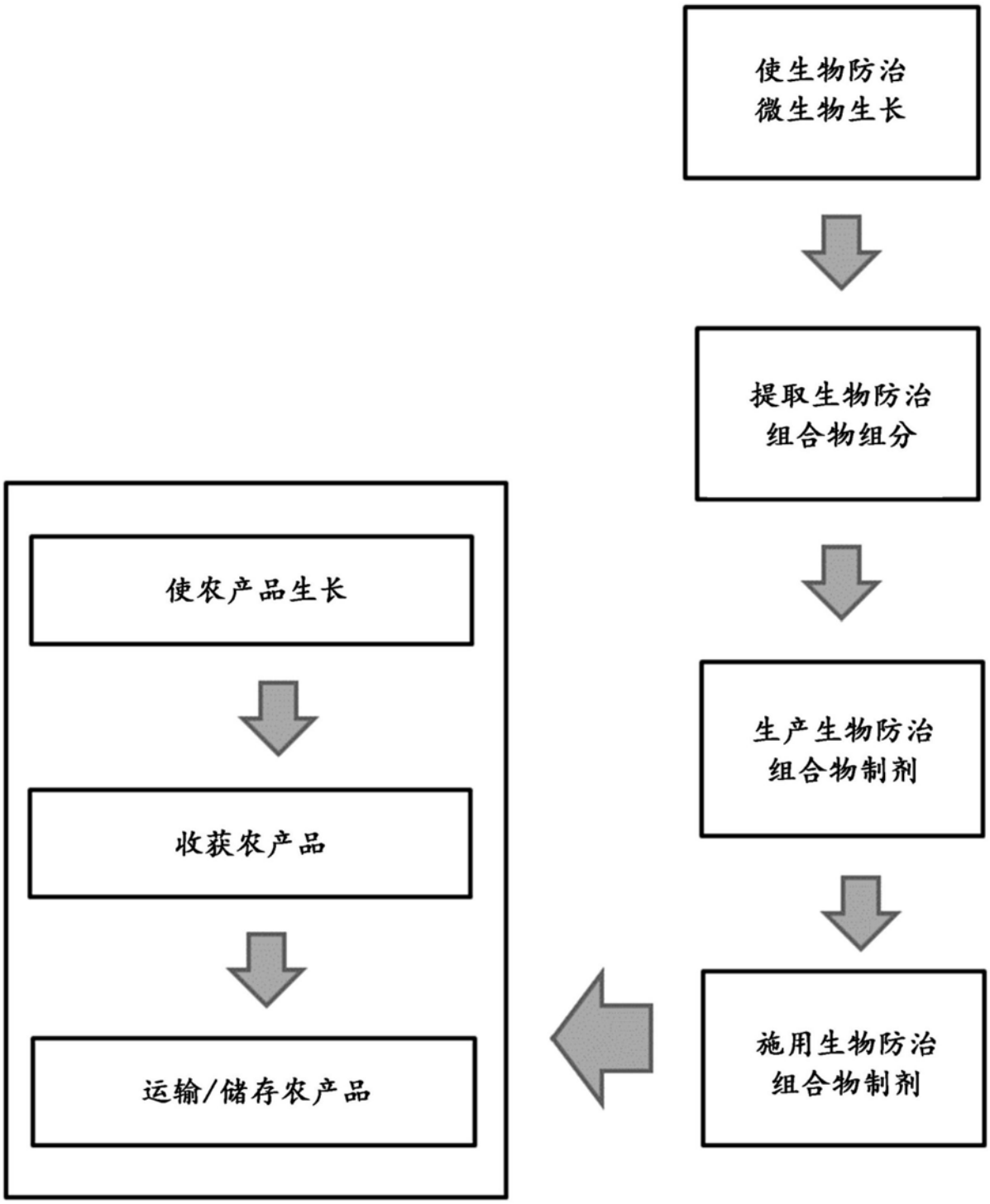

使生物防治
微生物生长
提取生物防治
组合物组分
生产生物防治
组合物制剂
施用生物防治
组合物制剂
使农产品生长
收获农产品
运输/储存农产品

图1

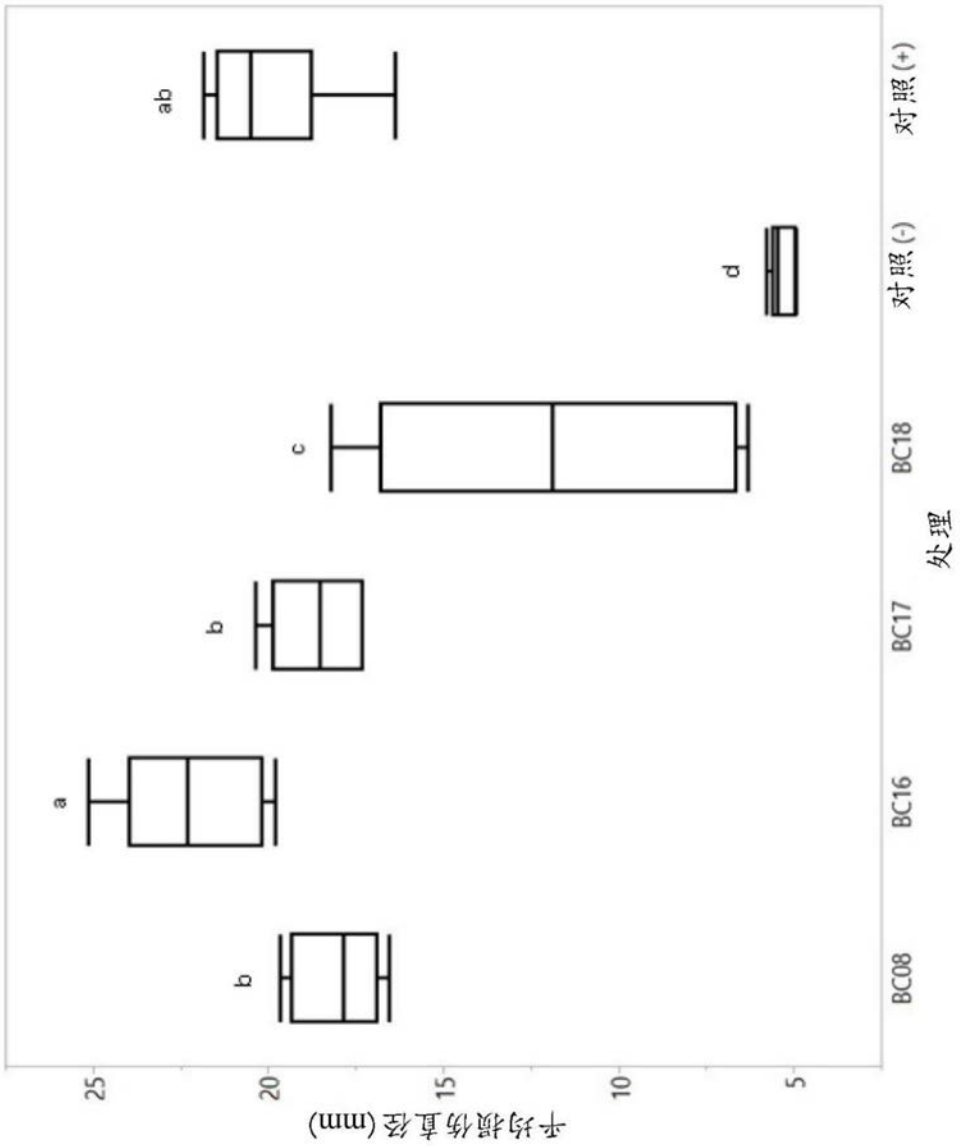


图2

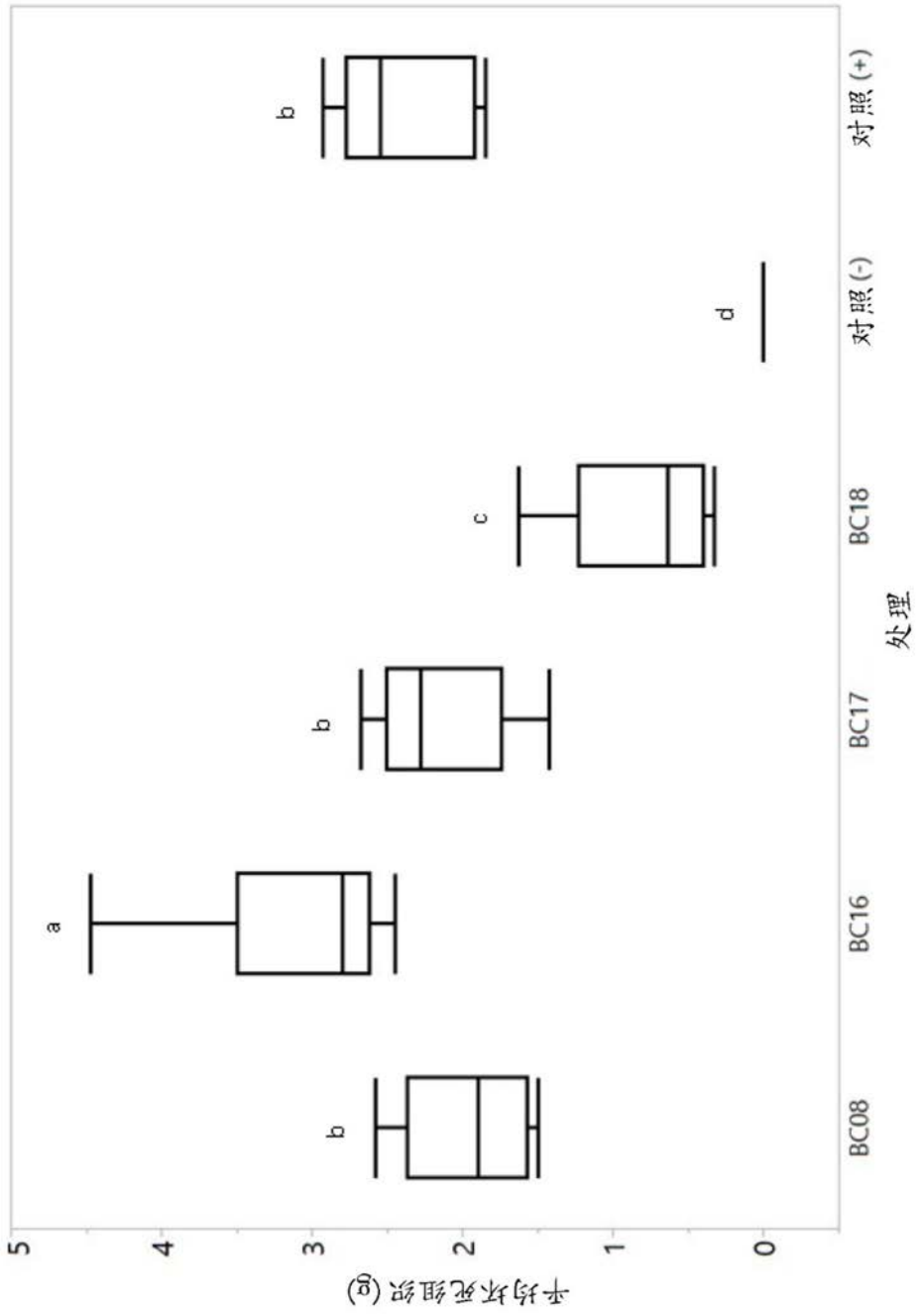


图3

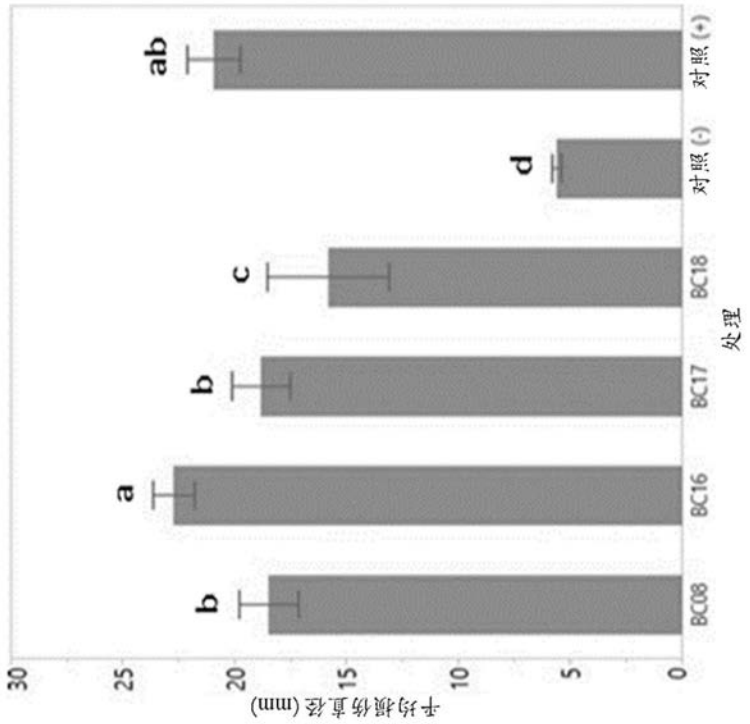

平均褪彷直径 (mm)
0
5
10
15
20
25
30
b
a
b
c
d
ab
BC08
BC16
BC17
BC18
对照 (-)
对照 (+)
处理

图4A

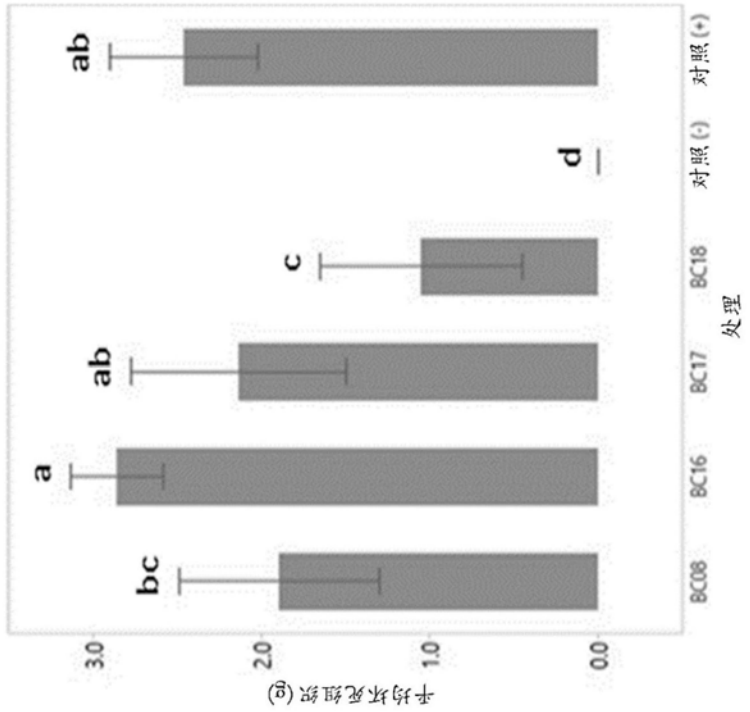

平均坏死组织 (g)
0.0
1.0
2.0
3.0
bc
a
ab
c
d
ab
BC08
BC16
BC17
BC18
对照 (-)
对照 (+)
处理

图4B

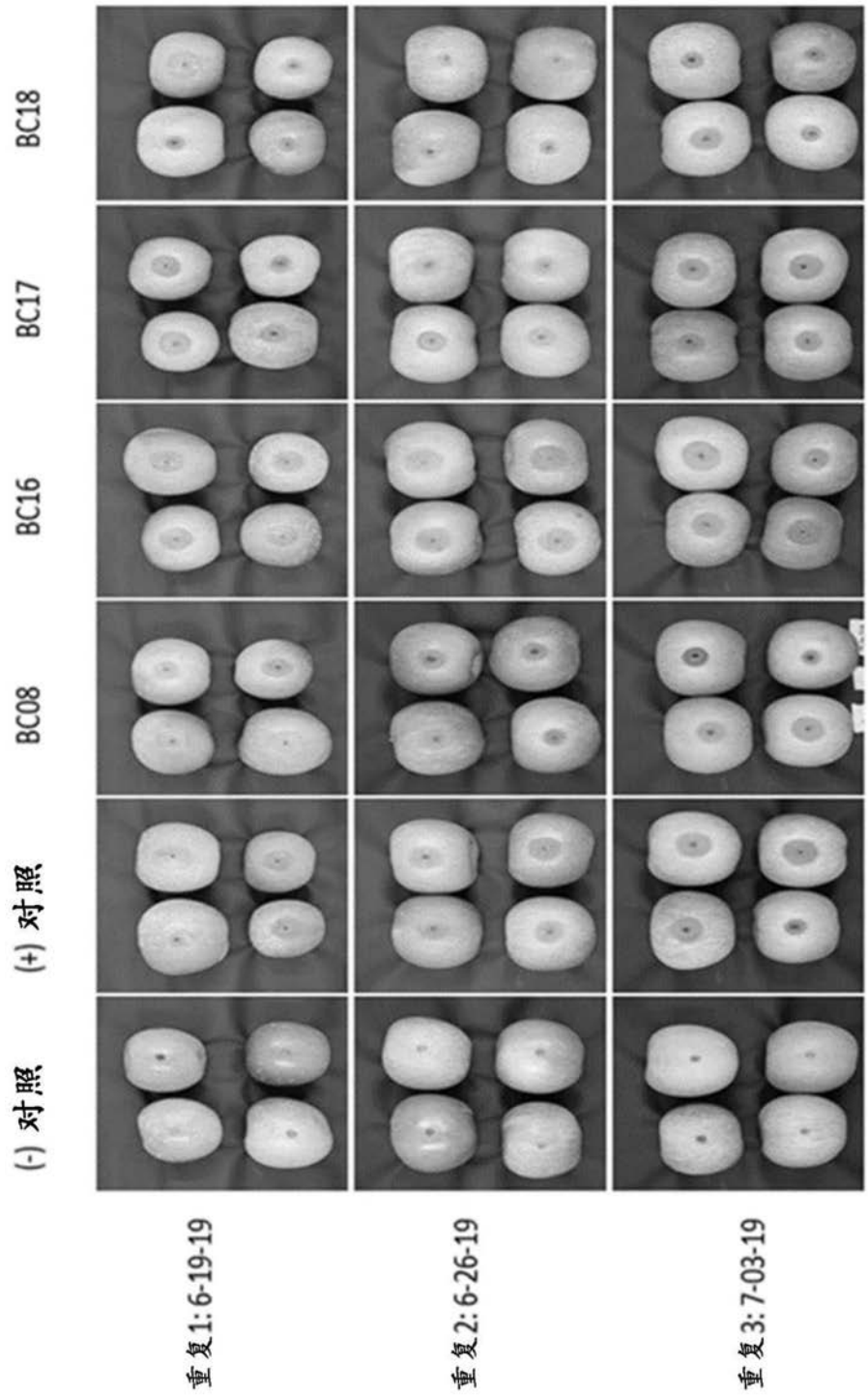


图5

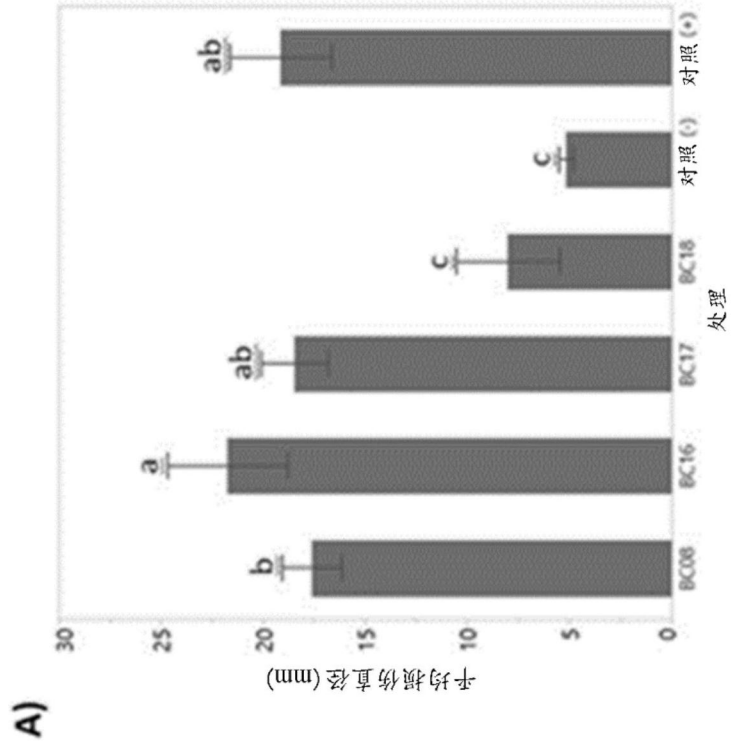

A)
平均损伤直径(mm)
0
5
10
15
20
25
30
b
a
ab
c
c
ab
BC08
BC16
BC17
BC18
对照(-)
对照(+)
处理

图6A

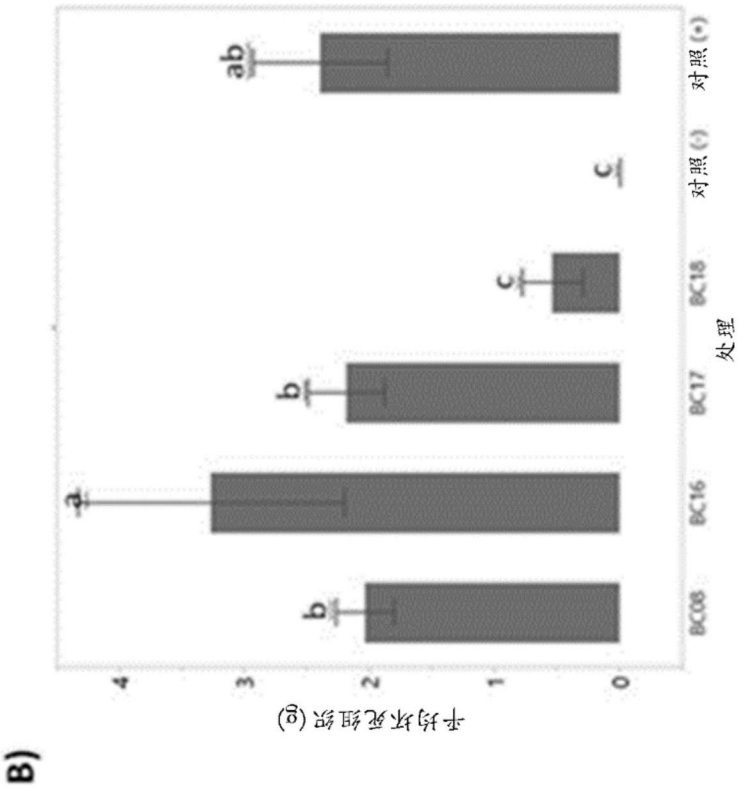

B)
平均坏死组织(g)
0
1
2
3
4
b
a
b
c
c
ab
BC08
BC16
BC17
BC18
对照(-)
对照(+)
处理

图6B

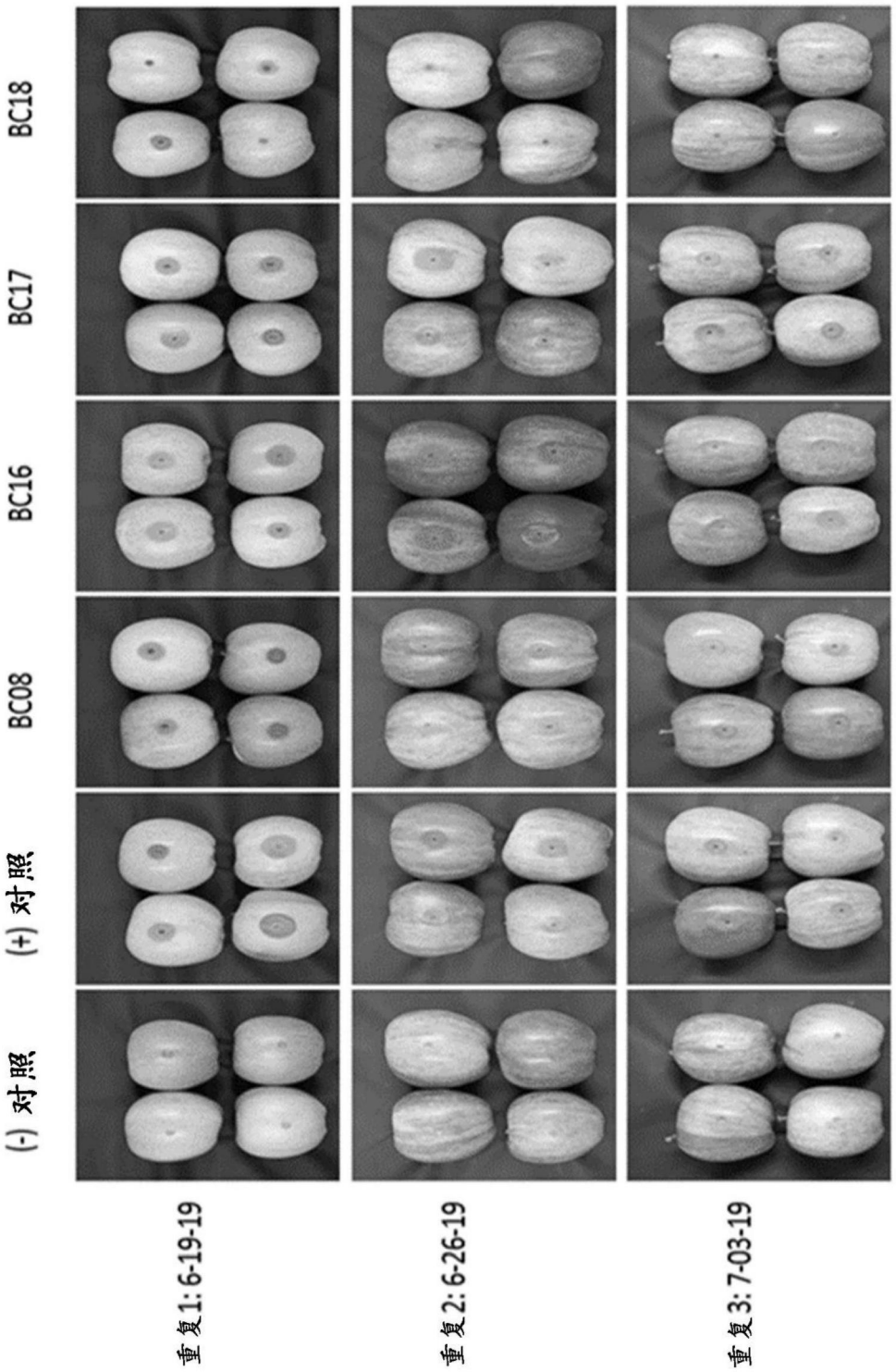


图7

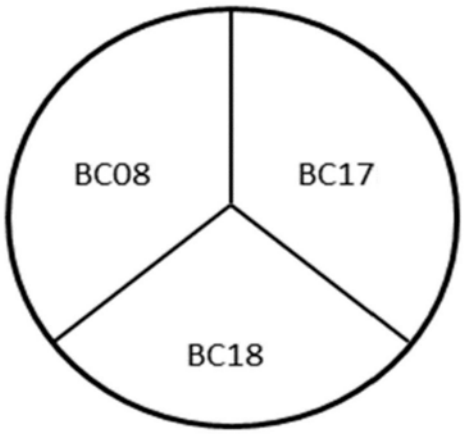


图8A

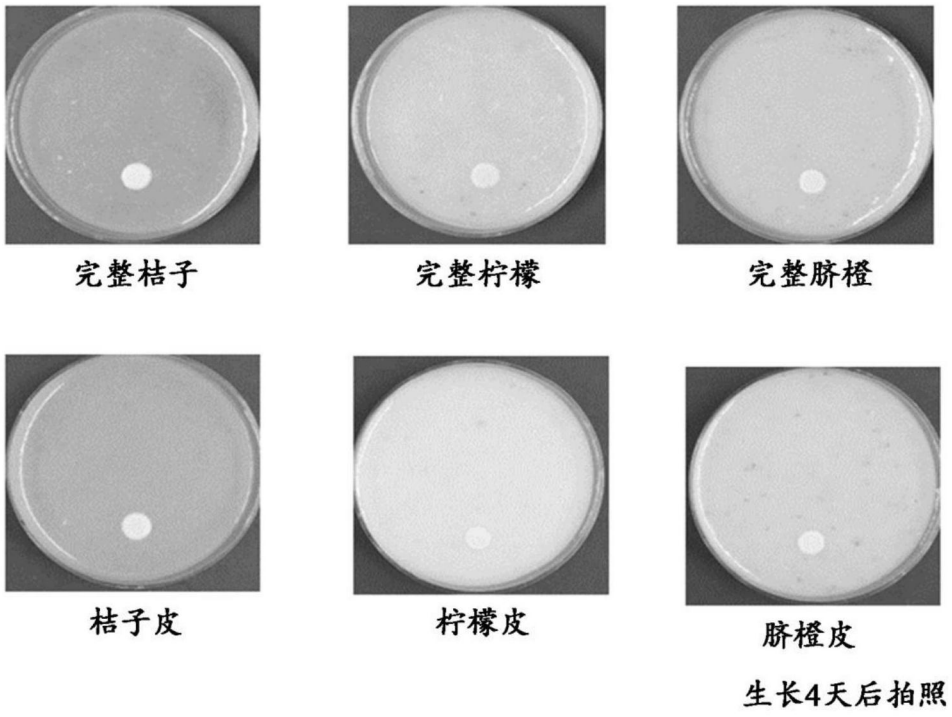


图8B

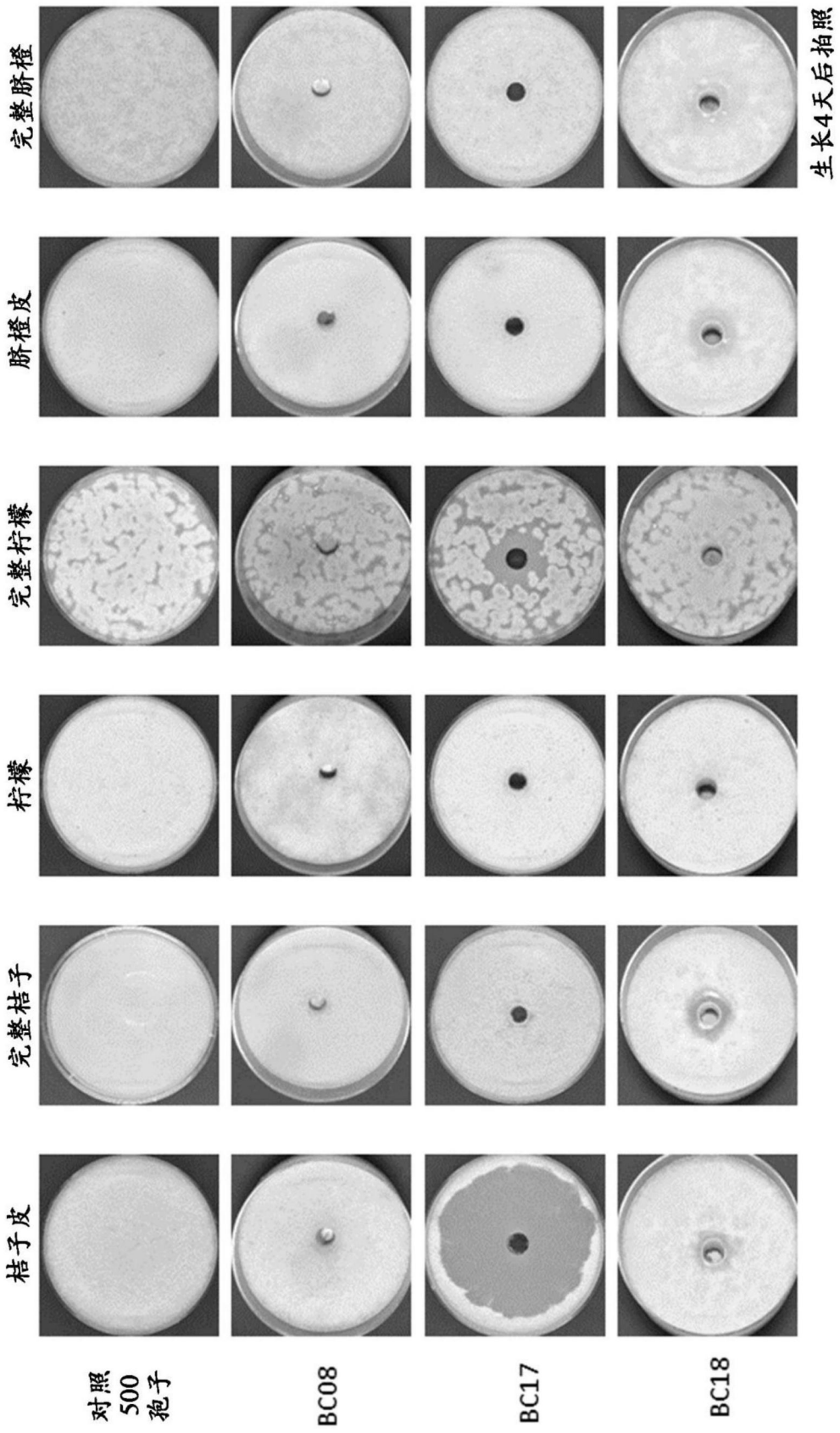


图9

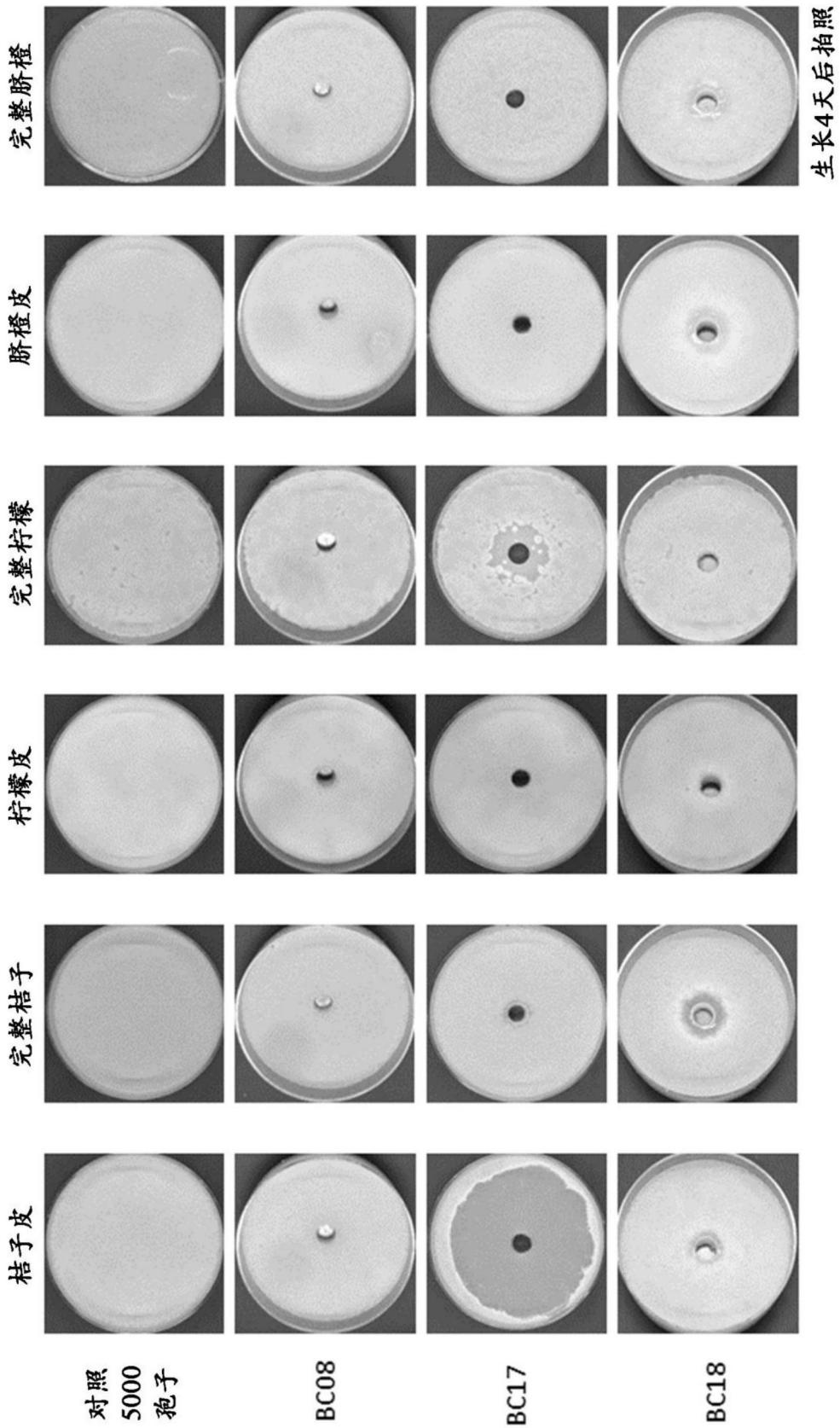


图10