



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104105401 B

(45)授权公告日 2017.03.08

(21)申请号 201280057638.8

(22)申请日 2012.09.24

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104105401 A

(43)申请公布日 2014.10.15

(30)优先权数据
61/538,354 2011.09.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.05.23

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/056877 2012.09.24

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/044211 EN 2013.03.28

(73)专利权人 诺维信生物农业公司
地址 丹麦, 鲍斯韦
专利权人 诺维信生物股份有限公司

(72)发明人 R.S. 史密斯 A. 哈比卜

(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
代理人 龙淳 顾小曼

(51)Int.Cl.
A01N 43/16(2006.01)

(56)对比文件
CN 101578044 A, 2009.11.11,
WO 9834464 A2, 1998.08.13,
WO 2006102717 A1, 2006.10.05,
袁建平 等. “壳寡糖对玉米种子萌发及幼苗生长的影响”. 《安徽农业科学》. 2011, 第39卷(第1期), 第88-89页表1-3.
袁建平 等. “壳寡糖对玉米种子萌发及幼苗生长的影响”. 《安徽农业科学》. 2011, 第39卷(第1期), 第88-89页表1-3.

审查员 董玉轩

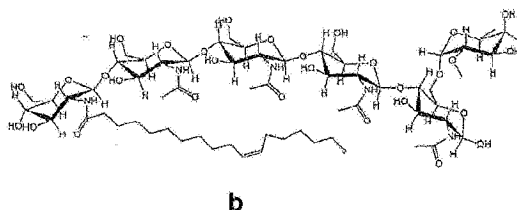
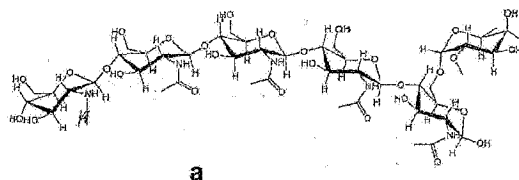
权利要求书4页 说明书18页 附图8页

(54)发明名称

用于增强玉米生长的壳寡糖和方法

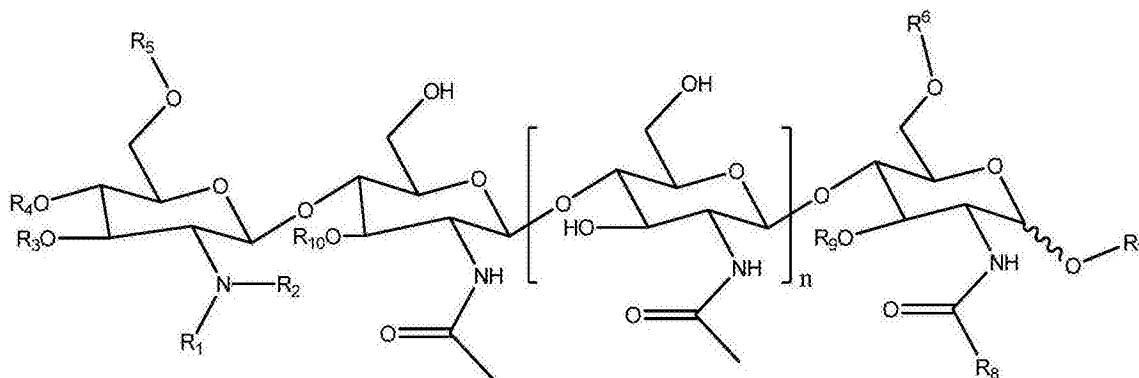
(57)摘要

公开的是增强玉米植物生长的方法, 包括用有效量的至少一种壳寡糖处理玉米种子或从种子萌发的玉米植物, 其中, 与未经处理的玉米植物或从未经处理的玉米种子收获的玉米植物相比, 在收获时该玉米植物表现出按蒲式耳/英亩测量的增加的植物产量、增加的根数量、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中的至少一种。



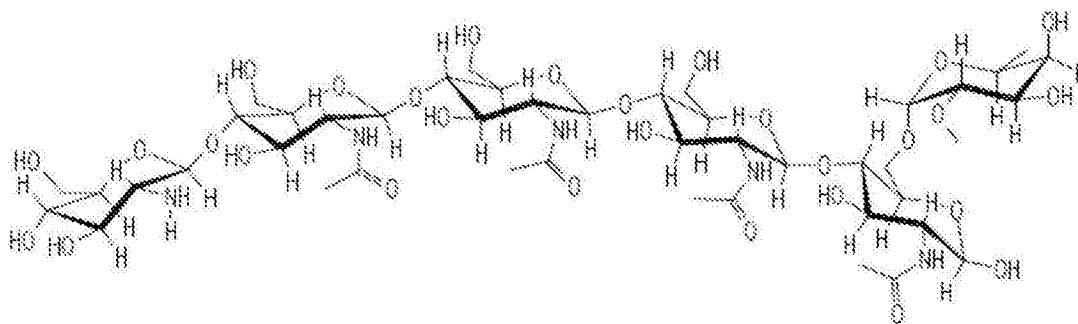
1. 一种增强玉米植物生长的方法, 包括用有效量的至少一种壳寡糖(CO)涂覆玉米种子和/或处理从所述玉米种子萌发的玉米植物;

所述至少一种CO由下式表示:

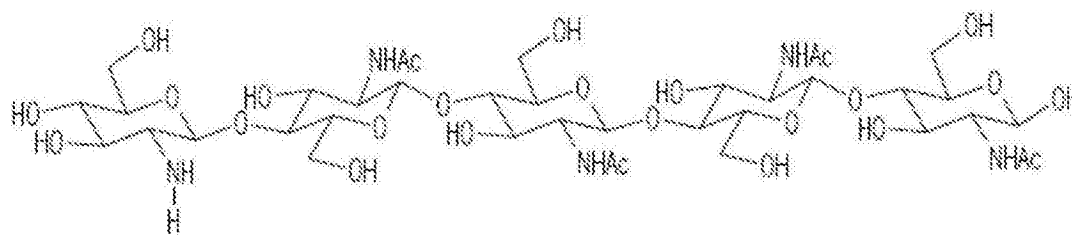


其中R₁和R₂各自独立地表示氢或甲基; R₃表示氢、乙酰基或氨基甲酰基; R₄表示氢、乙酰基或氨基甲酰基; R₅表示氢、乙酰基或氨基甲酰基; R₆表示氢、阿拉伯糖基、岩藻糖基、乙酰基、硫酸酯、3-O-S-2-O-MeFuc、2-O-MeFuc和4-O-AcFuc; R₇表示氢、甘露糖基或甘油; R₈表示氢、甲基或-CH₂OH; R₉表示氢、阿拉伯糖基或岩藻糖基; R₁₀表示氢、乙酰基或岩藻糖基; 且n表示0、1、2或3,

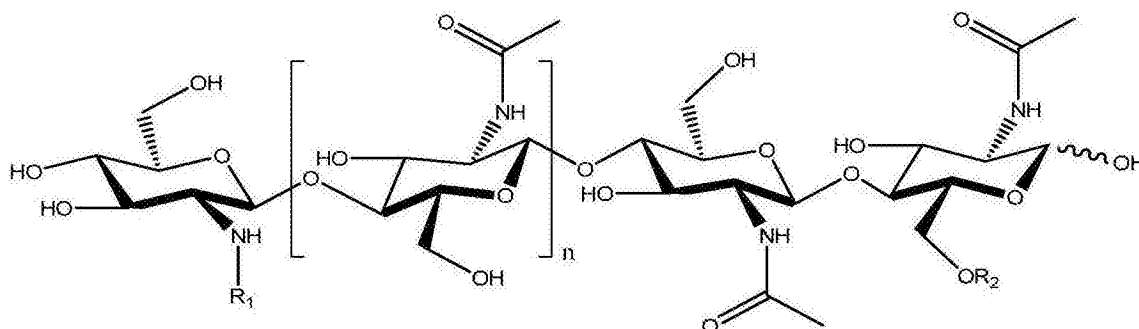
其中所述至少一种CO包含如下式所示的CO:



如下式所示的CO:



和/或如下式所示的CO:

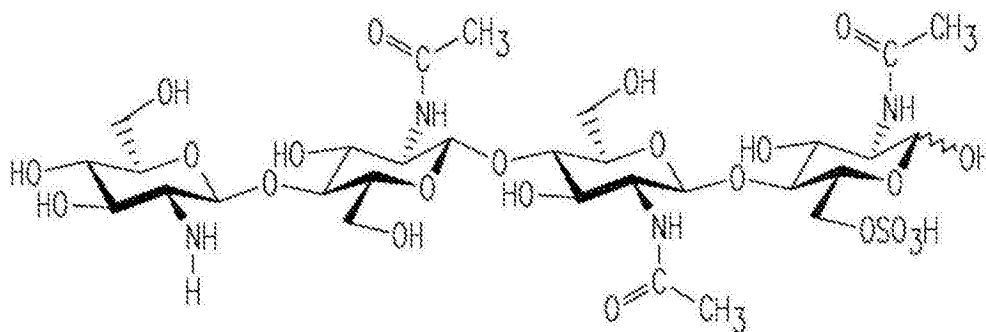


其中 $n=1$ 或 2 ; R_1 表示氢或甲基; 且 R_2 表示氢或 SO_3H ; 和

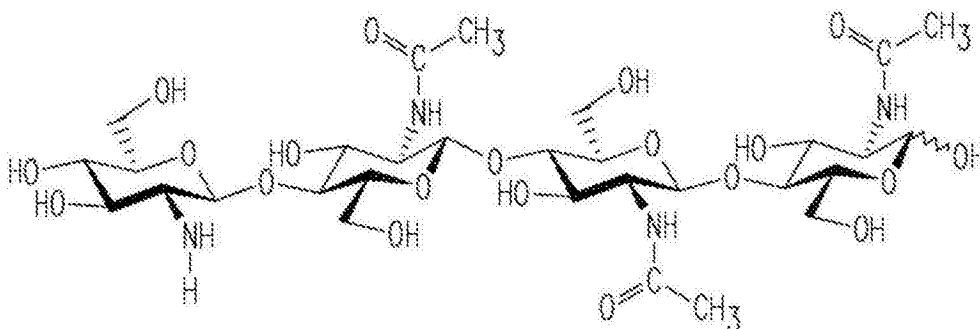
其中, 与未经处理的玉米植物和/或从未经处理的玉米种子收获的玉米植物相比, 在收获时所述玉米植物表现出按蒲式耳/英亩测量的增加的植物产量、增加的根数量、增加的根长度、增加的根质量、增加的根体积和增加的叶面积中的至少一种。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 与未经处理的玉米植物和/或从未经处理的玉米种子收获的玉米植物相比, 在收获时所述玉米植物表现出按蒲式耳/英亩测量的增加的植物产量。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述至少一种C0包含如下式所示的C0:



4. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述至少一种C0包含如下式所示的C0:



5. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述至少一种C0包含一种合成的C0。

6. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述至少一种C0包含一种重组的C0。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述重组C0为至少60%纯。

8. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述重组C0为至少70%纯。

9. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述重组C0为至少80%纯。

10. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述重组C0为至少90%纯。

11. 根据权利要求1所述的方法, 其中在种植之前或者在种植时将所述至少一种C0施用于所述玉米种子。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述至少一种C0的有效量为 10^{-5} 至 10^{-14} 摩尔。

13. 根据权利要求1所述的方法, 其中经由叶处理将所述至少一种C0施用于所述玉米植物。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述至少一种C0的有效量为 $1\mu g$ /英亩至 $30\mu g$ /英亩。

15. 根据权利要求1所述的方法, 进一步包括将至少一种农艺学有益的试剂施用于所述玉米种子和/或由所述玉米种子萌发的植物。

16. 根据权利要求1所述的方法, 进一步包括将至少一种痕量营养素施用于所述玉米种子和/或由所述玉米种子萌发的植物。

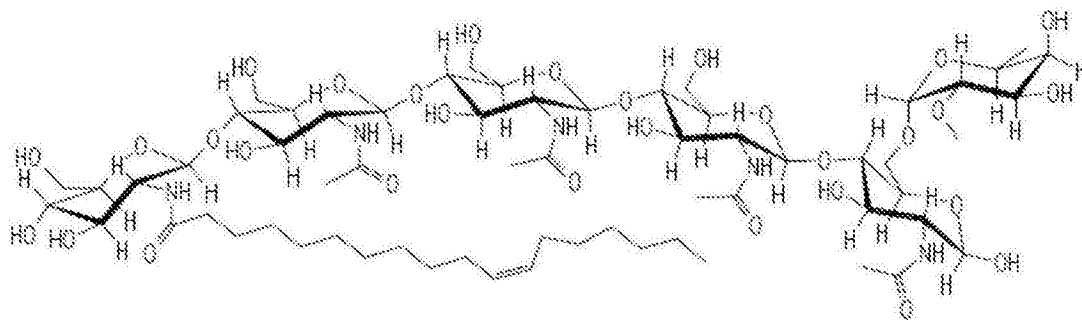
17. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述痕量营养素选自维生素和痕量矿物质。

18. 根据权利要求1所述的方法, 进一步包括将至少一种脂肪酸或其衍生物施用于所述玉米种子和/或由所述玉米种子萌发的植物。

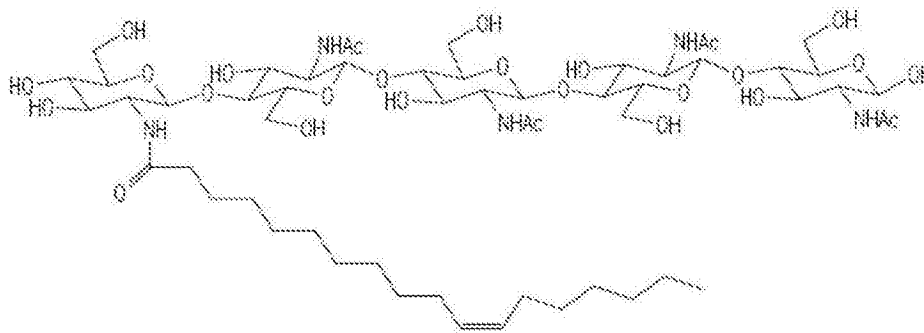
19. 根据权利要求1所述的方法, 进一步包括将至少一种植物信号分子施用于所述玉米种子和/或由所述玉米种子萌发的植物。

20. 根据权利要求1所述的方法, 进一步包括将至少一种脂壳寡糖(LCO)施用于所述玉米种子和/或由所述玉米种子萌发的植物。

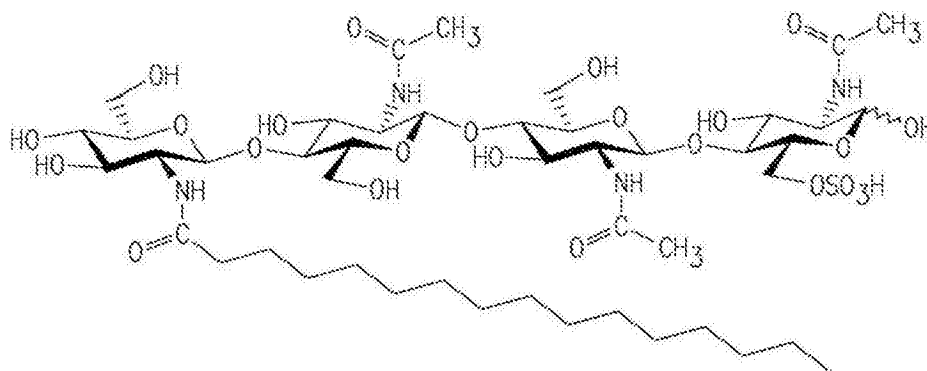
21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述至少一种LCO包含一种如下式所示的LCO:



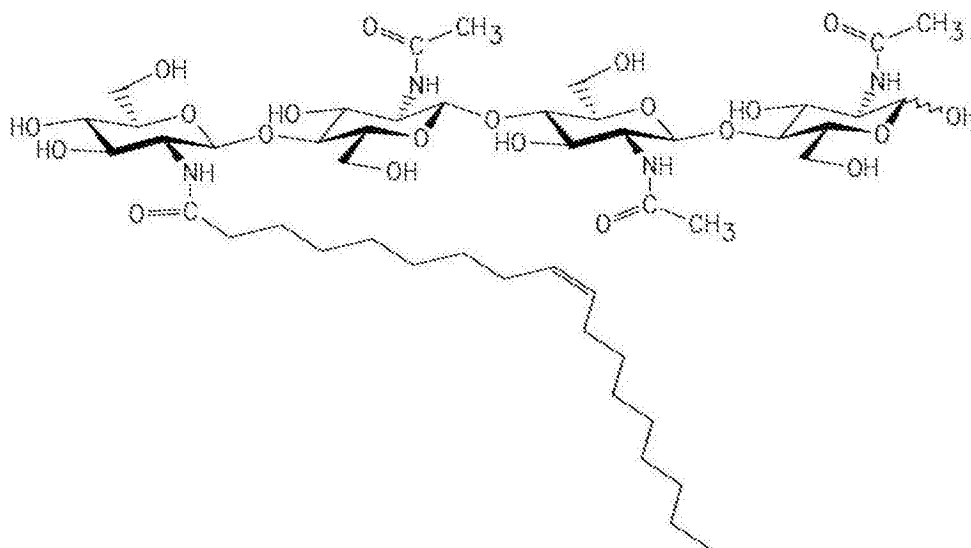
22. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述LCO包含一种如下式所示的LCO:



23. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述LCO包含一种由下式所示的LCO:



24. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述LCO包含一种由下式所示的LCO:



25. 根据权利要求19所述的方法, 其中所述至少一种植物信号分子包含选自下组的一种植物信号分子: 几丁质化合物、类黄酮、茉莉酸及其衍生物、亚油酸及其衍生物、亚麻酸及其衍生物和卡里金及其衍生物。

26. 根据权利要求1所述的方法, 进一步包括将一或多种除草剂、杀虫剂和/或杀真菌剂施用于所述玉米种子和/或由所述玉米种子萌发的植物。

27. 根据权利要求1所述的方法, 进一步包括将至少一种解磷微生物施用于所述玉米种子和/或由所述玉米种子萌发的植物。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中至少一种解磷微生物包括真菌青霉属(*Penicillium*)的菌株。

29. 根据权利要求27所述的方法, 其中至少一种解磷微生物包括拜赖青霉(*P. bilaiae*)的菌株。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中所述拜赖青霉的菌株选自NRRL 50162、NRRL 50169、ATCC 20851、ATCC 22348和ATCC 18309。

31. 根据权利要求27所述的方法, 其中至少一种解磷微生物包括*P. gaestrivorus*的菌株。

用于增强玉米生长的壳寡糖和方法

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用于植物生长,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(临种植前)、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施用于种子和/或植物。与在'899公开中的情况一样,'958公开教导了在临种植前对种子进行处理。

[0005] 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,烟中所含的卡里金(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。

[0006] 但是,对于促进或增强植物生长的体系仍存在需求。

发明内容

[0007] 本发明的第一方面涉及一种增强玉米植物生长的方法,包括:a)用有效量的至少一种壳寡糖(CO)来处理(例如,施用于)玉米种子或从种子萌发的玉米植物,其中,与未经处理的玉米植物或者从未经处理的玉米种子收获的植物相比较,在收获时上述玉米植物表现出以下的至少一种: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。

[0008] 在一些实施方式中,使用至少两种CO。在一些实施方式中,对玉米种子的处理包括将至少一种CO直接施用于种子,然后其可以进行种植或者在种植之前储存一段时间。对玉米种子的处理还可以包括间接处理,例如,通过将至少一种CO引入至土壤中(在本领域中称

为犁沟施用)。在另外的实施方式中,可以例如经由叶喷将至少一种C0施用于由种子萌发的玉米植物。该方法可以进一步包括使用其它的农艺学有益的试剂,例如痕量营养素、脂肪酸及其衍生物、植物信号分子((C0以外的),例如脂壳寡糖、(C0以外的)几丁质化合物、类黄酮、茉莉酸及其衍生物、亚油酸及其衍生物、亚麻酸及其衍生物和卡里金及其衍生物)、除草剂、杀真菌剂和杀虫剂以及解磷微生物。

[0009] 如总结了温室中和田地中进行的实验的工作实施例所说明的,本发明的方法所取得的结果显示,将至少一种C0施用于玉米种子或从种子萌发的玉米植物,引起增强的植物生长。这些结果据信是出人意料的,特别是就以下观点而言:已知C0与系统获得性抗性(SAR)有关,但并非必要地参与植物生长的直接促进。本文所述的结果表明,在一些情形中,本发明的方法实现了基本上等同的LC0所实现的促进植物生长的效果,或者在一些情形中,胜过LC0所实现的促进植物生长的效果。获自温室实验的结果在这一方面特别显著,在于其在基本上无病的条件下进行。

附图说明

[0010] 图1a和2a显示了可用于实施本发明的壳寡糖化合物(C0)的化学结构。

[0011] 图1b和2b显示了与图1a和2a中的C0对应的脂壳寡糖化合物(LC0)的化学结构,其也可用于实施本发明。

[0012] 图3a和4a显示了其它可用于实施本发明的C0的化学结构。

[0013] 图3b和4b显示了与图3a和3b中的C0对应的Myc-因子的化学结构,其也可用于实施本发明。

[0014] 图5(试验1)和图6(试验2)是柱状图,显示了用图2a所示的C0处理玉米种子与用图2b所示的LC0相比较以及用几丁质酶产生的(非本发明的)几丁质化合物的混合物的效果,其以地上部(shoot)、根部的平均干重和总干重(地上部和根部的组合干重)表示。

[0015] 图7是饼状图,显示了用单独的或者与两种不同脂肪酸之一组合的图2a所示的C0处理玉米种子与图2b所示的LC0相比较以及用水的效果,其以种子萌发的百分比表示。

[0016] 图8是如下的图,显示了用单独的或者与两种不同脂肪酸之一组合的图2a所示的C0处理玉米种子与图2b所示的LC0相比较、用单独的每种脂肪酸和用对照的效果,其以种子萌发的百分比表示。

[0017] 图9是柱状图,显示了用单独的或者与图2b所示的LC0组合的图2a所示的C0处理玉米种子与用图2b所示的LC0处理和用水处理相比较的效果,其以平均植物干重表示。

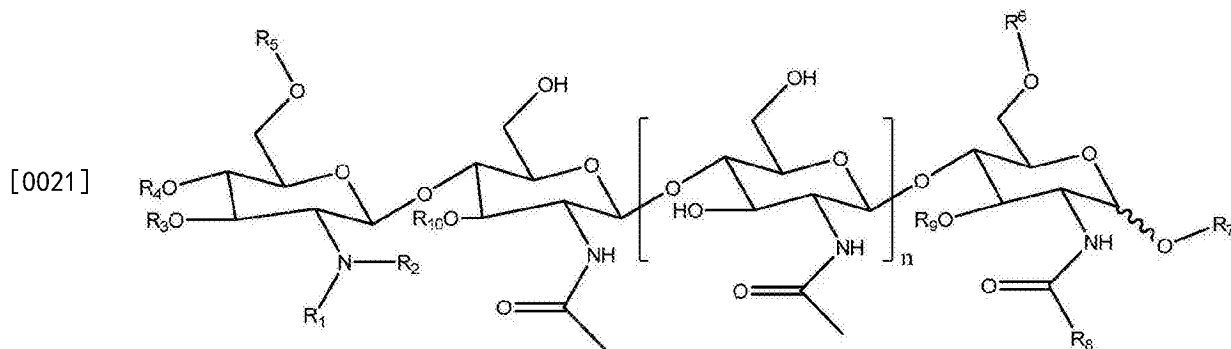
具体实施方式

[0018] 壳寡糖

[0019] 本领域已知C0是 β -1-4连接的N-乙酰基葡萄糖胺结构,其被鉴别为几丁质寡聚物,也被鉴别为N-乙酰基壳寡糖。C0具有独特且不同的侧链修饰,这使其与几丁质分子 $[(C_8H_{13}NO_5)_n]$,CAS No.1398-61-4和壳聚糖分子 $[(C_8H_{11}NO_4)_n]$,CAS No.9012-76-4不同。参见,例如,Hamel等人,Planta232:787-806(2010)(例如图1,其显示了几丁质、壳聚糖、Nod因子(LC0)和对应的C0(其缺少18C、16C或20C乙酰基)的结构)。本发明的C0相对于几丁质和壳聚糖也是相对水溶性的,在一些实施方式中,如下文所述,是五聚的。描述可适用于本发明

的C0的结构和制备的代表性文献如下:Muller等人,Plant Physiol.124:733-9(2000)(例如,其中图1);Van der Holst等人,Current Opinion in Structural Biology,11:608-616(2001)(例如,其中图1);Robina等人,Tetrahedron58:521-530(2002);D'Haeze等人,Glycobiol.12(6):79R-105R(2002);Rouge等人,Chapter27,"The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates" in Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer Science;Wan等人,Plant Cell121:1053-69(2009);PCT/F100/00803(9/21/2000);和Demont-Caulet等人,Plant Physiol.120(1):83-92(1999)。

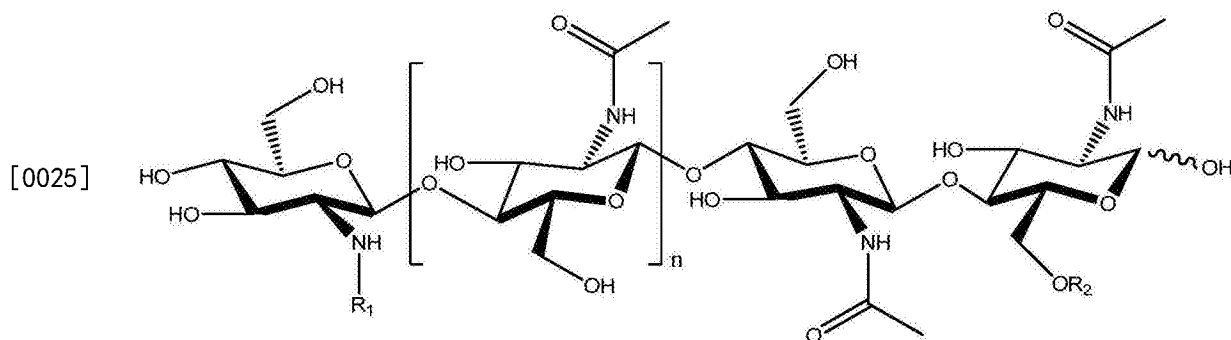
[0020] 就结构而言C0与LC0的不同之处主要在于其缺少侧边的(pendant)脂肪酸链。可以用于实施本发明的源自根瘤菌的C0以及其非天然出现的合成衍生物可以用下式表示:



[0022] 其中R₁和R₂各自独立地表示氢或甲基;R₃表示氢、乙酰基或氨基甲酰基;R₄表示氢、乙酰基或氨基甲酰基;R₅表示氢、乙酰基或氨基甲酰基;R₆表示氢、阿拉伯糖基、岩藻糖基、乙酰基、硫酸酯、3-O-S-2-O-MeFuc、2-O-MeFuc和4-O-AcFuc;R₇表示氢、甘露糖基或甘油;R₈表示氢、甲基或-CH₂OH;R₉表示氢、阿拉伯糖基或岩藻糖基;R₁₀表示氢、乙酰基或岩藻糖基;且n表示0、1、2或3。对应的根瘤菌LC0的结构描述于D'Haeze等人中,同上。

[0023] 图1a和2a中显示了两种可适用于本发明的C0。它们分别对应于大豆慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)和豌豆根瘤菌蚕豆生物变异型(*Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*)产生的LC0,它们分别与大豆和豌豆共生相互作用,但缺少脂肪酸链。图1b和2b中显示了这些根瘤菌产生的对应的LC0(其也可用于实施本发明)。

[0024] 其它的可适用于实施本发明的C0的结构很容易从获自(即,分离自和/或提纯自)菌根真菌例如球囊菌(*Glomerocycota*)群组的真菌(例如根内球囊霉(*Glomus intraradices*))的LC0得到。参见,例如W02010/049751和Maillet等人,Nature469:58-63(2011)(其中所述的LC0也称作“Myc因子”)。代表性的源自菌根真菌的C0由以下结构表示:



[0026] 其中n=1或2;R₁表示氢或甲基;且R₂表示氢或SO₃H。图3a和4a分别显示了两种可适用于本发明的其他C0,其一是硫酸化的,另一种是非硫酸化的。它们对应于由菌根真菌根内

球囊霉所产生的两种不同的LCO,其显示于图3b和4b中(并且也可用于实施本发明)。

[0027] CO可以是合成的或重组的。合成型CO的制备方法描述于,例如以下文献中:Robina,同上。例如使用大肠杆菌(*E.coli*)作为宿主制备重组型CO的方法是本领域已知的。参见,例如,Dumon等人,ChemBioChem7:359-65(2006);Samain等人,Carbohydrate Res.302:35-42(1997);Cottaz等人,Meth.Eng.7(4):311-7(2005)和Samain等人,J.Biotechnol.72:33-47(1999)(例如其中的图1,其显示了可以在具有基因nodBCHL的不同组合的大肠杆菌中重组产生的CO的结构)。出于本发明的目的,该至少一种CO与几丁质、壳聚糖和使用几丁质作为起始原料酶促产生的其它壳寡糖在结构上是不同的。

[0028] 出于本发明的目的,在其中至少一种CO是重组型的实施方式中,该至少一种重组型CO为至少60%纯,例如至少60%纯,至少65%纯,至少70%纯,至少75%纯,至少80%纯,至少85%纯,至少90%纯,至少91%纯,至少92%纯,至少93%纯,至少94%纯,至少95%纯,至少96%纯,至少97%纯,至少98%纯,至少99%纯,直至100%纯。

[0029] 玉米种子可以用至少一种CO以多种方式例如喷洒或滴液进行处理。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该至少一种CO,并通过连续处理系统(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,从而使经过处理的种子相对快速地干燥。按照这样方式,大量的种子可以被有效处理。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和装置可以商购自许多供应商,例如Bayer CropScience(Gustafson)。

[0030] 在另一实施方式中,处理涉及用该至少一种CO涂覆玉米种子。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。浸泡通常需要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。

[0031] 在涉及在施用至少一种CO后将玉米种子储存的那些实施方式中,在储存期间的任意部分时间内,CO对种子的附着并不是关键性的。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,CO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等人,J.Exp.Bot.55(408):1635-40(2004)。申请人还认为,在处理上,CO朝着发育中的幼根扩散,并激活共生和发育基因,引起植物根构型的改变。尽管如此,在期望的程度上,含有CO的组合物还可以包含粘着剂或涂覆剂。出于美观的目的,组合物还可以含有涂覆聚合物和/或着色剂。

[0032] 至少一种CO的量能有效增强生长,从而在收获时,该玉米植物与未经(任一活性物)处理的玉米植物或从未经(任一活性物)处理的玉米种子收获的玉米植物相比,表现出按蒲式耳/英亩测量的增加的植物产量、增加的根数量、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中的至少一种。用于处理玉米种子的该至少一种CO的有效量,以浓度单位表示,通常为约 10^{-5} 至约 10^{-14} M(摩尔浓度),在一些实施方式中为约 10^{-5} 至约 10^{-

^{11}M , 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 μg /英担(cwt)种子, 在一些实施方式中为约2至约70 μg /cwt种子, 在一些其他实施方式中为约2.5至约3.0 μg /cwt种子。

[0033] 出于间接处理玉米种子即犁沟处理的目的, 该至少一种C0的有效量通常为约1 μg /英亩至约70 μg /英亩, 在一些实施方式中为约50 μg /英亩至约60 μg /英亩。出于施用至植物的目的, C0的有效量通常为约1 μg /英亩至约30 μg /英亩, 在一些实施方式中为约11 μg /英亩至约20 μg /英亩。

[0034] 玉米种子可以用至少一种C0在临种植前或在种植时进行处理。在种植时的处理可以包括如上所述的直接施用至种子, 或者在一些其他实施方式中通过将活性物引入至土壤中(领域内已知为犁沟处理)。在涉及处理种子之后进行储存的那些实施方式中, 种子随后可以根据标准技术包装在例如50-1b或100-1b袋或散装袋或容器中。种子可以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个月或者更久。

[0035] 其它农艺学有益的试剂

[0036] 本发明可以进一步包括将玉米种子或从种子萌发的玉米植物用至少一种农业/农艺学有益的试剂处理。如本文和本领域所使用的, 术语“农业或农艺学有益”是指当试剂施用至玉米种子或玉米植物时, 导致玉米植物特性例如植物挺立、生长(例如, 如关联C0所定义的)或强健度与未经处理的玉米种子或玉米植物相比有所提高(其在统计学上可以是显著的)。可以将这些试剂与至少一种C0配制在一起, 或者经由单独配制而施用至种子或植物。可用于实施本发明的这类试剂的代表性实例包括痕量营养素(例如, 维生素和痕量矿物质)、脂肪酸及其衍生物、(C0以外的)植物信号分子、除草剂、杀真菌剂和杀虫剂以及解磷微生物。

[0037] 痕量营养素

[0038] 可用于实施本发明的代表性维生素包括泛酸钙、叶酸、生物素和维生素C。可用于实施本发明的痕量矿物质的代表性实例包括硼、氯、锰、铁、锌、铜、钼、镍、硒和钠。

[0039] 用于处理玉米种子的至少一种痕量营养素的量以浓度单位表达时, 范围通常为10 ppm至100 ppm, 在一些实施方式中, 为大约2 ppm至大约100 ppm。以重量单位表达时, 在一个实施方式中, 有效量范围通常为大约180 μg /英担(cwt)种子至大约9 mg/英担(cwt)种子, 在一些实施方式中, 当施用于叶子时, 为大约4 μg /植物至大约200 μg /植物。换言之, 出于处理种子的目的, 至少一种痕量营养素的有效量范围通常为30 μg /英亩至大约1.5 mg/英亩, 在一些实施方式中, 当在叶上施用, 为大约120 mg/英亩至大约6 g/英亩。

[0040] 脂肪酸

[0041] 可用于实施本发明的代表性脂肪酸包括其为天然出现的LC0上的取代基的脂肪酸, 例如硬脂酸和棕榈酸。其它可以使用的脂肪酸包括饱和C12~18脂肪酸, 其(除棕榈酸和硬脂酸以外)包括月桂酸和肉豆蔻酸, 以及不饱和C12~18脂肪酸, 例如肉豆蔻烯酸、棕榈油酸、顺式-6-十六碳烯酸(sapienic acid)、油酸、反油酸、11-十八烯烯酸(vaccenic acid)、亚油酸、亚麻酸和反亚油酸(linoelaidic acid)。亚油酸和亚麻酸在茉莉酸(其如下文中所述, 也是用于本发明目的的农艺学有益的试剂)的生物合成过程中产生。亚油酸和亚油酸

(及其衍生物)据报道是根际细菌(rhizobacteria)nod基因表达或LCO产生的诱导物。参见,例如,Mabood,Fazli,"Linoleic and linolenic acid induce the expression of nod genes in Bradyrhizobium japonicum,"USDA3,May17,2001。

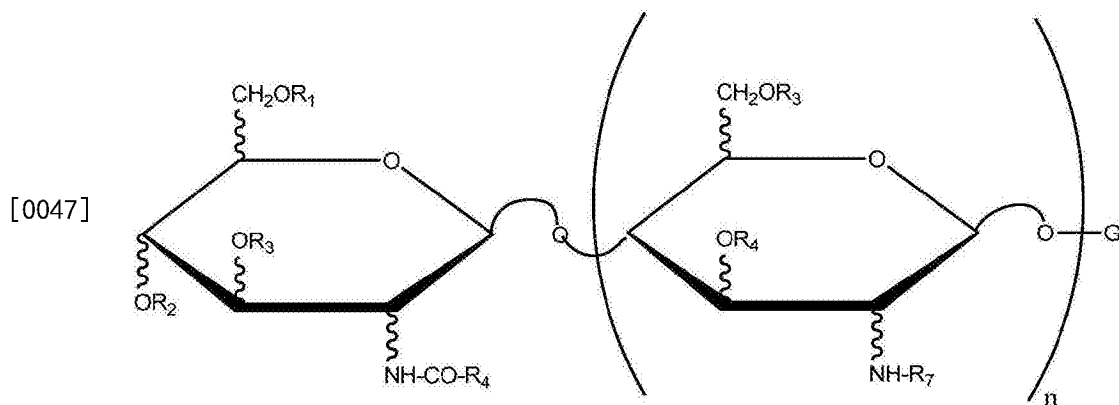
[0042] 可用于实施本发明的脂肪酸的有用衍生物包括酯、酰胺、糖苷和盐。代表性的酯是其中脂肪酸例如亚油酸和亚麻酸的羧基已被--COR基取代的化合物,其中R是--OR¹基,其中R¹为:烷基,例如C₁~C₈无支链或支链的烷基,如甲基、乙基或丙基;烯基,例如C₂~C₈无支链或支链的烯基;炔基,例如C₂~C₈无支链或支链的炔基;具有例如6~10个碳原子的芳基;或具有例如4~9个碳原子的杂芳基,其中杂芳基中的杂原子可以是例如N、O、P或S。代表性的酰胺是其中脂肪酸例如亚油酸和亚麻酸的羧基已被--COR基取代的化合物,其中R是NR²R³基,其中R²和R³独立地为:氢;烷基,例如C₁~C₈无支链或支链的烷基,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。脂肪酸例如亚油酸和亚麻酸的合适的盐包括,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。这些盐可以通过将脂肪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。

[0043] 用于处理玉米种子或玉米植物的脂肪酸或其衍生物的量通常为该至少一种C0的量的大约10%至大约30%,在一些实施方式中,为大约25%。

[0044] 植物信号分子

[0045] 本发明还可以包括将玉米种子或玉米植物用C0以外的植物信号分子处理。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,导致相比未经处理的玉米植物或从未经处理的玉米种子收获的玉米植物而言增加的玉米植物生长,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;(C0以外的)几丁质化合物;类黄酮;茉莉酸、亚油酸和亚麻酸及其衍生物(同上);和卡里金及其衍生物。

[0046] 在领域内也称为共生Nod信号或Nod因子的脂壳寡糖化合物(LCO)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。LCO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。参见,例如,Denarie等人,Ann.Rev.Biochem.65:503-35(1996);Hamel等人,同上;Prome等人,Pure&Appl.Chem.70(1):55-60(1998)。LCO的例子如以下式I所示:



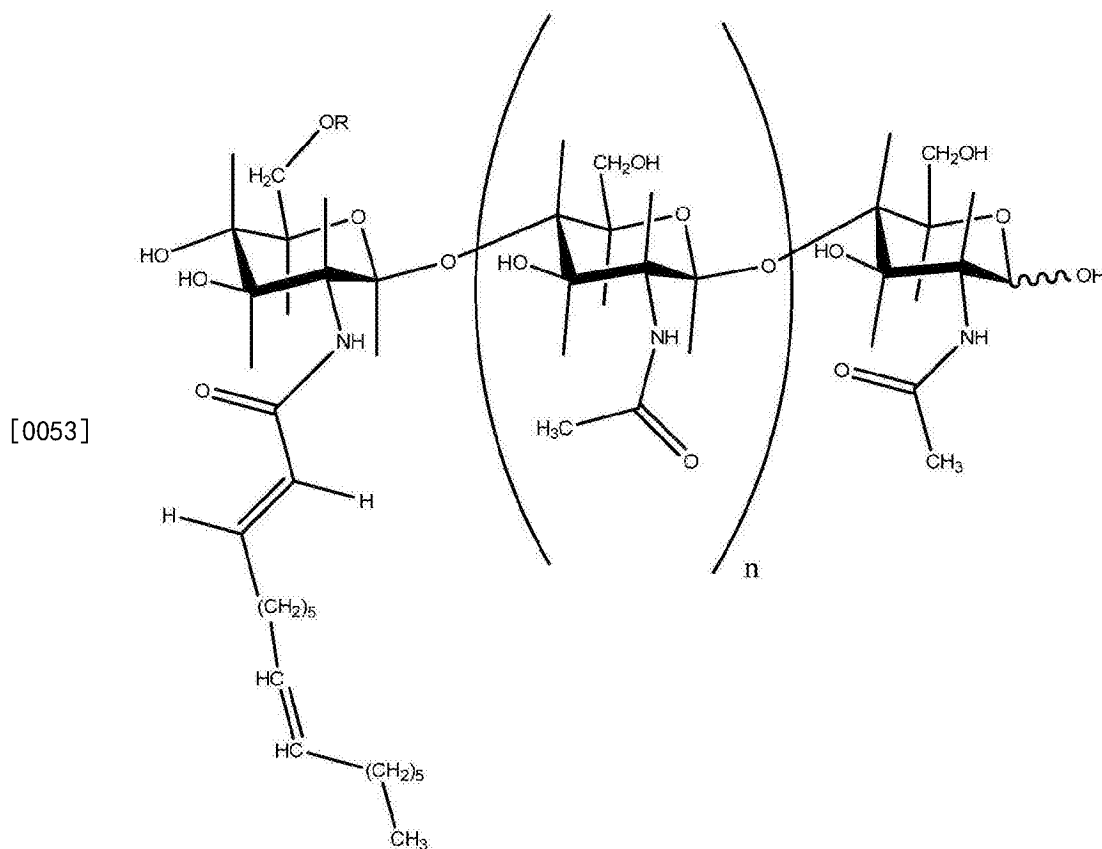
[0048] 其中：

[0049] 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，

[0050] 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基甲酰基，

[0051] R_4 表示含有至少12个碳原子的单、二或三不饱和的脂肪链，且n是1~4的整数。

[0052] LC0可以得自（分离自和/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（*Sinorhizobium* sp.）和固氮根瘤菌（*Azorhizobium* sp.）。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：



[0054] 其中，R表示H或 $\text{CH}_3\text{CO}-$ ，且n等于2或3。

[0055] 更加具体的LC0包括NodRM、NodRM-1、NodRM-3。当被乙酰化时（ $R=\text{CH}_3\text{CO}-$ ），它们

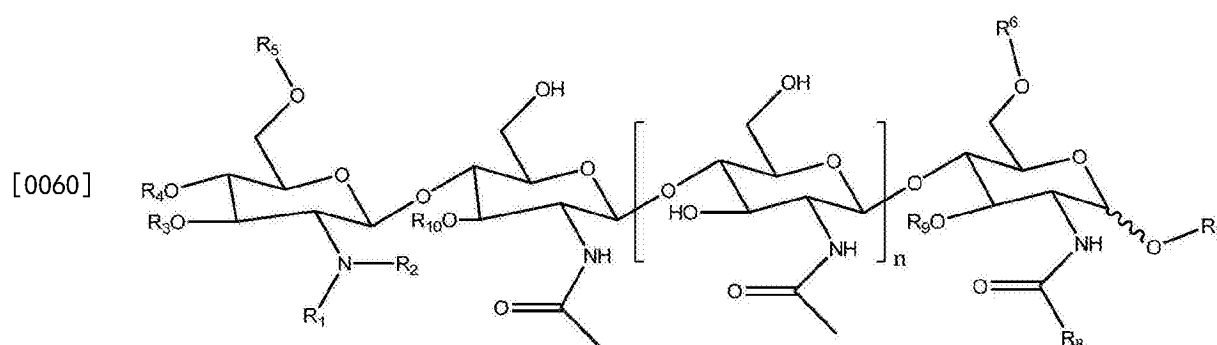
分别变成AcNodRM-1和AcNodRM-3(美国专利第5,545,718号)。

[0056] 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。

[0057] 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(*Azorhizobium*)、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的菌株中获得(即,分离和/或提纯)。

[0058] 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。在本发明的实施中,给定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,从而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种植前或在种植的一周或更短时间内处理的种子而收获的植物相比,实现按蒲式耳/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。

[0059] 因此,通过进一步的实例,可用于实施本发明的LC0及其非天然出现的衍生物由下式表示:

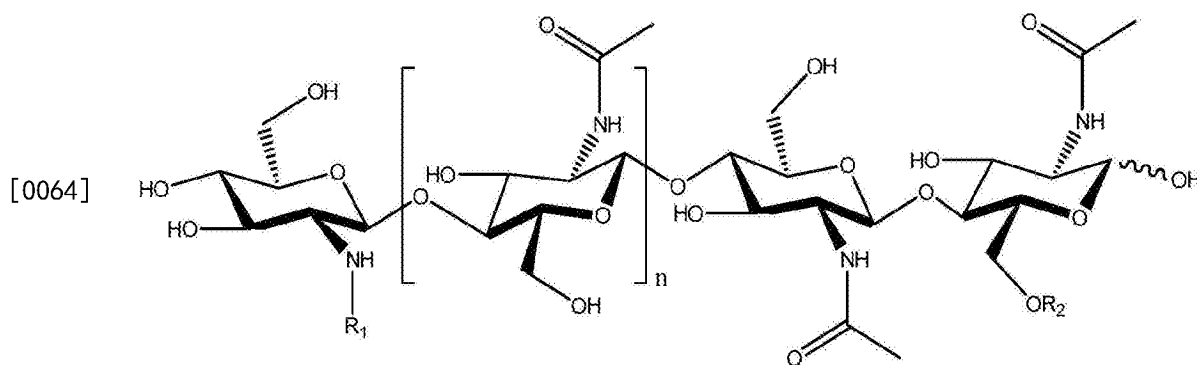


[0061] 其中R₁表示C_{14:0}、3OH-C_{14:0}、异-C_{15:0}(iso-C_{15:0})、C_{16:0}、3-OH-C_{16:0}、异-C_{15:0}、C_{16:1}、C_{16:2}、C_{16:3}、异-C_{17:0}、异-C_{17:1}、C_{18:0}、3OH-C_{18:0}、C_{18:0}/3-OH、C_{18:1}、OH-C_{18:1}、C_{18:2}、C_{18:3}、C_{18:4}、C_{19:1}氨基甲酰基、C_{20:0}、C_{20:1}、3-OH-C_{20:1}、C_{20:1}/3-OH、C_{20:2}、C_{20:3}、C_{22:1}和C₁₈₋₂₆(ω -1)-OH(根据D'Haeze等人,同上,其包括C₁₈、C₂₀、C₂₂、C₂₄和C₂₆羟基化种类以及C_{16:1} Δ 9、C_{16:2} (Δ 2,9)和C_{16:3} (Δ 2,4,9));R₂表示氢或甲基;R₃表

示氢、乙酰基或氨基甲酰基;R₄表示氢、乙酰基或氨基甲酰基;R₅表示氢、乙酰基或氨基甲酰基;R₆表示氢、阿拉伯糖基、岩藻糖基、乙酰基、硫酸酯、3-O-S-2-O-MeFuc、2-O-MeFuc和4-O-AcFuc;R₇表示氢、甘露糖基或甘油;R₈表示氢、甲基或-CH₂OH;R₉表示氢、阿拉伯糖基或岩藻糖基;R₁₀表示氢、乙酰基或岩藻糖基;且n表示0、1、2或3。该结构所包括的天然出现的根瘤菌LCO的结构描述于以下文献中:D'Haeze等人,同上。

[0062] 通过再进一步其他的实例,图1b所示的获自大豆慢生根瘤菌的LCO可以用于处理大豆以外的豆科种子以及非豆科种子(例如玉米)。作为另一个例子,图2b所示的可获自豌豆根瘤菌的LCO(称作LCO-V(C18:1),SP104)也可以用于处理豌豆以外的豆科种子和非豆科植物。

[0063] 本发明还包括从菌根真菌例如球囊菌群组真菌(如根内球囊菌)获得(即,分离和/或提纯)的LCO的用途。获自这些真菌的代表性LCO的结构描述于W02010/049751和W02010/049751中(其中所述的LCO也称作“Myc因子”)。代表性的源自菌根真菌的CO及其非天然出现的衍生物由以下结构表示:



[0065] 其中n=1或2;R₁表示C16、C16:0、C16:1、C16:2、C18:0、C18:1 Δ⁹Z或C18:1 Δ¹¹Z;并且R₂表示氢或SO₃H。在一些实施方式中,LCO由菌根真菌产生,如图3b和4b所示。

[0066] 本发明还包括合成型LCO化合物例如W02005/063784中所述者以及通过基因工程产生的重组型LCO的用途。基本的天然出现的LCO结构可以含有在天然出现的LCO中发现的修饰或取代,例如以下文献中所述:Spaink, Crit. Rev. Plant Sci. 54:257-288(2000);和D'Haeze等人, Glycobiology 12:79R-105R(2002)。构建LCO的前体寡糖分子(CO,如下文所述,在本发明中也可用作植物信号分子)也可以通过基因工程改造的有机体合成,例如,如以下文献中所述:Samain等人, Carbohydrate Res. 302:35-42(1997);Cottaz等人, Meth. Eng. 7(4):311-7(2005);和Samain等人, J. Biotechnol. 72:33-47(1999)(例如,其中图1显示了可以在具有基因nodBCHL的不同组合的大肠杆菌中重组产生的LCO的结构)。

[0067] 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1b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。可以使用如上所述的壳寡糖(CO)作为产生合成型LCO的起始原料。出于本发明的目的,重组型LCO为至少60%纯,例如至少60%纯,至少65%纯,至少70%纯,至少75%纯,至少

80%纯,至少85%纯,至少90%纯,至少91%纯,至少92%纯,至少93%纯,至少94%纯,至少95%纯,至少96%纯,至少97%纯,至少98%纯,至少99%纯,直至100%纯。

[0068] 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)。还参见,Jung等人,Carbohydrate Polymers67:256-59(2007);Khan等人,Photosynthetica40(4):621-4(2002)。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.)。

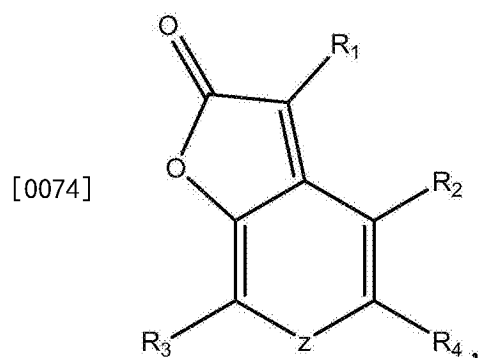
[0069] 类黄酮是具有两个芳族环由三碳桥连接的一般结构的酚类化合物。类黄酮由植物产生并具有多种功能,例如,作为有益的信号传导分子,以及作为对抗昆虫、动物、真菌和细菌的保护物质。类黄酮的分类包括查耳酮、花青素、香豆素、黄酮、黄烷醇、黄酮醇、黄烷酮和异黄酮。参见,Jain等人,J.Plant Biochem.&Biotechnol.11:1-10(2002);Shaw等人,Environmental Microbiol.11:1867-80(2006)。

[0070] 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。

[0071] 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(其包括亚油酸和亚麻酸(其在以上关联脂肪酸及其衍生物进行描述))可以用于实施本发明。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。比如,亚油酸和亚麻酸、茉莉酸酮酯(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。

[0072] 可用于实施本发明的茉莉酸的有用衍生物包括酯、酰胺、糖苷和盐。代表性的酯是其中茉莉酸的羧基已被 $-\text{COR}$ 基取代的化合物,其中 R 是 $-\text{OR}^1$ 基,其中 R^1 为:烷基,例如 $\text{C}_1\sim\text{C}_8$ 无支链或支链的烷基,如甲基、乙基或丙基;烯基,例如 $\text{C}_2\sim\text{C}_8$ 无支链或支链的烯基;炔基,例如 $\text{C}_2\sim\text{C}_8$ 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茉莉酸的羧基已被 $-\text{COR}$ 基取代的化合物,其中 R 是 NR^2R^3 基,其中 R^2 和 R^3 独立地为:氢;烷基,例如 $\text{C}_1\sim\text{C}_8$ 无支链或支链的烷基,如甲基、乙基或丙基;烯基,例如 $\text{C}_2\sim\text{C}_8$ 无支链或支链的烯基;炔基,例如 $\text{C}_2\sim\text{C}_8$ 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。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。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。

[0073] 卡里金是插烯型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。这些化合物的实例由以下结构表示,或是其生物学可接受的盐:



[0075] 其中:Z是O、S或 NR_5 ; R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 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 、 COR_6 、 $\text{COOR}=\text{}$ 、卤素、 NR_6R_7 或 NO_2 ;且 R_5 、 R_6 和 R_7 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 $\text{R}_1=\text{CH}_3$, R_2 、 R_3 、 $\text{R}_4=\text{H}$)、2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 $\text{R}_4=\text{H}$)、7-甲基-2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中 R_1 、 R_2 、 $\text{R}_4=\text{H}$, $\text{R}_3=\text{CH}_3$)、5-甲基-2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中 R_1 、 R_2 、 $\text{R}_3=\text{H}$, $\text{R}_4=\text{CH}_3$)、3,7-二甲基-2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中 R_1 、 $\text{R}_3=\text{CH}_3$, R_2 、 $\text{R}_4=\text{H}$)、3,5-二甲基-2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中 R_1 、 $\text{R}_4=\text{CH}_3$, R_2 、 $\text{R}_3=\text{H}$)、3,5,7-三甲基-2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中 R_1 、 R_3 、 $\text{R}_4=\text{CH}_3$, $\text{R}_2=\text{H}$)、5-甲氧基甲基-3-甲基-2H-呋喃并[2,3-c]吡喃-2-酮(其中 $\text{R}_1=\text{CH}_3$,

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。这些分子也称为卡里金。参见, Halford, 同上。

[0076] 用于处理玉米种子的至少一种植物信号分子的量, 以浓度单位表示, 通常为约10⁻⁵至约10⁻¹⁴M(摩尔浓度), 在一些实施方式中为约10⁻⁵至约10⁻¹¹M, 在一些其他实施方式中为约10⁻⁷至约10⁻⁸M。以重量单位表示, 有效量通常为约1至约400μg/英担(cwt)种子, 在一些实施方式中为约2至约70μg/cwt种子, 在一些其他实施方式中为约2.5至约3.0μg/cwt种子。

[0077] 出于间接处理玉米种子即犁沟处理的目的, 至少一种植物信号分子的有效量范围通常为1μg/英亩至大约70μg/英亩, 在一些实施方式中, 为大约50μg/英亩至大约60μg/英亩。出于施用至玉米植物的目的, 至少一种植物信号分子的有效量范围通常为1μg/英亩至大约30μg/英亩, 在一些实施方式中, 为大约11μg/英亩至大约20μg/英亩。

[0078] 除草剂、杀真菌剂和杀虫剂

[0079] 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、灭草喹、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。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 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。

[0083] 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。

[0084] 解磷微生物、固氮生物(根瘤菌菌剂)和/或菌根真菌

[0085] 本发明可以进一步包括将玉米种子用解磷微生物处理。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。

[0086] 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。

[0087] 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 agglomerans*)、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*)。

[0088] 在具体的实施方式中,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.variable*)、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*)。

[0089] 在一个具体的实施方式中,青霉属菌种是拜赖青霉。在另一具体的实施方式中,拜赖青霉菌株选自ATCC20851、NRRL50169、ATCC22348、ATCC18309、NRRL50162(Wakelin等人,2004.*Biol Fertil Soils*40:36-43)。在另一具体的实施方式中,青霉属菌种是*P.gaestrivorus*菌株,例如NRRL50170(参见,Wakelin,同上)。

[0090] 在一些实施方式中,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,包括选自以下的一种菌种: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。

[0091] 在一些实施方式中,相同菌种的两个不同菌株也可以组合,例如,使用青霉属的至少两个不同菌株。使用至少两个不同的青霉属菌株的组合具有以下优点。当施用至已经含有不溶性(或难溶性)磷酸盐的土壤时,与仅使用一个青霉属菌株相比,组合真菌菌株的使用将引起植物可摄取的磷的量的增加。与单独使用单个菌株相比,这进而可以引起磷酸盐摄取的增加和/或土壤中生长的植物的产量的增加。菌株的组合还能使不溶性磷酸岩作用于有效磷量不足的土壤中的有效肥料。因此,在一些实施方式中,使用拜赖青霉的一个菌株和*P.gaestrivorus*的一个菌株。在其他实施方式中,两个菌株为NRRL50169和NRRL50162。在另外的实施方式中,至少两个菌株为NRRL50169和NRRL50170。在另外的实施方式中,至少两个菌株为NRRL50162和NRRL50170。

[0092] 解磷微生物可以使用本领域技术人员已知的任何适合方法进行制备,例如,使用

适当碳源的固态或液体发酵。解磷微生物优选以稳定孢子的形式进行制备。

[0093] 在一个实施方式中,解磷微生物是青霉属真菌。根据本发明的青霉属真菌可以使用固态或液体发酵以及适当的碳源而生长。青霉属分离株可以使用本领域技术人员已知的任何合适方法而生长。例如,真菌可以在例如马铃薯右旋糖琼脂或麦芽汁琼脂的固体生长介质上、或在含有合适的液体介质例如Czapek-Dox培养基或马铃薯右旋糖肉汤的摇瓶中进行培养。这些培养方法可以用在青霉菌接种物的制备中,该接种物用于处理(例如,涂覆)种子和/或应用至将要施用于土壤的农艺学上可接受的载体。本说明书中使用的术语“接种物”意在指代任意形式的解磷微生物,真菌细胞、菌丝体或孢子、细菌细胞或细菌孢子,其能够在温度、湿度等条件有利于真菌生长时在土壤上或土壤中增殖。

[0094] 青霉属孢子的固态生产可以通过接种固体介质例如泥炭或蛭石类基质或谷物而实现,谷物包括但不限于燕麦、小麦、大麦或稻。对灭菌的介质(通过高压灭菌或辐照而实现)接种适当青霉菌的孢子悬浮液($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$ cfu/ml),并依据基质将湿度调节至20~50%。将材料在室温下孵育2~8周。孢子也可以通过液体发酵而产生(Cunningham等人,1990.Can J Bot.68:2270-2274)。液体生产可以通过在能够根据本领域标准步骤而确定的适当pH和温度条件下在任何合适的介质例如马铃薯右旋糖肉汤或蔗糖酵母提取物培养基中培养真菌而实现。

[0095] 可以直接使用所得材料,或者可以收获孢子,经离心浓缩,配制并然后使用空气干燥、冷冻干燥、或流化床干燥技术进行干燥(Friesen等人,2005,Appl.Microbiol.Biotechnol.68:397-404),以生产可润湿的粉末。然后将可润湿的粉末悬浮于水中,施用至种子的表面,并使其在种植前干燥。可润湿的粉末可以与其他种子处理组合使用,其他种子处理例如但不限于,化学种子处理、载体(例如,滑石、粘土、高岭土、硅胶、高岭石)或聚合物(例如,甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮)处理。或者,合适的青霉菌的孢子悬浮液可以应用至合适的与土壤相容的载体(例如,泥炭类粉末或颗粒),达到适当的最终含水量。材料可以在使用前在室温下孵育,通常为约1天至约8周。

[0096] 除用于培养解磷微生物的成分(包括例如以上在青霉属培养中提及的成分)外,解磷微生物可以使用其他农艺学上可接受的载体进行配制。在本文中“载体”关联使用的术语“农艺学上可接受的”是指,任何可以用于将活性物递送至玉米种子、土壤或玉米植物的材料,并且优选载体能够添加(至种子、土壤或植物)而对植物生长、土壤结构、土壤排水等没有不利影响。合适的载体包括但不限于,小麦壳、糠、地面麦秆、泥炭类粉末或颗粒、石膏类颗粒和粘土(例如,高岭土、斑脱土、蒙脱石)。当将孢子加至土壤时,颗粒制剂将是优选的。作为液体、泥炭或可润湿粉末的制剂将适合于涂覆玉米种子。当用于涂覆玉米种子时,材料可以与水混合,应用至种子并使其干燥。其他载体的实例包括湿的糠,将其干燥、过筛并施用至事先涂覆有粘合剂如阿拉伯树胶的种子。在涉及单一组合物形式的活性物制剂的实施方式中,农艺学上可接受的载体可以是水性的。

[0097] 至少一种解磷微生物的量根据土壤的类型、土壤中存在的或加至其中的磷源和/或痕量营养素的量等而变化。合适的施用量可以通过针对各个特定情形的简单试验和错误实验而确定。通常,例如,对于青霉属,施用量落入每公顷0.001~1.0Kg真菌孢子和菌丝体(鲜重)的范围、或每个种子(当使用包衣种子时) $10^2 \sim 10^6$ 个菌落形成单位(cfu)的范围,或者在颗粒载体上施用每公顷 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{11}$ 个菌落形成单位。例如孢子形式的真菌细胞和

载体可以添加至根高度处的土壤中的种子行,或者可以用于在种植之前涂覆种子。

[0098] 在例如涉及使用至少两个解磷微生物菌株例如两个青霉菌株的实施方式中,商业肥料可以被添加至土壤中以替代(或者甚至连同)天然磷酸岩。磷源可以含有对于土壤为天然的磷源。在其他实施方式中,磷源被可以添加至土壤中。在一个实施方式中,磷源是磷酸岩。在另一实施方式中,磷源是制造的肥料。市售可得的制造的磷酸盐肥料有许多类型。一些常见类型为,含有磷酸一铵(MAP)、三过磷酸钙(TSP)、磷酸二铵、普通过磷酸盐和聚磷酸铵的肥料。所有这些肥料通过在大规模肥料制造设施中对不溶性天然磷酸岩进行化学加工而产生,且产品昂贵。通过本发明的方式,可以降低这些肥料施用至土壤的量并仍然维持从土壤中摄取的可相同量的磷。

[0099] 在另一实施方式中,磷源是有机的。有机肥料是指从天然来源获得的土壤改良剂,其至少保障最低限百分比的氮、磷酸盐和碳酸钾。实例包括植物和动物副产品、岩石粉末、海藻、接种物和调理剂。具体的代表性实例包括骨粉、肉粉、动物粪肥、堆肥、污水污泥或海鸟粪。

[0100] 其它肥料例如氮源、或其它土壤改良剂当然也可以在与解磷微生物大约相同的时间或在其它时间添加至土壤,只要该其它材料对真菌无毒性。

[0101] 现在在以下非限定性实施例方面对本发明进行说明。除非有相反说明,使用水作为对照(表示成“对照”或“CHK”)。

[0102] 实施例

[0103] 温室实验

[0104] 实施例1:玉米种子处理

[0105] 在温室中仅使用豌豆LC0、豌豆C0和通过酶促方法获自壳聚糖的C0混合物(在结构上不同于豌豆C0,在实施例中也称作“China C0”)进行两组种子处理实验。将杂交玉米种子(92L90, Peterson Farm, USA)用处理溶液(10^{-8} M)以3fl oz/100lbs种子的比率进行处理。将种子种植在含有1:1沙子:珍珠岩混合物的塑料盆中。让种子生长大约3-4周,然后将其收获,测量干重。

[0106] 获自两组实验的结果说明,本发明(豌豆C0)比非本发明的可比较LC0表现出更大的地上部、根部和总生物量的增加。对于第一组试验,C0相比LC0有11.84%的干重增加(图5)。在第二组试验中,C0相比LC0有12.63%的干重增加(图6)。China C0也可以视作是豌豆C0的替代来源,其与非本发明的LC0相比也表现出提高的植物干重增加。

[0107] 实施例2:陪替氏平皿(petriplates)中的玉米种子萌发

[0108] 将玉米种子铺在含有5ml处理溶液的陪替氏平皿中滤纸上。将玉米种子放置于潮湿的滤纸上萌发。类似地,将小麦种子(春小麦)放置于陪替氏平皿中。种植后5天观察玉米种子萌发的幼苗。收获根部,通过WinRhizo系统测量其长度。

[0109] 在玉米中,豌豆LC0、豌豆C0和具有棕榈酸的C0均表现出萌发增加(图7),它们相比对照还使幼苗的根长度显著增加。它们的效果没有统计学的差异,具有棕榈酸的C0萌发和根长度最高。对C0添加棕榈酸相比于LC0或C0似乎略微有益(并非统计学上)(图8)。

[0110] 实施例3:玉米种子施用

[0111] 将玉米种子用豌豆C0(10^{-8} M)和豌豆LC0(10^{-8} , 10^{-9} M)的不同组合处理。将种子在温室中种植在含有1:1沙子:珍珠岩混合物的塑料盆中。种植后10天收获幼苗,将其洗涤干净,

然后在烘箱中在60℃下干燥48小时。

[0112] 如图9所示,单独的C0(10^{-8} M)(指示为C08)和LC0(10^{-8} M)(指示为SP8)二者均使玉米幼苗干重增加。只有 10^{-9} LC0/ 10^{-8} C0组合使玉米幼苗干重增加高于豌豆LC0(SP)或豌豆C0。

[0113] 田地试验

[0114] 实施例4:玉米

[0115] 进行十六(16)组田地试验,以在施用于玉米叶子时对本发明的实施方式在粮食产率方面进行评价。田地试验在具有不同土壤特性和环境条件的8个状态下进行。

[0116] 试验中使用的处理剂为对照(水)、纯C0(壳寡糖)——C0-V(如图2a所示)和纯LC0(脂壳寡糖)——SP104(如图2b所示)。采用不同的市售玉米杂交种。将处理剂加入到草甘膦除草剂中,并在正常应用除草剂时喷射在叶子上。将4盎司/英亩处理剂与除草剂加水合并,并以5~10加仑/英亩的比率施用。玉米生长至成熟,收获,并测定粮食产率。

[0117] 表1

[0118]

	产率 (bu / A)		
	对照	LC0 (SP104)	CO (CO-V)
平均值 (N = 16)	192.6	196.8	201.8
响应 (bu / A)		4.2	9.2
响应增加 (对照的%)		2.2	4.8
正产率响应 (%)		75.0	93.8

[0119] 如对照和C0之间的比较所反映的,相比于对照,产率通过叶C0处理增加了9.2bu/A,导致产率增加4.8%,在93.8%的试验中发生正产率增加。

[0120] 与叶LC0响应相比较,C0平均产率为5.0bu/A更优,提供了2.6%更高的产率增加,具有正响应的试验为18.8%更优。

[0121] 因此,C0和LC0二者作为叶处理剂均提供了产率增加,但C0的表现至少两倍优于LC0。

[0122] 实施例5:玉米

[0123] 进行10组田地试验,以在种植之前施用于玉米种子时对本发明的实施方式在粮食产率方面进行评价。五组田地试验在5种状态下进行,

[0124] 5组试验在阿根廷进行。

[0125] 试验中使用的处理剂为对照(水)、纯C0(壳寡糖)——C0-V(如图2a所示)和纯LC0(脂壳寡糖)——SP104(如图2b所示)。C0和LC0处理剂为 1×10^{-8} 摩尔浓度,结果以 $1 \mu\text{g}$ /英亩施用。采用不同的市售玉米杂交种。在种植之前将3液盎司的处理剂施用于五十(50)磅种子。玉米生长至成熟,收获,并测定粮食产率。

[0126] 结果示于表2中。

[0127]

	产率 (bu / A)		
	对照	LCO (SP104)	CO (CO-V)
平均值 (N = 10)	181.5	192.6	188.0
响应 (bu / A)		11.1	6.5
响应增加 (对照的%)		6.1	3.6
正产率响应 (%)		90.0	80.0

[0128] 如对照和CO之间的比较所反映的,相比于对照,产率通过CO处理剂的种子施用增加了6.5bu/A,导致产率增加3.6%,在80.0%的试验中发生正产率增加。

[0129] CO与LCO之间相比较,CO平均产率要少4.6bu/A,导致在对照之上少2.5%的产率增加,在10组试验之间少10.0%的正产率响应。

[0130] CO和LCO处理剂二者在施用于玉米种子时均提供了在对照之上的产率增加,LCO提供的响应最高。

[0131] 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。所有这些公开物均并入本文以作参考,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为并入以作参考。

[0132] 尽管在此已参照具体实施方式描述了本发明,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,可以在不背离所附权利要求所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设计其他布置。

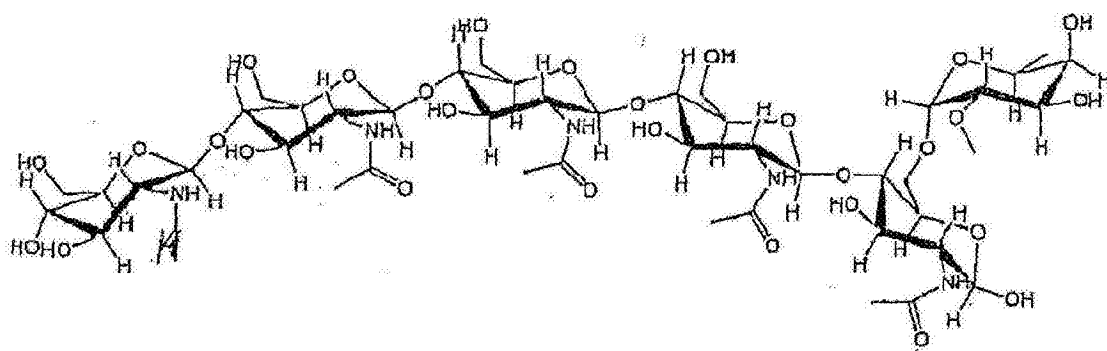


图1a

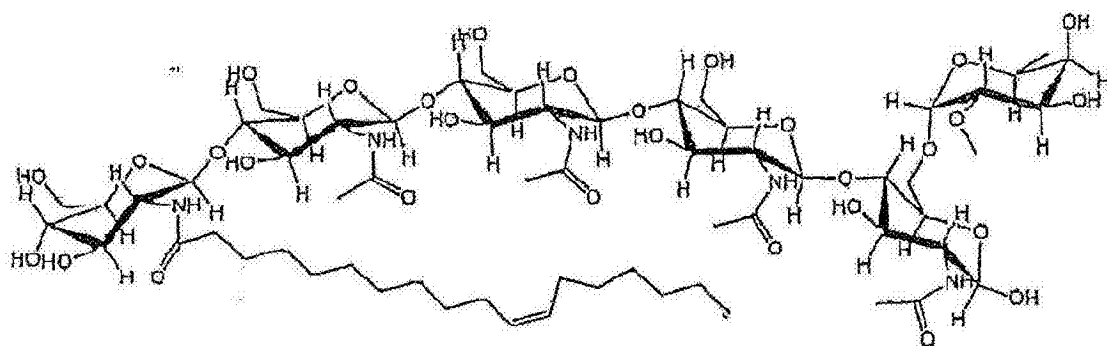


图1b

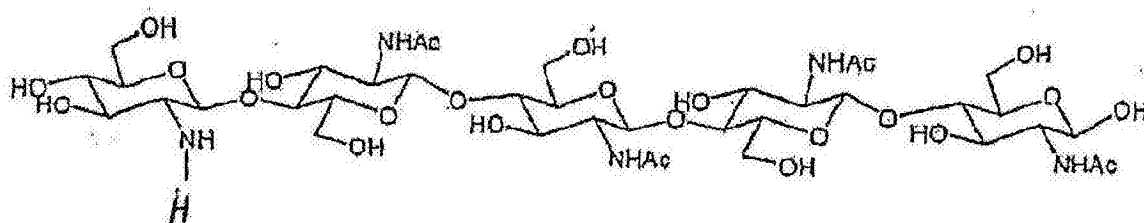


图2a

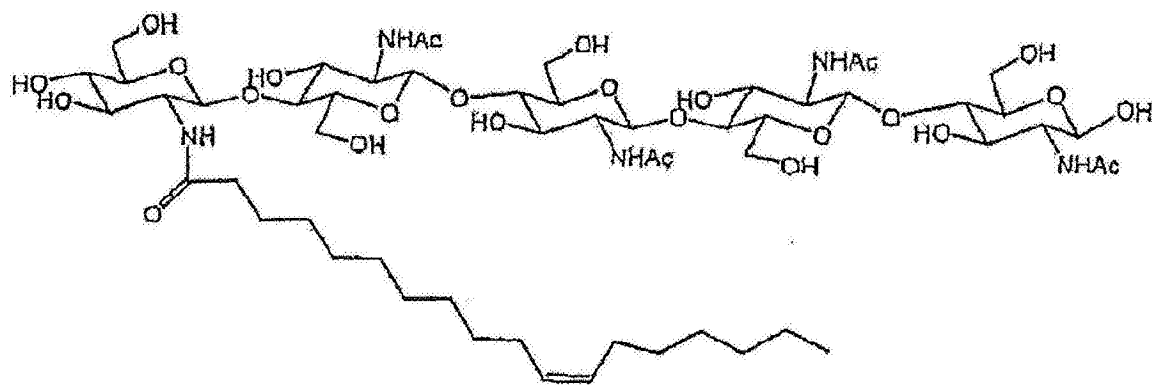


图2b

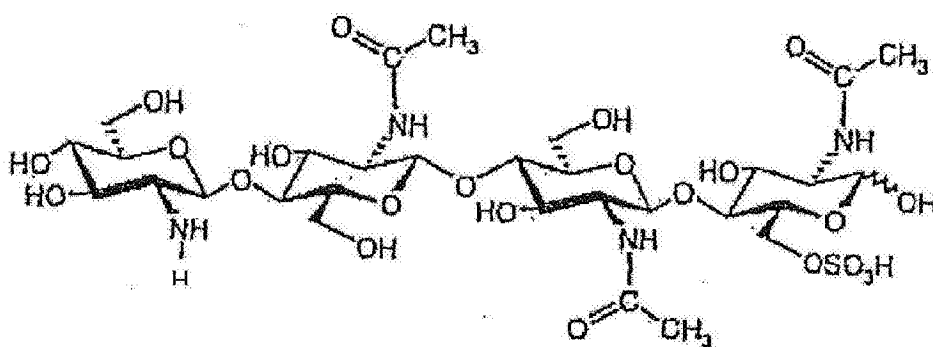


图3a

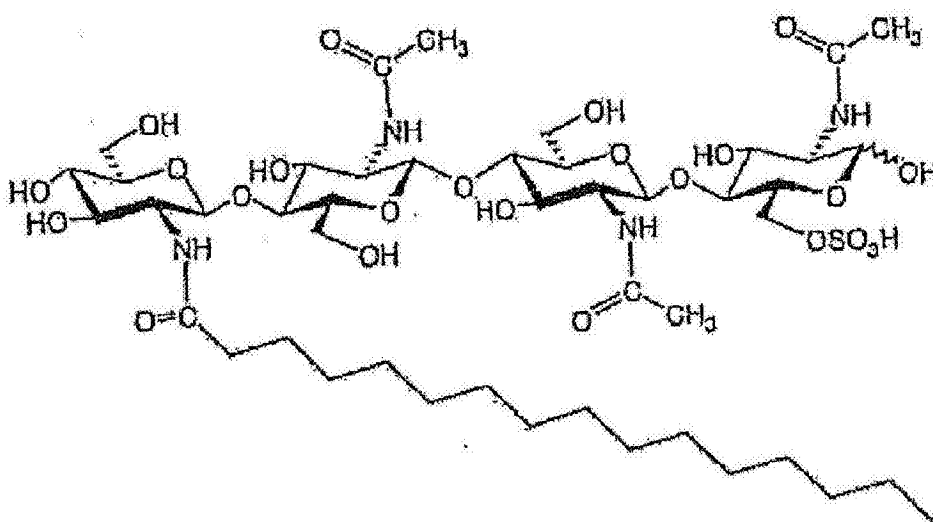


图3b

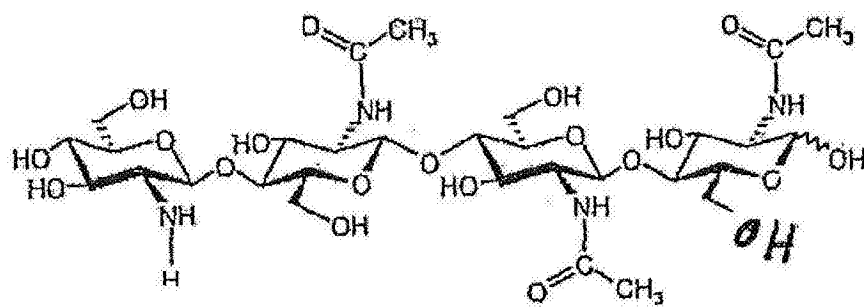


图4a

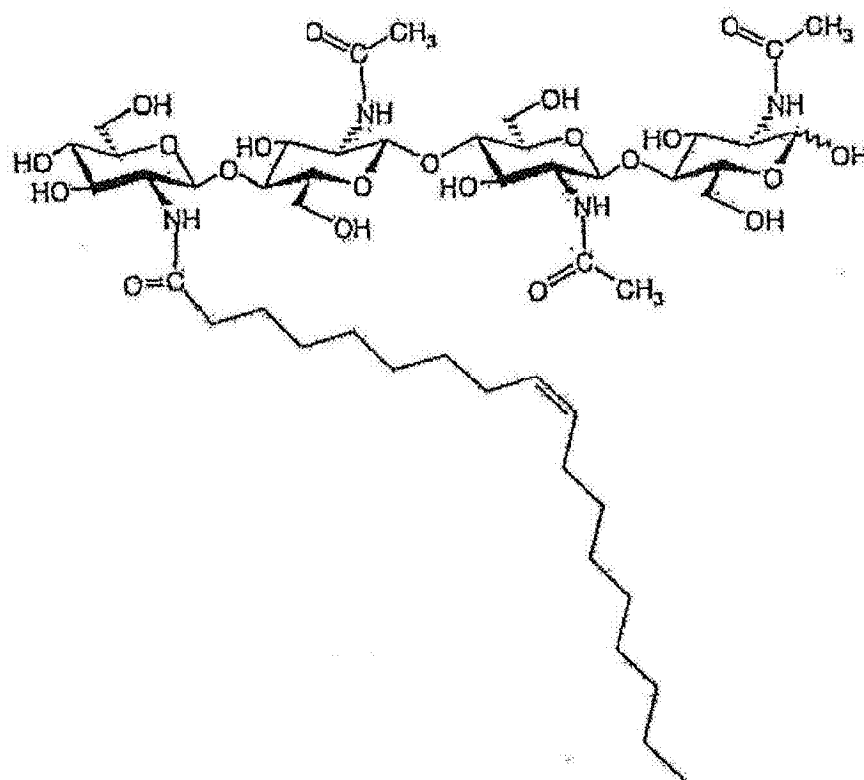


图4b

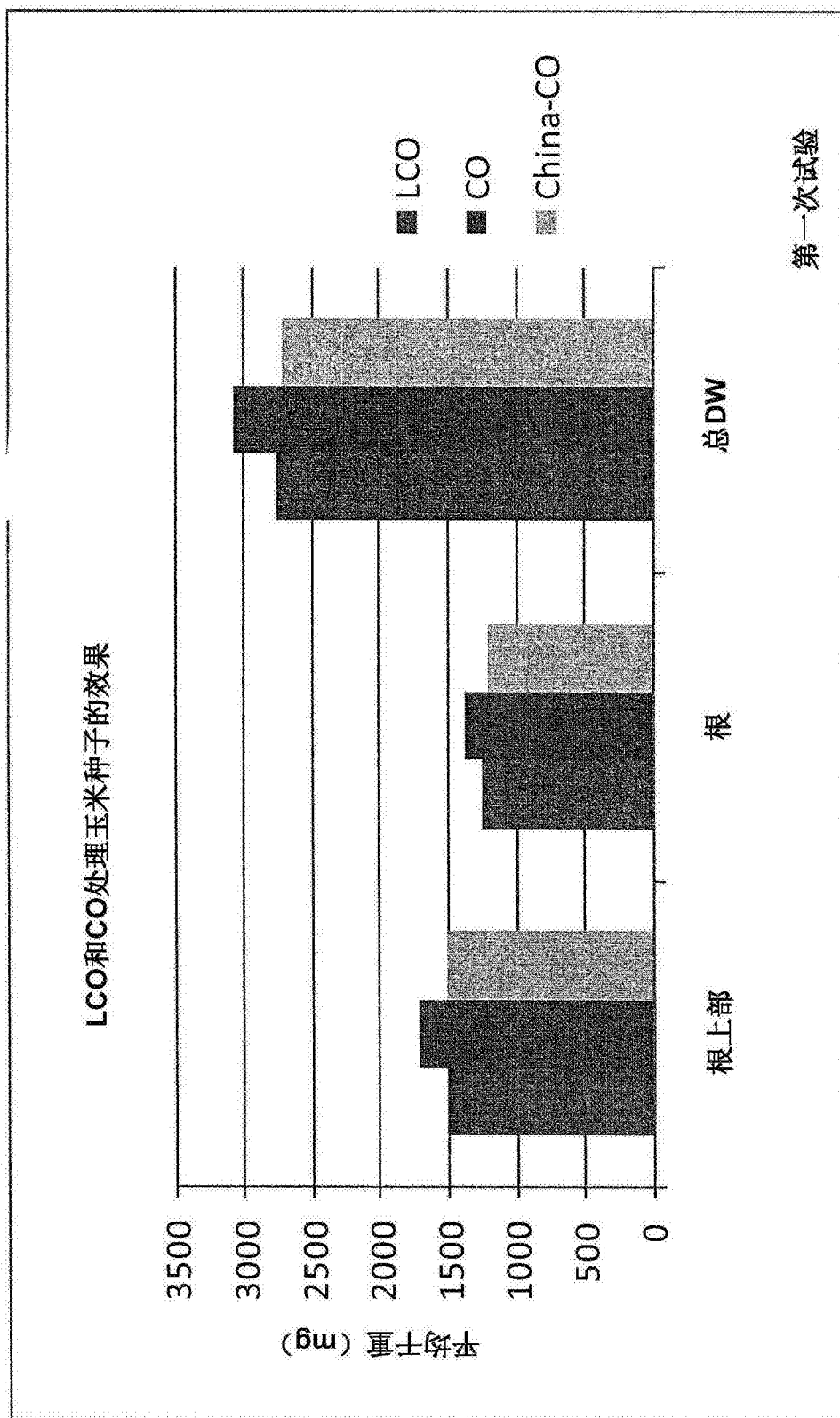


图5

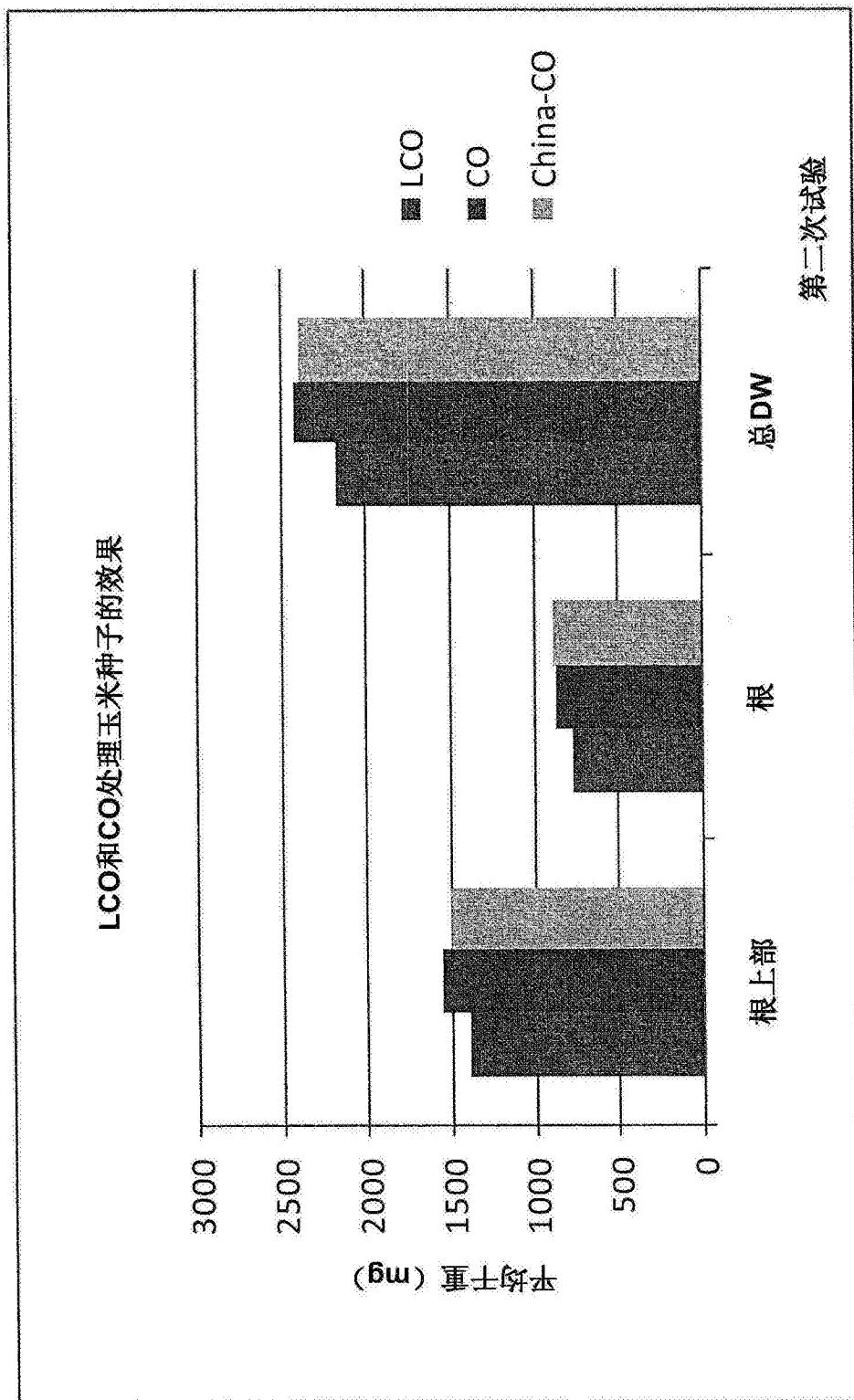


图6

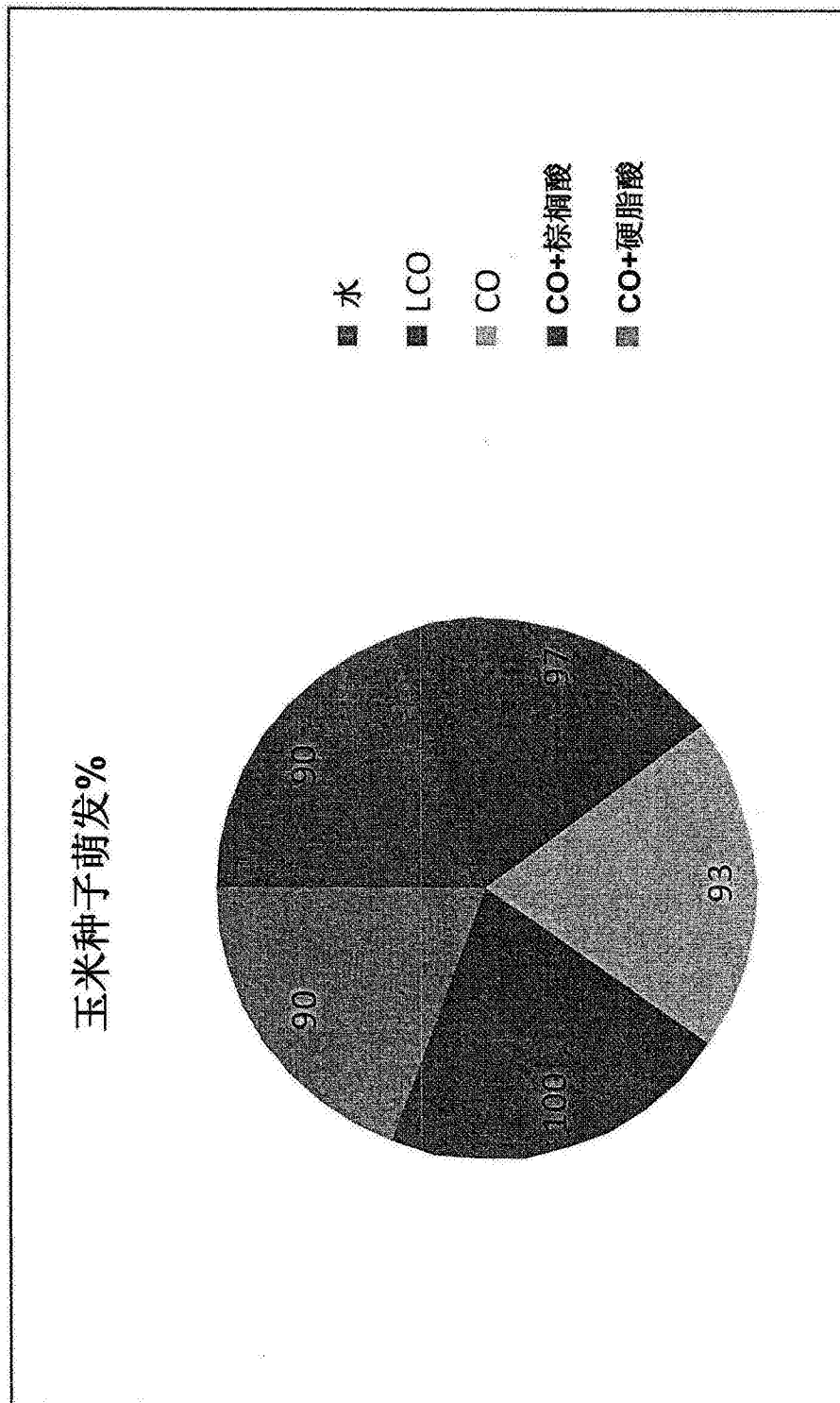


图7

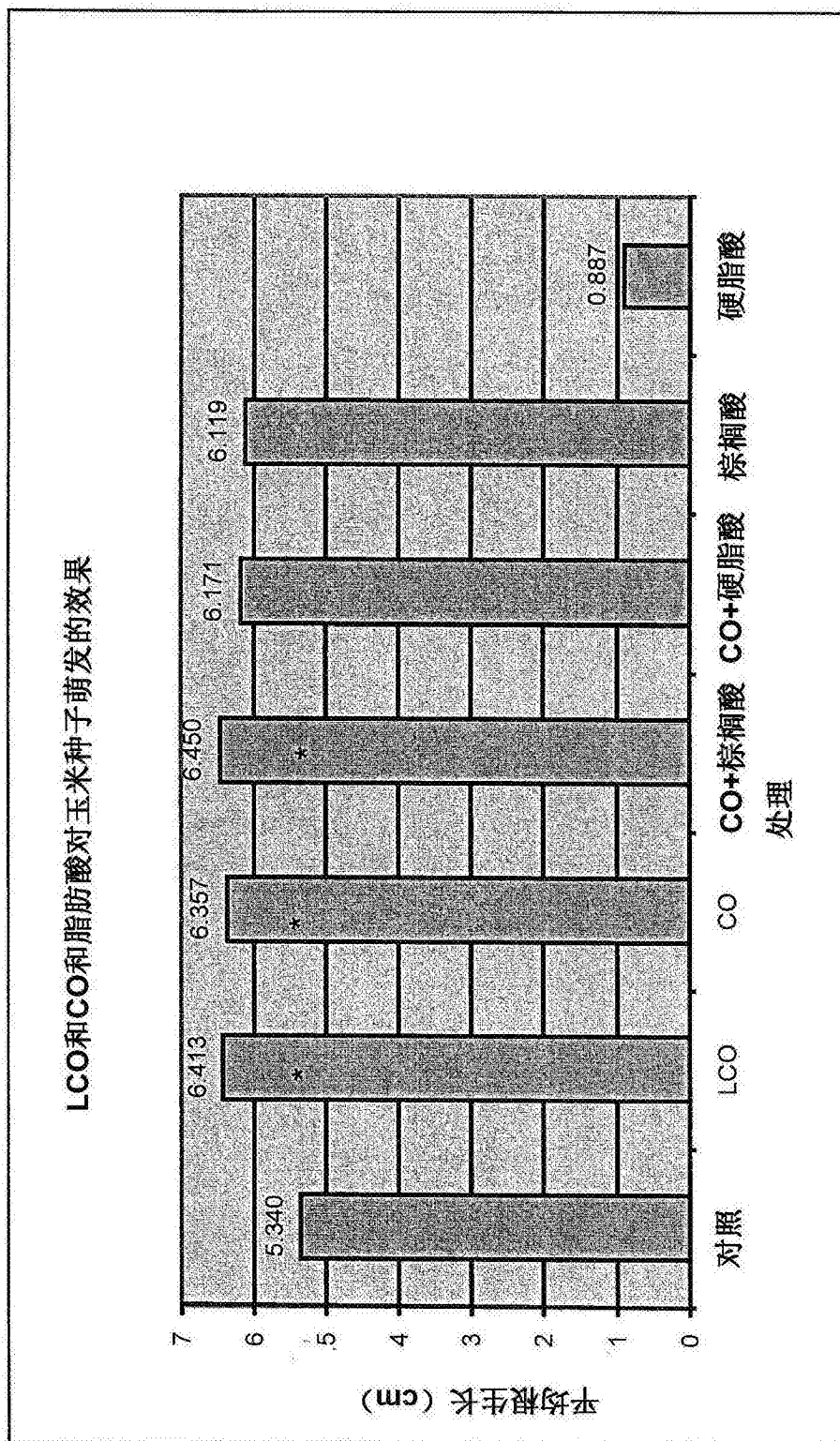


图8

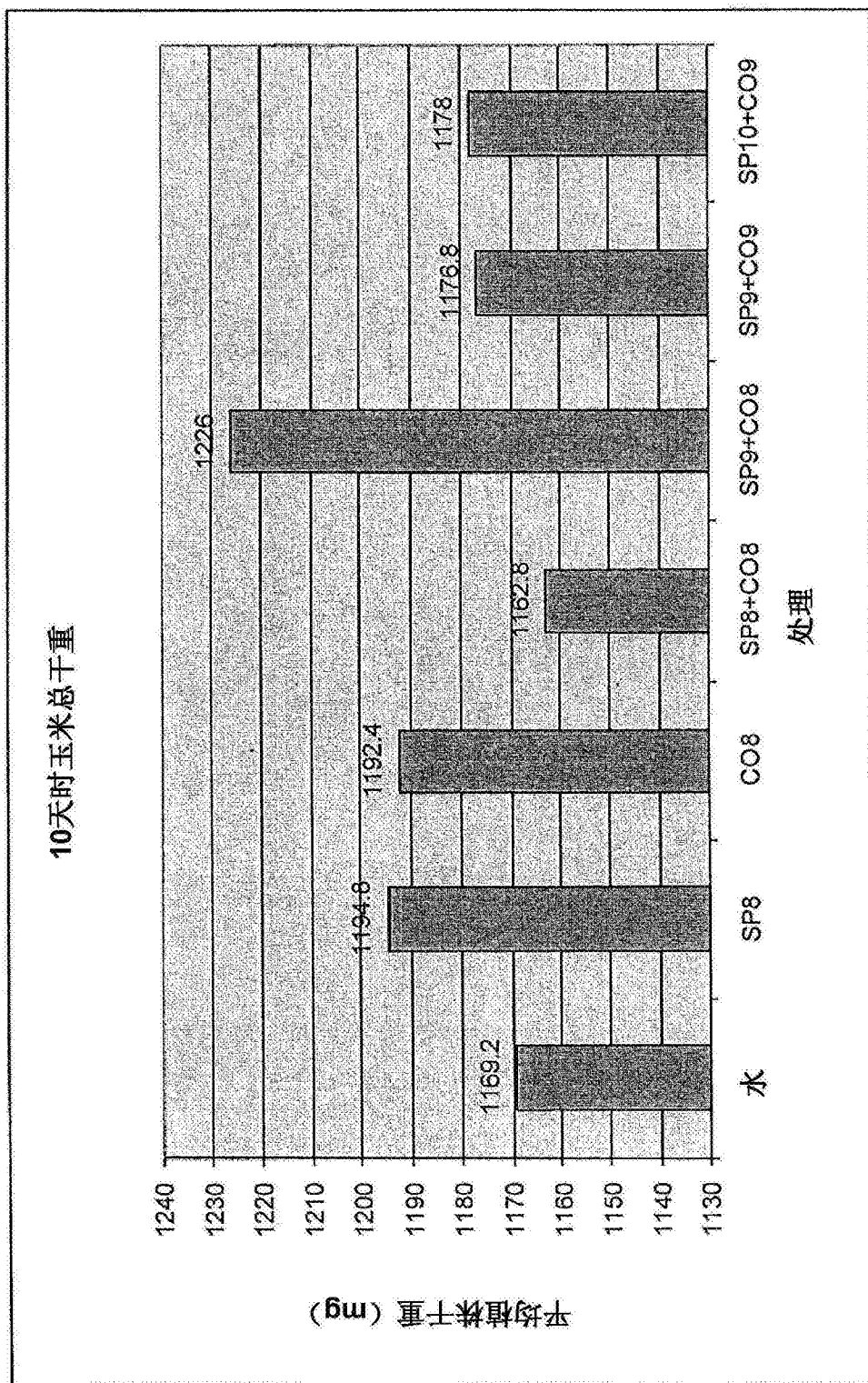


图9