



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103957714 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 30

(21) 申请号 201280025343. 2

地址 新西兰奥克兰

(22) 申请日 2012. 03. 26

(72) 发明人 S · R · 福特 T · R · 格拉瑞

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

61/467, 801 2011. 03. 25 US

代理人 胡晨曦 黄革生

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2013. 11. 25

(51) Int. Cl.

(86) PCT国际申请的申请数据

A01N 63/04 (2006. 01)

PCT/NZ2012/000046 2012. 03. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/134304 EN 2012. 10. 04

(83) 生物保藏信息

V08/025855 2008. 10. 14

NM06/00008 2006. 03. 03

NM06/00009 2006. 03. 03

NM06/00010 2006. 03. 03

NM05/44595 2005. 03. 16

NM06/00007 2006. 03. 03

NM05/44594 2005. 03. 16

NM05/44593 2005. 03. 16

(71) 申请人 百奥泰利加控股有限公司

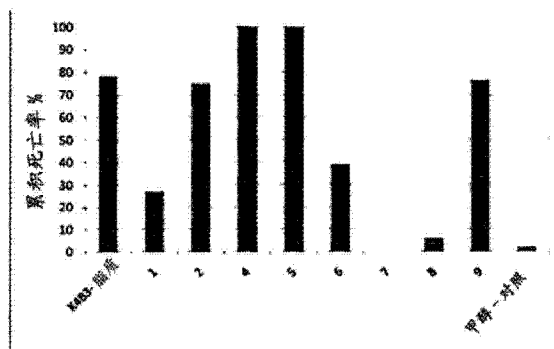
权利要求书5页 说明书39页 附图11页

(54) 发明名称

杀虫剂及其应用

(57) 摘要

本发明提供来自子囊菌门真菌的杀虫脂质和脂质部分、以及包含这些脂质和脂质部分的组合物及其制备方法。也提供使用脂质和脂质部分或者包含所述的脂质以及任选的1种或多种杀虫剂或昆虫致病剂(包括昆虫致病性的真菌)的组合物用于昆虫(例如致植物病的昆虫)的生物控制的方法。



1. 1 种或多种来自子囊菌门真菌的分离的、纯化的、或基本上纯的杀虫脂质或脂质部分。

2. 权利要求 1 的杀虫脂质或脂质部分,其中脂质或脂质部分是 1 种或多种非酸性脂质或非酸性脂质部分、或包含 1 种或多种非酸性脂质或非酸性脂质部分、或者由 1 种或多种非酸性脂质或非酸性脂质部分组成。

3. 权利要求 1 或 2 的脂质部分,其中脂质部分基本上不含酸性脂质。

4. 权利要求 1-3 中任意一项的脂质部分,其中脂质部分基本上不含游离脂肪酸。

5. 权利要求 1-4 中任意一项的脂质部分,其中脂质部分是以下任意 1 项或多项或具有以下任意 1 项或多项的鉴别特征:

a. 在本文中如图 4 中所示或如实施例 2 中所述的部分 1、部分 5 或部分 6;

b. 在本文中如图 7 中所示或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 4 或部分 5;

c. 在本文中如图 8 中所示或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 3、部分 4、部分 5 或部分 9;

d. 在本文中如图 8 中所示或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 3、部分 4、部分 5 或部分 9;

e. 在本文中如图 10 中所示或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 3、部分 4b、部分 5a、部分 5b 或部分 6。

6. 权利要求 1-5 中任意一项的脂质部分,其中部分 2、部分 3、部分 4b、部分 5a、部分 5b 或部分 6 的鉴别特征是如图 12a 至 12f 的任一所示的 MALDI-TOF 质谱 (MS) 图。

7. 根据权利要求 1-6 中任意一项的脂质部分,其中脂质部分是在本文中如图 10 中所示或如实施例 2 中所述的部分 3、或具有在本文中如图 10 中所示或如实施例 2 中所述的部分 3 的鉴别特征。

8. 权利要求 7 的脂质部分,其中鉴别特征是如图 13 中所示的 NMR 谱。

9. 根据权利要求 1-8 中任意一项的脂质,其中脂质是以下之一:

a. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 86 的质量的脂质,或

b. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 147 的质量的脂质,或

c. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 445 的质量的脂质,或

d. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 656 的质量的脂质,或

e. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 454 的质量的脂质,或

f. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 751 的质量的脂质,或

g. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 393 的质量的脂质,或

h. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 751 的质量的脂质,或

i. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 693 的质量的脂质,或

j. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 695 的质量的脂质,或

k. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 717 的质量的脂质,或

l. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 531 的质量的脂质,或

m. 通过 MS/MS 具有在 m/z 86.02 的质量的脂质,或

n. 通过 MS/MS 具有在 m/z 146.97 的质量的脂质,或

o. 通过 MS/MS 具有在 m/z 444.82 的质量的脂质,或

- p. 通过 MS/MS 具有在 m/z 655.94 的的质量的脂质,或
- q. 通过 MS/MS 具有在 m/z 454.19 的的质量的脂质,或
- r. 通过 MS/MS 具有在 m/z 750.66 的的质量的脂质,或
- s. 通过 MS/MS 具有在 m/z 393.39 的的质量的脂质,或
- t. 通过 MS/MS 具有在 m/z 750.67 的的质量的脂质,或
- u. 通过 MS/MS 具有在 m/z 692.69 的的质量的脂质,或
- v. 通过 MS/MS 具有在 m/z 694.72 的的质量的脂质,或
- w. 通过 MS/MS 具有在 m/z 716.71 的的质量的脂质,或
- x. 通过 MS/MS 具有在 m/z 531.34 的的质量的脂质。

10. 根据权利要求 1-8 中任意一项的脂质部分,其中脂质部分包含以下一种或多种或由以下一种或多种组成:

- a. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 86 的的质量的脂质,或
- b. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 147 的的质量的脂质,或
- c. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 445 的的质量的脂质,或
- d. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 656 的的质量的脂质,或
- e. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 454 的的质量的脂质,或
- f. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 751 的的质量的脂质,或
- g. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 393 的的质量的脂质,或
- h. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 751 的的质量的脂质,或
- i. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 693 的的质量的脂质,或
- j. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 695 的的质量的脂质,或
- k. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 717 的的质量的脂质,或
- l. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 531 的的质量的脂质,或
- m. 通过 MS/MS 具有在 m/z 86.02 的的质量的脂质,或
- n. 通过 MS/MS 具有在 m/z 146.97 的的质量的脂质,或
- o. 通过 MS/MS 具有在 m/z 444.82 的的质量的脂质,或
- p. 通过 MS/MS 具有在 m/z 655.94 的的质量的脂质,或
- q. 通过 MS/MS 具有在 m/z 454.19 的的质量的脂质,或
- r. 通过 MS/MS 具有在 m/z 750.66 的的质量的脂质,或
- s. 通过 MS/MS 具有在 m/z 393.39 的的质量的脂质,或
- t. 通过 MS/MS 具有在 m/z 750.67 的的质量的脂质,或
- u. 通过 MS/MS 具有在 m/z 692.69 的的质量的脂质,或
- v. 通过 MS/MS 具有在 m/z 694.72 的的质量的脂质,或
- w. 通过 MS/MS 具有在 m/z 716.71 的的质量的脂质,或
- x. 通过 MS/MS 具有在 m/z 531.34 的的质量的脂质。

11. 根据权利要求 1-10 中任意一项的脂质或脂质部分,其中所述的子囊菌门真菌选自:在 2008 年 10 月 14 日在澳大利亚国家测量所 (NMIA) 以登记号 V08/025855 保藏的巴西安白僵菌菌株 K4B3、或具有其鉴别特征的菌株;巴西安白僵菌菌株 AM2 或具有其鉴别特征的菌株;巴西安白僵菌菌株 F480 或具有其鉴别特征的菌株;1 种或多种木霉属物种,包括木

霉属分离群 1328 或具有其鉴别特征的菌株 ;和 1 种或多种绿僵菌物种。

12. 组合物,其包含来自子囊菌门真菌的 1 种或多种杀虫脂质或 1 种或多种杀虫脂质部分、以及至少 1 种载体。

13. 组合物,已经向该组合物加入来自子囊菌门真菌的 1 种或多种杀虫脂质或 1 种或多种杀虫脂质部分、以及至少 1 种载体。

14. 权利要求 12 或 13 的组合物,其中组合物是或包含来自子囊菌门真菌培养物的培养物、细胞提取物、细胞悬液、细胞匀浆、细胞溶胞产物、细胞上清液、细胞滤液、细胞碎片或生长介质。

15. 权利要求 12-14 中任意一项的组合物,其还另外包含从子囊菌门真菌获得的孢子。

16. 权利要求 15 的组合物,其包含从真菌获得的孢子,所述的真菌选自 :在 2008 年 10 月 14 日在澳大利亚国家测量所 (NMIA) 以登记号 V08/025855 保藏的巴西安白僵菌菌株 K4B3、或具有其鉴别特征的菌株 ;巴西安白僵菌菌株 AM2 或具有其鉴别特征的菌株 ;巴西安白僵菌菌株 F480 或具有其鉴别特征的菌株 ;1 种或多种木霉属物种,包括木霉属分离群 1328 或具有其鉴别特征的菌株 ;和 1 种或多种绿僵菌物种。

17. 权利要求 16 的组合物,其包含从巴西安白僵菌菌株 K4B3 获得的孢子。

18. 根据权利要求 12-17 中任意一项的组合物,其包含来自真菌的 1 种或多种脂质或脂质部分,所述的真菌选自 :在 2008 年 10 月 14 日在澳大利亚国家测量所 (NMIA) 以登记号 V08/025855 保藏的巴西安白僵菌菌株 K4B3、或具有其鉴别特征的菌株 ;巴西安白僵菌菌株 AM2 或具有其鉴别特征的菌株 ;巴西安白僵菌菌株 F480 或具有其鉴别特征的菌株 ;1 种或多种木霉属物种,包括木霉属分离群 1328 或具有其鉴别特征的菌株 ;和 1 种或多种绿僵菌物种。

19. 根据权利要求 18 的组合物,其包含来自巴西安白僵菌菌株 K4B3 的 1 种或多种脂质或脂质部分。

20. 根据权利要求 12-19 中任意一项的组合物,其包含 1 种或多种脂质部分,其中脂质部分是以下任意 1 项或多项或具有以下任意 1 项或多项的鉴别特征 :

- a. 在本文中如图 4 中所示或如实施例 2 中所述的部分 1、部分 5 或部分 6 ;
- b. 在本文中如图 7 中所示或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 4 或部分 5 ;
- c. 在本文中如图 8 中所示或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 3、部分 4、部分 5 或部分 9 ;
- d. 在本文中如图 8 中所示或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 3、部分 4、部分 5 或部分 9 ;
- e. 在本文中如图 10 中所示或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 3、部分 4b、部分 5a、部分 5b 或部分 6。

21. 根据权利要求 12-20 中任意一项的组合物,其中组合物富含非酸性脂质。

22. 根据权利要求 21 的组合物,其中富集在 1 种或多种脂质部分中存在的 1 种或多种脂质,所述的脂质部分是以下任意 1 项或多项或具有以下任意 1 项或多项的鉴别特征 :

- a. 在本文中如图 4 中所示或如实施例 2 中所述的部分 1、部分 5 或部分 6 ;
- b. 在本文中如图 7 中所示或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 4 或部分 5 ;
- c. 在本文中如图 8 中所示或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 3、部分 4、部分 5 或部分

9;

d. 在本文中如图 8 中所示或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 3、部分 4、部分 5 或部分

9;

e. 在本文中如图 10 中所示或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 3、部分 4b、部分 5a、部分 5b 或部分 6。

23. 根据权利要求 21 的组合物, 其中富集以下的 1 种或多种:

- a. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 86 的质量的脂质, 或
- b. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 147 的质量的脂质, 或
- c. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 445 的质量的脂质, 或
- d. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 656 的质量的脂质, 或
- e. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 454 的质量的脂质, 或
- f. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 751 的质量的脂质, 或
- g. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 393 的质量的脂质, 或
- h. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 751 的质量的脂质, 或
- i. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 693 的质量的脂质, 或
- j. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 695 的质量的脂质, 或
- k. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 717 的质量的脂质, 或
- l. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 531 的质量的脂质, 或
- m. 通过 MS/MS 具有在 m/z 86.02 的质量的脂质, 或
- n. 通过 MS/MS 具有在 m/z 146.97 的质量的脂质, 或
- o. 通过 MS/MS 具有在 m/z 444.82 的质量的脂质, 或
- p. 通过 MS/MS 具有在 m/z 655.94 的质量的脂质, 或
- q. 通过 MS/MS 具有在 m/z 454.19 的质量的脂质, 或
- r. 通过 MS/MS 具有在 m/z 750.66 的质量的脂质, 或
- s. 通过 MS/MS 具有在 m/z 393.39 的质量的脂质, 或
- t. 通过 MS/MS 具有在 m/z 750.67 的质量的脂质, 或
- u. 通过 MS/MS 具有在 m/z 692.69 的质量的脂质, 或
- v. 通过 MS/MS 具有在 m/z 694.72 的质量的脂质, 或
- w. 通过 MS/MS 具有在 m/z 716.71 的质量的脂质, 或
- x. 通过 MS/MS 具有在 m/z 531.34 的质量的脂质。

24. 根据权利要求 21-23 中任意一项的组合物, 其中相对于未富集的组合物中所存在的量, 富集至少约 1%、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 99%。

25. 用于控制 1 种或多种昆虫的方法, 所述的方法包含使 1 种或多种昆虫与权利要求 1-11 中任意一项的脂质或脂质部分或根据权利要求 12-24 中任意一项的组合物相接触。

26. 用于控制 1 种或多种昆虫的方法, 所述的方法包含向植物或其周围环境施用权利要求 1-11 中任意一项的脂质或脂质部分或根据权利要求 12-24 中任意一项的组合物。

27. 生产生物控制组合物的方法, 所述的方法包含:

提供 1 种或多种子囊菌门真菌的培养物,

维持培养物在适合于至少 1 种脂质或脂质部分的产生的条件下 ; 和

- i. 将至少 1 种脂质或脂质部分与载体组合, 或者
- ii. 将至少 1 种脂质或脂质部分与 1 种或多种昆虫致病性的真菌或其培养物组合, 或者
- iii. 从真菌分离出至少 1 种脂质或脂质部分, 或者
- iv. 至少部分地纯化或分离出至少 1 种本发明的脂质, 或者
- v. (i) 至 (iv) 中的两项或更多项的任意的组合。

28. 权利要求 27 的方法, 其中脂质部分的脂质是如权利要求 2-11 中任意一项所请求保护的脂质或脂质部分、包含如权利要求 2-11 中任意一项所请求保护的脂质或脂质部分、或者由如权利要求 2-11 中任意一项所请求保护的脂质或脂质部分组成。

29. 制备杀虫脂质或脂质部分的方法, 所述的方法包含 :

提供 1 种或多种子囊菌门真菌的培养物的有机溶剂提取物,
至少部分地将 1 种或多种非酸性脂质与 1 种或多种酸性脂质分离, 和
回收 1 种和多种非酸性脂质和脂质部分。

30. 制备杀虫脂质或脂质部分的方法, 所述的方法包含 :

提供 1 种或多种子囊菌门真菌的培养物的有机溶剂提取物,
至少部分地将 1 种或多种极性脂质与 1 种或多种非极性脂质分离, 和
回收 1 种或多种极性脂质或极性脂质部分。

31. 权利要求 29 或 30 的方法, 其中有机溶剂是链烷醇或是氯仿, 所述的链烷醇包括短链烷基醇、甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、或丁醇。

32. 权利要求 29-31 中任意一项的方法, 其中回收的脂质或脂质部分是如权利要求 2-11 中任意一项所请求保护的脂质或脂质部分、包含如权利要求 2-11 中任意一项所请求保护的脂质或脂质部分、或者由如权利要求 2-11 中任意一项所请求保护的脂质或脂质部分组成。

33. 完全地或部分地逆转昆虫对 1 种或多种杀虫剂或者 1 种或多种昆虫致病剂的耐药性的方法, 所述的方法包含使昆虫与权利要求 1-11 中任意一项的脂质或脂质部分或根据权利要求 12-24 中任意一项的组合物相接触。

34. 权利要求 33 的方法, 其包含使昆虫与脂质或脂质部分以及 1 种或多种杀虫剂或者 1 种或多种昆虫致病剂、或其任意组合相接触。

35. 权利要求 33 的方法, 其中所给予的 1 种或多种杀虫剂或者 1 种或多种昆虫致病剂与昆虫具有耐药性或预测具有或变得具有耐药性的试剂相同。

36. 控制 1 种或多种昆虫的方法, 所述的昆虫已经与权利要求 1-11 中任意一项的脂质或脂质部分或根据权利要求 12-24 中任意一项的组合物接触, 所述的方法包含使 1 种或多种昆虫与足以控制所述的 1 种或多种昆虫的量的杀虫剂或昆虫致病剂接触。

37. 权利要求 36 的方法, 其中在给予脂质或脂质部分之前、同时或之后给予 1 种或多种杀虫剂或者 1 种或多种昆虫致病剂。

38. 权利要求 33-37 中任意一项的方法, 其中组合物包含昆虫致病性的真菌, 以及任选的另一种杀虫剂或昆虫致病剂。

杀虫剂及其应用

发明领域

[0001] 本发明一般地涉及生物学领域,更特别地某些实施方案涉及由丝状真菌制备的脂质、包含所述的脂质的组合物、和该脂质和组合物作为生物控制剂的用途。也提供使用所述脂质和包含脂质的组合物控制昆虫(包括致植物病的昆虫)的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 控制昆虫和昆虫种群的能力对于人和动物健康、农业和大范围的经济活动而言是非常重要的。例如,昆虫是大量的重要人类疾病的传病媒介:蚊子是疟疾、西尼罗河病和登革热的传病媒介,蜱是立克次氏体病(例如斑疹伤寒、非洲蜱咬热和莱姆病)的传病媒介,跳蚤是鼠疫的传病媒介。类似地,由昆虫害虫和病原菌(统称为“植物病原体”)导致的植物病害或损失对于基于植物的农业和工业是重要的经济成本。损失可能通过在收获前和收获后的产品损坏、植物自身的损失、或通过生长和生产能力的降低而上升。

[0004] 在传统上,通过化学杀虫剂的使用、也可以通过使用物理方法(例如诱捕、挖掘、屏障)已经进行了昆虫例如植物害虫和病原菌的大规模控制。化学药品的使用带来大量的弊端。昆虫例如植物害虫和病原菌久而久之能够并且已经发展了对化学药品的耐受性,产生了耐药性种群。实际上,对杀虫剂的耐受是对基于植物的农业和工业(例如园艺工业)的生存的最大挑战。

[0005] 借助大量的经济上重要的致植物病的昆虫对该问题进行具体说明。已经报道,世界范围内西花蓟马的种群对大多数种类的杀虫剂有耐药性,所述的杀虫剂包括以下实例:乙酰甲胺磷、阿巴美丁、氯螨硫磷、硫丹、灭多虫、灭梭威、氧乐果、定菌磷和氟胺氰菊酯。在新西兰的洋葱蓟马的种群已经发展出对溴氰菊酯的耐药性,并且已经报道当地的种群对二嗪农和敌敌畏有耐药性。已经报道在美国的洋葱蓟马对许多杀虫剂有耐药性(Grossman, 1994)。报道了温室粉虱已经发展出对有机氯、有机磷酸盐、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯杀虫剂的耐药性(例如 Georgioul 1981、Anis&Brennan 1982、Elhag&Horn 1983、Wardlow 1985、和 Hommes 1986)。也已经报道了对新型杀虫剂稻虱净和氟苯脲的耐药性(Gorman 等人 2000)。

[0006] 化学残留可以造成环境危害,并且提升健康担忧。在过去 20 年中对生物控制(例如微生物杀虫剂)的兴趣的重新兴起直接源自于对化学毒性的关注的公众压力。生物控制给出了控制植物病原体的替代方法,其可能比目前的方法更加有效和特异性,并且减少对化学药品的依赖。将这些生物控制方法视为对化学杀虫剂的“天然”代替,其具有更高的公共接受度、减少的环境污染和增加的持续性的优点。

[0007] 生物控制的机制是多种多样的。已经证明有效的一种机制是使用拮抗性微生物例如细菌来控制致植物病的昆虫。例如,在新西兰的奥克兰,大规模产生的苏云金杆菌能够使用该细菌-杀虫剂用于控制着色的苹果蛾。

[0008] 然而,生物控制剂(BCA)的成功应用的实例极少,迄今为止 BCA 尚未得到大量的种植者接受并且可能已经意识到是不经济的。

[0009] 因此需要用于有效地控制昆虫(包括致植物病的昆虫)的试剂和方法,特别是起

效更快、控制昆虫的效力增加、施用所需要的频率较低或强度较低、较低的成本、或比目前可用的杀虫剂的最终毒性低的试剂。

[0010] 因此,本发明的目的是满足该需求,从而提供 1 种或多种可用于控制昆虫和昆虫种群(包括致植物病的昆虫)的试剂和方法,或者至少向公众提供可用的选择。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供杀虫脂质及其制备方法。这些脂质与已知的杀虫剂的不同之处在于存在新类型的杀虫剂。

[0013] 因此,在第一方面,本发明涉及来自子囊菌门真菌的 1 种或多种杀虫脂质或者 1 种或多种杀虫脂质部分。

[0014] 在某些实施方案中,1 种或多种杀虫脂质是非酸性脂质。在某些实施方案中,1 种或多种杀虫脂质部分是非酸性部分。

[0015] 在某些示例性的实施方案中,1 种或多种杀虫脂质或者 1 种或多种杀虫脂质部分是杀昆虫的。

[0016] 在第二方面,本发明涉及分离的、纯化的或者基本上纯的来自子囊菌门真菌的杀虫脂质。

[0017] 在一个示例性的实施方案中,本发明涉及分离的、纯化的或者基本上纯的来自子囊菌门真菌的杀虫非酸性脂质。

[0018] 在第三方面,本发明涉及包含来自子囊菌门真菌的 1 种或多种杀虫脂质或者 1 种或多种杀虫脂质部分的组合物。

[0019] 在第四方面,本发明涉及分离的、纯化的或者基本上纯的来自子囊菌门真菌的杀虫脂质部分。

[0020] 在一个示例性的实施方案中,本发明涉及分离的、纯化的或者基本上纯的来自子囊菌门真菌的杀虫非酸性脂质部分。

[0021] 本发明提供组合物和制剂,其包含 1 种或多种本文所公开的脂质、以及至少 1 种农业上可接受的载体,包括包含 1 种或多种本发明的脂质和 1 种或多种真菌的组合物和制剂。这些组合物可以是产生该脂质的细胞的细胞提取物、细胞混悬液、细胞匀浆、细胞溶菌产物、细胞上清液、细胞滤液、或细胞碎片。在某些示例性的实施方案中,组合物包含来自子囊菌门真菌的非酸性脂质部分。在某些示例性的实施方案中,组合物富集 1 种或多种本发明的脂质或脂质部分,例如通过纯化或添加。在其他的示例性的实施方案中,组合物包含 1 种或多种添加的本发明的脂质或脂质部分。例如,在一个实施方案中,组合物是如上所述的细胞提取物、细胞混悬液、细胞匀浆、细胞溶菌产物、细胞上清液、细胞滤液、或细胞碎片,向其中加入本发明的 1 种或多种脂质或者 1 种或多种脂质部分。

[0022] 在另一方面,本发明提供制备对昆虫(例如吸吮式昆虫、或鞘翅目、双翅目或鳞翅目昆虫)具有杀虫活性的脂质或脂质部分的方法。该方法通常包括从合适的细胞培养物(例如 1 种或多种子囊菌门真菌的培养物,例如巴西安白僵菌(*Beauveria bassiana*)菌株 K4B3 细胞的培养物)分离出 1 种或多种本文所述的脂质或脂质部分。在某些实施方案中,细胞正在或已经在能够支持菌丝生长的条件下生长。这些脂质可以从细胞培养物或上清液或者从来源于细胞培养物的孢子悬液分离出来并且以天然的形式使用,或者可以为了特定的应用而适当地进行纯化或浓缩。

[0023] 本发明也提供控制昆虫种群的方法。该方法通常包括使种群接触杀虫有效量的本文所述的脂质（包括非酸性脂质）或本文所述的脂质部分（包括非酸性脂质部分）。这些方法可以用于在设定的区域内杀死或降低目标昆虫的数量，或者可以预防性地施用于环境区域从而防止被易感的昆虫侵染。

[0024] 在另一方面，本发明提供生产生物控制组合物的方法，所述的方法包含：

[0025] 提供 1 种或多种子囊菌门真菌的培养物，

[0026] 维持培养物在适合于产生至少 1 种本发明的脂质或脂质部分的条件下；和

[0027] i) 将至少 1 种本发明的脂质或脂质部分与载体组合，或

[0028] ii) 将至少 1 种本发明的脂质或脂质部分与 1 种或多种本文所述的昆虫致病性的真菌组合，或

[0029] iii) 从真菌分离出至少 1 种本发明的脂质或脂质部分，或

[0030] iv) 至少部分地纯化或分离出至少 1 种本发明的脂质或脂质部分，或

[0031] v) (i) 至 (iv) 中的 2 项或更多项的任意组合。

[0032] 本发明进一步涉及本发明的脂质或脂质部分或者本发明的组合物用于控制 1 种或多种昆虫、例如 1 种或多种致植物病的昆虫的应用。

[0033] 在进一步的方面，本发明提供控制 1 种或多种昆虫的方法，该方法包含使 1 种或多种昆虫与本发明的脂质或脂质部分或其功能性变体接触。

[0034] 本发明进一步涉及用于控制 1 种或多种昆虫、例如 1 种或多种致植物病的昆虫的方法，该方法包含向植物或其周围环境施用本发明的脂质或脂质部分或其功能性变体，以及任选的至少 1 种本文所述的昆虫致病性的真菌。

[0035] 在另一个方面，本发明提供完全地或部分地逆转昆虫对 1 种或多种杀虫剂或者 1 种或多种昆虫致病剂的耐药性的方法，该方法包含使昆虫接触本发明的脂质或脂质部分。

[0036] 任选地，该方法包含使昆虫接触本发明的脂质或脂质部分以及 1 种或多种杀虫剂或者 1 种或多种昆虫致病剂、或其任意的组合。

[0037] 在多种实施方案中，所给予的 1 种或多种杀虫剂或者 1 种或多种昆虫致病剂是与昆虫有抵抗力的或预期有抵抗力的或变得有抵抗力的物质相同。

[0038] 在另一方面，本发明提供控制 1 种或多种已经与 1 种或多种本发明的脂质或脂质部分接触的昆虫的方法，该方法使用有效控制所述的 1 种或多种昆虫的量的杀虫剂或昆虫致病剂。

[0039] 所述的 1 种或多种杀虫剂或者 1 种或多种昆虫致病剂可以在本发明的脂质或脂质部分的给药之前、同时或之后进行给药。因此，1 种或多种本发明的脂质或脂质部分和 1 种或多种杀虫剂或昆虫致病剂的给药可以是同时的、先后的或独立的。

[0040] 在另一个方面，本发明提供完全地或部分地逆转昆虫对 1 种或多种杀虫剂或者 1 种或多种昆虫致病剂的耐药性的方法，该方法包含使 1 种或多种昆虫接触 1 种或多种本发明的脂质或脂质部分和本发明的昆虫致病性的真菌，以及任选的另一种杀虫剂或昆虫致病剂。

[0041] 在一个实施方案中，该方法包含使 1 种或多种昆虫接触昆虫致病性的真菌以及 1 种或多种本发明的脂质。

[0042] 以下实施方案可能涉及本文的任意方面。

[0043] 在一个实施方案中,至少1种真菌是粪壳菌(Sordariomycetes)纲,其包括1种或多种以下亚纲的真菌:

[0044] 肉座菌(Hypocreomycetidae)亚纲,例如1种或多种冠囊菌目、肉座菌目、黑孢壳目(Melanosporales)、或小囊菌目(Microascales)的真菌;粪壳菌亚纲,包括1种或多种团壳菌目、美球菌目、刺球菌目(Chaetosphaeriales)、Coniochaetales、间座壳菌目、Magnaporthales、长喙壳菌目、粪壳菌目的真菌;炭角菌亚纲,包括炭角菌目的真菌和Koralionastetales、路霉目、小煤炭菌目、黑痣菌目和假毛球壳目的真菌。

[0045] 在一个实施方案中,1种或多种真菌是肉座菌目,例如1种或多种生赤壳科、麦角菌科、肉座菌科、丛赤壳科、Niessliaceae或蛇形虫草科的真菌。

[0046] 在一个实施方案中,1种或多种真菌是麦角菌科,其包括1种或多种选自以下属的真菌:

[0047] 针孢座囊菌属、Ascopolyporus、Atkinsonella、Atricordyceps、瘤座菌属、Berkelella、Cavimalum、Cepsiclava、麦角菌属、Cordycepioideus、冬虫夏草属、Dussiella、香柱属、Epicrea、Helminthascus、**Heteroepichloë**、Hyperdermium、Hypocrella、Konradia、Loculistroma、Metacordyceps、Moelleriella、Mycomalms、Myriogenospora、Neobarya、Neoclaviceps、Neocordyceps、**Parepichloë**、Phytocordyceps、Podocrella、Regiocrella、Romanoa、Shimizuomyces、Sphaerocordyceps、Stereocrea、Torrubiella、Wakefieldiomyces、Akanthomyces、座壳孢属、白僵菌属、Chaunopycnis、Coralloctostroma、Culicinomyces、Drechmeria、Ephelis、Gibellula、Haptocillium、Harposporium、Hirsutella、Hymenostilbe、棒束孢属、Lecanicillium、Mariannaea、绿僵菌属、Microhilum、Neomunkia、Neotyphodium、Nomuraea、拟青霉属、Pochonia、Polycephalomyces、Pseudogibellula、Simplicillium、Sorosporella、Tolypocladium或Ustilaginoidea。

[0048] 例如,1种或多种真菌是白僵菌属,其包括例如巴西安白僵菌、布氏白僵菌、Beauveria felina、或Beauveria globulifera的1种或多种菌株。

[0049] 在另一个实施方案中,1种或多种真菌是肉座菌科,其包括来自以下的属的1种或多种真菌:

[0050] Aphysiostroma、Cladobotryum、胶霉属、肉座菌属、Hypocreopsis、菌寄生属、Mycogone、肉棒菌属(Podostroma)、Protocrea、Rogersonia、Sarawakus、瘤孢属、泥炭藓属(Sphaerostilbella)、Sporophagomyces、Stephanoma或木霉属。

[0051] 在一个实施方案中,1种或多种真菌是木霉属,其包括以下的1种或多种:

[0052] 侵占木霉、棘孢木霉、深绿木霉、黄绿木霉、澳洲康宁木霉、短密木霉、雪白木霉、加勒比木霉厄瓜多尔变种、加勒比木霉加勒比变种、低头木霉、奶油木霉、陶瓷木霉、蜡素木霉、绿孢木霉、色精木霉、肉桂色木霉、橘绿木霉、厚木霉、奶油木霉、丁莉亚木霉、多罗西木霉、平展木霉、猬木霉、爱沙尼亚木霉、可育木霉、明胶木霉、加纳木霉、钩状木霉、哈茨木霉、旋状木霉、交织木霉、长枝康宁木霉、康宁木霉、拟康宁木霉、长枝木霉、长毛木霉、微孢木霉、矩孢木霉、卵孢木霉、彼得森木霉、竹生木霉、洋大戟草木霉、侧耳木霉、半菇木霉、多孢木霉、假康宁木霉、软毛木霉、李氏木霉、罗杰氏木霉、俄罗斯木霉、土星孢木霉、中国木霉、弯梗木霉、木霉物种MA3642、木霉物种PPRI3559、螺旋木霉、草黄木霉、硬毛木霉、子座木

霉、球座木霉、台湾木霉、泰国木霉、革菌木霉、可可木霉、绒毛木霉、毛簇木霉、绿木霉、绿色木霉、浅绿木霉；或者 1 种或多种肉座菌种，其包括竹生肉座菌。

[0053] 在多个实施方案中，1 种或多种真菌是 1 种或多种菌株，所述的菌株选自巴西安白僵菌 K4B3NMIA 号 V08/025855 或具有其鉴别特征的菌株；*Lecanicillium muscarium* 菌株 K4V1 (NMIA 号 NM05/44593) 或具有其鉴别特征的菌株；*Lecanicillium muscarium* 菌株 K4V2 (NMIA 登记号 NM05/44594) 或具有其鉴别特征的菌株；*Lecanicillium muscarium* 菌株 K4V4 (NMIA 登记号 NM06/00007) 或具有其鉴别特征的菌株；巴西安白僵菌菌株 K4B1 (NMIA 登记号 NM05/44595) 或具有其鉴别特征的菌株；巴西安白僵菌菌株 K4B2 (NMIA 登记号 NM06/00010) 或具有其鉴别特征的菌株；*Lecanicillium longisporum* 菌株 KT4L1 (NMIA 登记号 NM06/00009) 或具有其鉴别特征的菌株；和玫烟色拟青霉 (*Paecilomyces fumosoroseus*) 菌株 K4P1 (NMIA 登记号 NM06/00008) 或具有其鉴别特征的菌株。

[0054] 在多种实施方案中，1 种或多种杀虫脂质是非酸性脂质。在某些实施方案中，1 种或多种杀虫脂质基本上无酸性脂质，或者基本上无游离脂肪酸。

[0055] 在多种实施方案中，1 种或多种杀虫脂质部分是非酸性脂质部分。在某些实施方案中，1 种或多种杀虫脂质部分基本上无酸性脂质，或者基本上无游离脂肪酸。

[0056] 在多种实施方案中，1 种或多种杀虫脂质部分包含非酸性脂质部分。在某些实施方案中，1 种或多种杀虫脂质部分基本上无酸性脂质，或者基本上无游离脂肪酸。

[0057] 在多种实施方案中，1 种或多种杀虫脂质部分包含至少约按重量计 10%、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 99% 的非酸性脂质。

[0058] 在多种实施方案中，在脂质部分中的非酸性脂质与酸性脂质的重量比是至少约 5:4、4:3、3:2、2:1、5:3、5:2、3:1、4:1、或 5:1。

[0059] 在 1 个实施方案中，所述脂质是极性脂质。

[0060] 在多种实施方案中，1 种或多种杀虫脂质部分包含至少约按重量计 10%、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 99% 的极性脂质。

[0061] 在多种实施方案中，在脂质部分中的极性脂质与非极性脂质的重量比是至少约 5:4、4:3、3:2、2:1、5:3、5:2、3:1、4:1、或 5:1。

[0062] 在多种实施方案中，脂质部分是在本文中如图 4 中所示的或如实施例 2 中所述的部分 1、部分 5 或部分 6，或具有在本文中如图 4 中所示的或如实施例 2 中所述的部分 1、部分 5 或部分 6 的鉴别特征。

[0063] 在多种实施方案中，脂质部分是在本文中如图 7 中所示的或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 4 或部分 5，或具有在本文中如图 7 中所示的或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 4 或部分 5 的鉴别特征。

[0064] 在多种实施方案中，脂质部分是在本文中如图 8 中所示的或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 3、部分 4、部分 5、或部分 9，或具有在本文中如图 8 中所示的或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 3、部分 4、部分 5、或部分 9 的鉴别特征。

[0065] 在多种实施方案中，脂质部分是在本文中如图 8 中所示的或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 3、部分 4、部分 5、或部分 9，或具有在本文中如图 8 中所示的或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 3、部分 4、部分 5、或部分 9 的鉴别特征。

[0066] 在多种实施方案中，脂质部分是在本文中如图 10 中所示的或如实施例 2 中所述的

部分 2、部分 3、部分 4b、部分 5a、部分 5b、或部分 6，或具有在本文中如图 10 中所示的或如实施例 2 中所述的部分 2、部分 3、部分 4b、部分 5a、部分 5b、或部分 6 的鉴别特征。

[0067] 在多种实施方案中，部分 2、部分 3、部分 4b、部分 5a、部分 5b、或部分 6 的鉴别特征是如图 12a-12f 中任一所示的 MALDI-TOF 质谱 (MS) 特征。

[0068] 在 1 个实施方案中，脂质部分是在本文中如图 10 中所示的或如实施例 2 中所述的部分 3，或具有在本文中如图 10 中所示的或如实施例 2 中所述的部分 3 的鉴别特征。在 1 个实施方案中，鉴别特征是如图 13 中所示的 NMR 谱。

[0069] 在 1 个实施方案中，所述脂质是以下中的一项或多项或者脂质部分包含以下中的一项或多项或由以下中的一项或多项组成：

[0070] a. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 86 的质量的脂质，或

[0071] b. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 147 的质量的脂质，或

[0072] c. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 445 的质量的脂质，或

[0073] d. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 656 的质量的脂质，或

[0074] e. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 454 的质量的脂质，或

[0075] f. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 751 的质量的脂质，或

[0076] g. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 393 的质量的脂质，或

[0077] h. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 751 的质量的脂质，或

[0078] i. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 693 的质量的脂质，或

[0079] j. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 695 的质量的脂质，或

[0080] k. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 717 的质量的脂质，或

[0081] l. 通过 MS/MS 具有大约在 m/z 531 的质量的脂质，或

[0082] m. 通过 MS/MS 具有在 m/z 86.02 的质量的脂质，或

[0083] n. 通过 MS/MS 具有在 m/z 146.97 的质量的脂质，或

[0084] o. 通过 MS/MS 具有在 m/z 444.82 的质量的脂质，或

[0085] p. 通过 MS/MS 具有在 m/z 655.94 的质量的脂质，或

[0086] q. 通过 MS/MS 具有在 m/z 454.19 的质量的脂质，或

[0087] r. 通过 MS/MS 具有在 m/z 750.66 的质量的脂质，或

[0088] s. 通过 MS/MS 具有在 m/z 393.39 的质量的脂质，或

[0089] t. 通过 MS/MS 具有在 m/z 750.67 的质量的脂质，或

[0090] u. 通过 MS/MS 具有在 m/z 692.69 的质量的脂质，或

[0091] v. 通过 MS/MS 具有在 m/z 694.72 的质量的脂质，或

[0092] w. 通过 MS/MS 具有在 m/z 716.71 的质量的脂质，或

[0093] x. 通过 MS/MS 具有在 m/z 531.34 的质量的脂质。

[0094] 在 1 个实施方案中，所述脂质或脂质部分包含通过 MS 具有在 m/z 86.02 的质量的脂质。在 1 个实施方案中，所述脂质或脂质部分包含通过 MS 具有在 m/z 146.97 的质量的脂质。

[0095] 在多种实施方案中，特别是包含或来源于 1 种或多种子囊菌门真菌的培养物的组合物中，组合物富含 1 种或多种本发明的脂质或脂质部分。在某些实施方案中，相对于没有富集的组合物（例如没有经过富集的培养物或生长介质）中所存在的量，富集是至少约 1%、

2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 99% 的富集。在其他的实施方案中,相对于没有富集的组合中所存在的量,富集是至少约 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、或 100 倍。

[0096] 在某些实施方案中,通过添加进行富集。在其他的实施方案中,相对于在正常生长条件下产生的,通过在有助于 1 种或多种脂质或脂质部分增加产生的条件下(例如通过检测生长介质中存在如本文明确记载的脂质部分的鉴别特征之一来证明)培养真菌进行富集。

[0097] 在多种实施方案中,由子囊菌门真菌获得的或可获得的组合物或分离物包含按重量计至少约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 99% 的脂质、优选非酸性脂质,并且有用的范围可以在这些数值的任意两者间进行选择(例如,按重量计约 1 至约 99、约 5 至约 99、约 10 至约 99、约 15 至约 99、约 20 至约 99、约 25 至约 99、约 30 至约 99、约 35 至约 99、约 40 至约 99、约 45 至约 99、约 50 至约 99、约 55 至约 99、约 60 至约 99、约 65 至约 99、约 70 至约 99、约 75 至约 99、约 80 至约 99、约 85 至约 99、或约 90 至约 99%)。

[0098] 应当理解,本文中有用的任何组合物或分离物包括由包含 1 种或多种子囊菌门真菌的培养物获得的或可获得的组合物或分离物,并且可以从培养物获得,其中 1 种或多种子囊菌门真菌存在于该培养物中或曾经存在培养物中、但已经被移除。

[0099] 在 1 个实施方案中,本文中有用的组合物包含至少约 0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100mg/mL 的脂质、优选非酸性脂质,和有用的范围可以在这些数值的任意两者间进行选择(例如,约 0.01 至约 1.0、约 0.01 至约 10、约 0.01 至约 20、约 0.01 至约 30、约 0.01 至约 40、约 0.01 至约 50、约 0.01 至约 60、约 0.01 至约 70、约 0.01 至约 80、约 0.01 至约 90、约 0.01 至约 100、约 0.1 至约 1.0、约 0.1 至约 10、约 0.1 至约 20、约 0.1 至约 30、约 0.1 至约 40、约 0.1 至约 50、约 0.1 至约 60、约 0.1 至约 70、约 0.1 至约 80、约 0.1 至约 90、约 0.1 至约 100、约 0.7 至约 1.0、约 0.7 至约 10、约 0.7 至约 20、约 0.7 至约 30、约 0.7 至约 40、约 0.7 至约 50、约 0.7 至约 60、约 0.7 至约 70、约 0.7 至约 80、约 0.7 至约 90、或约 0.7 至约 100mg/mL)。

[0100] 生产 1 种或多种本发明的脂质的示例性的真菌细胞包括于 2008 年 10 月 14 日以登记号 V08/025855 在澳大利亚国家测量所 (National Measurement Institute of Australia) (NMIA) 保藏的巴西安白僵菌菌株 K4B3、或者具有其鉴别特征的培养物;巴西安白僵菌菌株 AM2、巴西安白僵菌菌株 F480、木霉属物种(包括木霉属分离群 1328)、和绿僵菌物种,或者具有其任一个的鉴别特征的菌株。

[0101] 在 1 个实施方案中,本发明涉及制备杀虫的脂质或脂质部分的方法,该方法包括:

[0102] 提供 1 种或多种子囊菌门真菌的培养物的有机溶剂提取物,

[0103] 至少部分地将 1 种或多种酸性脂质与 1 种或多种非酸性脂质分离,和

[0104] 回收 1 种或多种非酸性脂质或脂质部分。

[0105] 在 1 个实施方案中,本发明涉及制备杀虫的脂质或脂质部分的方法,该方法包括:

[0106] 提供 1 种或多种子囊菌门真菌的培养物的有机溶剂提取物,

[0107] 至少部分地将 1 种或多种极性脂质与 1 种或多种非极性脂质分离, 和

[0108] 回收 1 种或多种极性脂质或极性脂质部分。

[0109] 在某些实施方案中, 从子囊菌门真菌制备具有杀虫活性的脂质或脂质部分的方法基本上如本文所述。

[0110] 在 1 个示例性的实施方案中, 有机溶剂是或包含氯仿。例如, 有机溶剂包含甲醇和氯仿。

[0111] 在多种实施方案中, 有机溶剂是链烷醇, 包括短链烷基醇, 例如但不限于甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、或丁醇, 或者是氯仿。

[0112] 在多种实施方案中, 有机溶剂是农业上可接受的载体, 其包括如本文所述的载体。

[0113] 在多种实施方案中, 通过色谱法进行分离, 包括阴离子交换色谱法和薄层色谱法。在 1 个示例性的实施方案中, 阴离子交换色谱法使用 DEAE- 交联葡聚糖凝胶 (Sephadex)。

[0114] 本发明的组合物可以被制成粉末、粉尘、小丸、颗粒、喷雾剂、乳剂、胶体、溶液等, 并且可以通过常规方法例如将包含脂质的细胞培养物干燥、冻干、匀化、萃取、过滤、离心、沉淀或浓缩而制备。在含有至少 1 种该杀虫脂质的示例性的组合物的某些实施方案中, 脂质的浓度按重量计是从约 1% 至约 99%。

[0115] 优选地, 这些组合物可从 1 种或多种本文所述的巴西安白僵菌细胞的培养物获得。示例性的杀虫脂质制剂可以通过包含以下步骤的方法进行制备: 在有效地产生菌丝体的条件下培养合适的巴西安白僵菌菌株 K4B3 细胞、提供至少部分纯化的菌丝体、和从菌丝体获得 1 种或多种脂质。

[0116] 在进一步的实施方案中, 本发明提供制备杀虫脂质组合物的方法。在示例性的实施方案中, 这些脂质可以被配制用作杀虫剂, 并且可以用于控制环境 (包括农业环境等) 中的昆虫种群。在某些实施方案中, 制剂能够用于杀死昆虫或昆虫种群, 其通过局部施用或者通过脂质组合物被昆虫摄入而实现。在其他的实施方案中, 制剂能够用于对抗昆虫或昆虫种群, 其通过局部施用或者通过肽组合物被昆虫摄食而实现。在某些情况中, 可能需要配制本发明的脂质用于向土壤、植物、树、灌木等上面或附近、靠近活的植物、牲畜、住所、农场设备、建筑物等施用。

[0117] 在包含 1 种或多种本发明的脂质和 1 种或多种真菌的组合物的各实施方案中, 1 种或多种真菌是以可复制地存活的形式和量。

[0118] 在 1 个实施方案中, 本发明提供组合物, 其包含 1 种或多种如本文所述的脂质和可从至少 1 种真菌获得的孢子以及至少 1 种载体。

[0119] 优选地, 所述的组合物是生物控制组合物, 更优选地所述的生物控制组合物是杀虫组合物。

[0120] 优选地, 所述的生物控制组合物包含至少 1 种农业上可接受的载体。

[0121] 优选地, 所述的至少 1 种载体是农业上可接受的载体, 更优选地选自填充剂刺激物、防结块剂、润湿剂、乳化剂、和抗氧化剂, 更优选所述的组合物包含填充剂刺激物、防结块剂、润湿剂、乳化剂、和抗氧化剂的各自的至少一种。

[0122] 优选地, 所述的填充剂刺激物是碳水化合物源, 例如二糖, 包括例如蔗糖、果糖、葡萄糖、或右旋糖, 所述的防结块剂选自滑石粉、二氧化硅、硅酸钙、或高岭粘土, 所述的润湿剂是脱脂奶粉, 所述的乳化剂是基于大豆的乳化剂 (例如卵磷脂) 或基于植物的乳化剂

(例如单二甘油酯),和所述的抗氧化剂是谷氨酸钠或柠檬酸。

[0123] 在多种实施方案中,组合物是在超过约 2 周、优选超过约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、更优选超过约 6 个月的时间内能够支持真菌的复制活力或能够保持杀虫效力的稳定的组合物。

[0124] 在某些实施方案中,组合物包含真菌的单个菌株。在 1 个示例性的实施方案中,真菌是巴西安白僵菌菌株 K4B3(于 2008 年 10 月 14 日保藏的 NMIA 号 V08/025855)。

[0125] 或者,组合物包含所述真菌的多种菌株。在 1 个实施方案中,组合物是生物控制组合物,其包含 1 种或多种本发明的脂质、以及以可复制地存活的形式和量的 1 种或多种菌株、和至少 1 种农业上可接受的载体,所述的菌株选自巴西安白僵菌 K4B3NMIA 号 V08/025855 或具有其鉴别特征的菌株;Lecanicillium muscarium 菌株 K4V1(NMIA 号 NM05/44593) 或具有其鉴别特征的菌株;Lecanicillium muscarium 菌株 K4V2(NMIA 登记号 NM05/44594) 或具有其鉴别特征的菌株;Lecanicillium muscarium 菌株 K4V4(NMIA 登记号 NM06/00007) 或具有其鉴别特征的菌株;巴西安白僵菌菌株 K4B1(NMIA 登记号 NM05/44595) 或具有其鉴别特征的菌株;巴西安白僵菌菌株 K4B2(NMIA 登记号 NM06/00010) 或具有其鉴别特征的菌株;Lecanicillium longisporum 菌株 KT4L1(NMIA 登记号 NM06/00009) 或具有其鉴别特征的菌株;和玫烟色拟青霉菌株 K4P1(NMIA 登记号 NM06/00008) 或具有其鉴别特征的菌株。

[0126] 在 1 个实施方案中,生产生物控制组合物的方法包含:

[0127] 提供巴西安白僵菌 K4B3V08/025855 的培养物,

[0128] 维持培养物在适合于至少 1 种本发明的脂质或脂质部分的产生的条件下;和

[0129] i) 将至少 1 种本发明的脂质或脂质部分与载体组合,或者

[0130] ii) 将至少 1 种本发明的脂质或脂质部分与 1 种或多种本文所述的昆虫致病性的真菌组合,或者

[0131] iii) 从巴西安白僵菌 K4B3V08/025855 分离出至少 1 种本发明的脂质或脂质部分,或者

[0132] iv) 从巴西安白僵菌 K4B3V08/025855 至少部分地纯化或分离至少 1 种本发明的脂质,或者

[0133] v) (i) 至 (iv) 的两项或更多项的任意组合。

[0134] 在某些实施方案中,该方法可以在维持步骤之后另外包含 1 个或多个细胞裂解步骤。

[0135] 在多种实施方案中,通过离心或者通过过滤进行分离。

[0136] 在多种实施方案中,分离足以有效地除去超过约 50% 的真菌(例如巴西安白僵菌 K4B3V08/025855),超过约 55%、超过约 60%、超过约 65%、超过约 70%、超过约 75%、超过约 80%、超过约 85%、超过约 90%、超过约 95%、超过约 99% 或者约 100% 的真菌,例如约 100% 的巴西安白僵菌 K4B3V08/025855。

[0137] 因此,在 1 个特别关注的实施方案中,该方法包含提供巴西安白僵菌 K4B3V08/025855 的培养物、维持培养物在适合于至少 1 种分泌的本发明的脂质或脂质部分产生的条件下、和从巴西安白僵菌 K4B3V08/025855 分离出至少 1 种分泌的本发明的脂质或脂质部分。

[0138] 优选地,载体是农业上可接受的载体,优选地至少 1 种载体选自填充剂刺激物、防结块剂、润湿剂、乳化剂和抗氧化剂,更优选地所述的组合物包含填充剂刺激物、防结块剂、润湿剂、乳化剂和抗氧化剂的各自至少一种。

[0139] 在多种实施方案中,致植物病的昆虫是半翅目。

[0140] 优选地,所述的 1 种或多种致植物病的昆虫选自蚊子、蛾(包括小菜蛾)、蓟马(缨翅目)、蚜虫、木虱、介壳虫或粉虱(半翅目)。

[0141] 在 1 个实施例中,本发明的脂质或脂质部分或者其功能性变体可以存在于本文所述的组合物中。

[0142] 在 1 个实施方案中,组合物包含 2 种或更多种本发明的脂质。

[0143] 在多种实施方案中,组合物包含至少 1 种本发明的脂质,以及:

[0144] i) 至少 1 种白僵菌素;

[0145] ii) 至少 1 种类白僵菌素(bassianolide);

[0146] iii) 至少 1 种昆虫致病性的真菌;

[0147] iv) 以上(i)至(iii)中的任意两项或更多项。

[0148] 在 1 个实施方案中,本发明的脂质或组合物直接施用于植物或其周围环境。例如,本发明的组合物与溶剂混合或者被乳化(例如用水)并且如本文所述的进行施用。

[0149] 在 1 个实施方案中,本发明提供用于控制 1 种或多种昆虫(例如 1 种或多种致植物病的昆虫)的方法,所述的方法包含向植物或其周围环境施用本发明的组合物。

[0150] 在多种实施方案中,预防性地施用本发明的脂质或组合物,例如在植物被植物病原体感染或暴露于植物病原体之前。在其他的实施方案中,当确定感染或者存在病原体时施用组合物,例如当植物被植物病原体感染或暴露于植物病原体时、或者当植物病原体存在于植物或其周围环境中时。

[0151] 优选地,在施用前,组合物与水混合至约 0.5gm/L 至约 10gm/L 的脂质的最终浓度、和更优选地至约 1gm/L 的最终浓度。

[0152] 优选地,在施用前,掺入干燥保护剂(例如 Deep Fried™、Fortune™ 或 Fortune Plus™)至约 1ml/L 的最终浓度。

[0153] 对于包含 1 种或多种昆虫致病性的真菌的组合物,示例性的浓度范围是从约 1×10^2 至约 1×10^{12} 孢子/ml、从约 1×10^2 至约 1×10^{11} 孢子/ml、从约 1×10^2 至约 1×10^{10} 孢子/ml、从约 1×10^2 至约 1×10^9 孢子/ml、从约 1×10^3 至约 1×10^9 孢子/ml、从约 1×10^4 至约 1×10^9 孢子/ml、优选地从约 1×10^5 至约 5×10^8 、和更优选地约 1×10^6 至约 2×10^8 孢子/ml。在某些实施方案中,在施用前,组合物包含至少 10^7 孢子/ml、至少约 5×10^7 孢子/ml、或至少 10^8 孢子/ml。

[0154] 在多种实施方案中,当 1 种或多种真菌存在于组合物中时,本发明的组合物可以以从约 1×10^8 至约 1×10^{15} 感染单位(IU)/公顷、从约 1×10^9 至约 1×10^{15} IU/公顷、从约 1×10^{10} 至约 1×10^{15} IU/公顷、从约 1×10^{11} 至约 1×10^{15} IU/公顷、优选从约 1×10^{10} 至约 1×10^{14} IU/公顷、更优选从约 5×10^{10} 至约 1×10^{14} IU/公顷、更优选约 1×10^{11} 至约 5×10^{11} IU/公顷的比率施用。

[0155] 在 1 个实施方案中,感染单位是孢子、例如内生孢子,并且组合物以从约 1×10^8 至约 1×10^{15} 孢子/公顷、从约 1×10^9 至约 1×10^{15} 孢子/公顷、从约 1×10^{10} 至约 1×10^{15} 孢子/公顷、从约 1×10^{11} 至约 1×10^{15} 孢子/公顷、优选从约 1×10^{10} 至约 1×10^{14} 孢子/公顷、更优选从

约 5×10^{10} 至约 1×10^{14} 孢子 / 公顷、更优选约 1×10^{11} 至约 5×10^{11} 孢子 / 公顷的比率施用。

[0156] 方便地, 通过以约 10^8 孢子 / ml 或更多配制所述的组合物并且以约 1L / 公顷的比率施用所述的组合物能够实现这样的施用比率。如本文所述, 通过将组合物溶解于更大体积的农业上可接受的溶剂 (例如水) 中能够方便地实现该施用比率。

[0157] 优选地, 组合物在施用之前与水混合。在 1 个实施方案中, 组合物与水混合并且以至少约 100L 水 / Ha、以至少约 150L / Ha、以至少约 200L / Ha、以至少约 250L / Ha、以至少约 300L / Ha、以至少约 350L / Ha、以至少约 400L / Ha、以至少约 450L / Ha、或以至少约 500L / Ha 施用。在优选的实施方案中, 在施用之前组合物与水混合至约 1×10^{11} 至约 5×10^{11} 孢子每 500L 水的最终浓度, 并且以 500L / 公顷的比率施用。

[0158] 优选地, 通过喷雾进行所述的施用。

[0159] 优选地, 包含巴西安白僵菌菌株 K4B3 (NMIA 登记号 V08/025855) 或具有其鉴别特征的培养物的组合物以从约 1×10^{10} 至约 1×10^{15} 孢子 / 公顷、优选从约 1×10^{12} 至约 1×10^{14} 孢子 / 公顷、更优选从约 5×10^{12} 至约 1×10^{14} 孢子 / 公顷、更优选约 $1-3 \times 10^{13}$ 孢子 / 公顷的比率施用。

[0160] 方便地, 通过以约 10^7 孢子 / 毫克或更多配制所述的组合物、并且以约 1kg / 公顷的比率施用所述的组合物能够实现该施用比率。如本文所述, 通过将组合物溶解于更大体积的农业上可接受的溶剂 (例如水) 中能够方便地实现该施用比率。

[0161] 本发明可应用于任意的植物或其周围环境。在某些实施方案中, 示例性的植物是单子叶或双子叶植物, 例如苜蓿、大麦、芸苔、玉米、棉花、亚麻、木棉花、花生、马铃薯、燕麦、大米、黑麦、高粱、大豆、甜菜、甘蔗、向日葵、烟草、番茄、小麦、草皮草、牧草、浆果、水果、豆类、蔬菜、观赏植物、灌木、仙人掌、肉质植物和树。

[0162] 在进一步举例说明的实施方案中, 植物可以是任意的植物, 其包括选自茄目的植物 (包括来自以下科的植物: 旋花科、田基麻科、山醋李科、茄科和尖瓣花科)、和选自天门冬目的植物 (包括来自以下科的植物: 石蒜科、天门冬科、芳香草科、香水花科、澳韭兰科、矛花科、仙茅科、鸢尾科、鸢尾蒜科、毛石蒜科、兰科、蓝星科、刺叶树科和血剑草科)。

[0163] 对于本发明涉及的领域的技术人员而言, 在不背离如所附权利要求所定义的本发明的范围的情况下, 本发明的结构和不同的实施方案和应用中的许多变化不言自明。本文中所公开的和描述的仅仅是举例说明性的并且其在任何意义上不是限制性的。

[0164] 在引用专利说明书、其他的外部文献、或其他的信息来源的说明书中, 这通常是为了提供用于讨论本发明的特征的背景。除非另有特别说明, 对这些外部文献的引用不以任何形式解释为承认这些文献或这些信息来源是现有技术或构成本领域的公知常识的部分。

[0165] 引用本文所公开的数字范围 (例如 1 至 10) 也包含引用该范围内的所有有理数 (例如 1、1.1、2、3、3.9、4、5、6、6.5、7、8、9 和 10) 和该范围内的任意的有理数范围 (例如 2 至 8、1.5 至 5.5、和 3.1 至 4.7), 因此, 已清楚地公开了本文所公开的所有范围的所有亚范围。上述这些仅仅是具体描述的例子, 在最低值和最高值之间的数值的所有可能的组合都被认为在本申请中以相似的方式进行了清楚的说明。

附图说明

[0166] 图 1 表示被离心分离的材料的薄层色谱 (TLC)。分析 2 个不同的样品载荷和脂质

标准品（右边道）。

[0167] 图 2 表示与起始原料相比的酸性 / 非酸性部分的 TLC。酸性 (A) 部分主要表现出强的脂肪酸带,而非酸性 (NA) 部分含有大量其他的脂质带。

[0168] 图 3 表示酸性 / 非酸性部分的生物分析结果。

[0169] 图 4 表示 6 种色谱部分的 TLC。右侧表示使用最优化显示所有脂质的条件的部分 1、5 和 6 的重复。

[0170] 图 5 表示 6 种色谱部分的生物分析结果。

[0171] 图 6 表示 11 种甲醇色谱部分的 TLC。

[0172] 图 7 表示色谱部分的生物分析结果。

[0173] 图 8 表示来自制备型 TLC 板 1 的部分的分析型 TLC。

[0174] 图 9 表示制备型 TLC 部分（来自板 1）的生物分析结果。

[0175] 图 10 表示来自制备型 TLC 板 2 的部分的分析型 TLC。

[0176] 图 11 表示制备型 TLC 部分（来自板 2）的生物分析结果。

[0177] 图 12 表示部分 2、3、4b、5a、5b 的 MALDI-TOF MS（由上到下）。

[0178] 图 13 表示部分 3 的低质量范围 MS 谱。

[0179] 图 14 表示针对蚜虫的生物实验结果。

[0180] 图 15 表示来自 K4B3 菌丝体培养物（多个菌管）的氯仿提取物针对蚜虫的生物实验。

[0181] 图 16 表示针对蚜虫的生物实验结果。

[0182] 图 17 表示针对小菜蛾的生物实验结果。

[0183] 图 18 表示在从如本文的实施例 5 所述的巴西安白僵菌菌株 AM2、F480 和 K4B3 提取的总脂质的生物实验中,在 20 个小时（在 20℃）桃蚜的累积死亡率 %。样本 1-9 是 K4B3 脂质的各部分。

[0184] 图 19 表示在来自如本文中实施例 5 所述的巴西安白僵菌菌株 K4B3（白僵菌属）、木霉菌和绿僵菌的各脂质部分的生物实验中,在 21 个小时（在 20℃）桃蚜的死亡率 %。K4B3- 脂质 1 和 K4B3- 脂质 2 是来自同一批培养物 的重复分离物,以甲醇为阴性对照。

[0185] 图 20 表示图 19 和如本文实施例 5 中所述的生物实验中桃蚜的累积死亡率 %。

[0186] 图 21 表示在来自如本文中实施例 5 所述的巴西安白僵菌菌株 K4B3（白僵菌属）、木霉菌和绿僵菌的各种脂质部分的生物实验中小菜蛾幼虫的累积死亡率 %。

[0187] 图 22 表示在来自如本文中实施例 5 所述的巴西安白僵菌菌株 K4B3(FS 和 Beaublast) 和木霉菌的各种脂质部分的生物实验中在 21 个小时（在 20℃）桃蚜的死亡率 %。所测试的部分包括甲醇提取的（-MeOH）部分和氯仿提取的（-氯仿）部分,以甲醇和水作为阴性对照。

[0188] 发明详述

[0189] 本发明部分地涉及分离自子囊菌门真菌的多种菌株（包括白僵菌物种和木霉菌物种）的 1 种或多种脂质以及这些脂质在控制昆虫（例如致植物病的昆虫）中的应用,其中所述 1 种或多种脂质具有对抗昆虫（例如致植物病的昆虫）的效力。

[0190] 定义

[0191] 如本文所用的术语“生物控制剂” (BCA) 是指是或来源于生物学物质的试剂,所述

的生物制剂用作 1 种或多种有机体、通常是 1 种或多种病原体、例如 1 种或多种植物病原体（例如致植物病的昆虫）的拮抗剂，或者能够控制 1 种或多种病原体、例如 1 种或多种植物病原体。拮抗可以采用多种形式。在 1 种形式中，生物控制剂可以仅仅用作驱虫剂。在另一种形式中，生物控制剂可以提供不利于病原体的环境。在进一步的、优选的形式中，生物控制剂可以寄生、致残、致不育、阻止生长、阻止传播或散布、和 / 或杀死病原体。因此，拮抗机制非限制性地包括抗生、寄生、固定、不育和毒性。因此，来源于或者用作 1 种或多种病原昆虫的拮抗剂的试剂能够被称为具有昆虫致病性的效力或杀虫活性。而且，作为昆虫（包括致植物病的昆虫）的拮抗剂的生物控制剂能够被称为昆虫致病剂。

[0192] 如本文所用，“生物控制组合物”是包含或包括至少 1 种作为 1 种或多种病原体（例如 1 种或多种植物病原体）的生物控制剂的组合物。这些控制剂非限制性地包括用作驱虫剂的试剂、提供不利于病原体的环境的试剂、和致残、致不育和 / 或杀死病原体的试剂。

[0193] 因此，如本文所用，“抗致植物病的组合物”是包含或包括至少 1 种作为 1 种或多种植物病原体的拮抗剂的试剂的组合物。在本文中认为该组合物具有抗致植物病的效力。

[0194] 如说明书中所用的术语“包含”是指“至少部分地由其组成”。当解释本说明书中的包括术语“包含”的每一个语句时，除了该术语所引导的特征之外的特征也可以存在。相关的术语（例如“包括”和“含有”）以相同的方式解释。

[0195] 如本文所用的术语“控制”通常包括防止、减少或根除由 1 种或多种病原体引起的感染（例如由 1 种或多种植物病原体引起的感染），或者抑制感染的比例和范围，例如减少在植物或其周围环境中或上的植物病原体种群，其中该感染或种群的防止或减少相对于未经处理的感染或种群是统计学上显著的。也包括治愈性的处理方法。优选地，通过增加病原体种群的死亡率实现该控制。

[0196] 术语“昆虫致病性的活性”或“昆虫致病性的效力”在本文中可互换使用，并且其是指某些试剂（例如某些微生物或来源于某些微生物的试剂）对抗 1 种或多种致病昆虫、例如 1 种或多种致植物病的昆虫的能力。

[0197] 在多种实施方案中，所述的昆虫致病性的效力是寄生和致残、致不育、阻止生长或杀死 1 种或多种昆虫、例如致植物病的昆虫的能力，优选在与昆虫接触的 14 天之内，更优选在 7 天内，更优选在 7 天内杀死 1 种或多种致植物病的昆虫的能力。或者，所述的昆虫致病性的效力是支持或促进 1 种或多种昆虫致病性的微生物、例如昆虫致病性的真菌的生长的能力。

[0198] 因此，如本文所用的“昆虫致病性的组合物”通常是包含或包括至少 1 种作为 1 种或多种致病昆虫的拮抗剂的试剂的组合物。在本文中认为该组合物具有昆虫致病性的效力。

[0199] 术语“杀虫活性”和“杀虫效力”在本文中可互换使用，并且其是指某些试剂（例如来源于某些微生物的试剂）致残、致不育、阻止生长或杀死 1 种或多种昆虫、例如 1 种或多种致植物病的昆虫的能力。

[0200] 在多种实施方案中，所述的杀虫效力是致残、致不育、阻止生长或杀死 1 种或多种昆虫、例如致植物病的昆虫的能力，优选在与昆虫接触的 14 天之内，更优选在 7 天内，更优选在 7 天内杀死 1 种或多种昆虫的能力。

[0201] 在某些实施方案中，昆虫致病性的活性是杀虫活性。例如本发明的脂质或脂质部

分的某些实施方案是杀虫的。

[0202] 因此,如本文所用的“杀虫组合物”通常是包含或包括至少 1 种能够致残、致不育、阻止生长或杀死 1 种或多种昆虫的试剂的组合物。在本文中认为该组合物具有杀虫效力。

[0203] 如本文所用的关于 1 种或多种脂质或脂质部分、例如关于如本文实施例中所列举的 1 种或多种脂质部分的术语“功能性变体”是指不同于具体鉴定的实体的脂质或脂质部分,例如其中删除、取代或增加 1 个或多个基团、例如 1 个或多个脂肪酸基团,但是其至少部分地保持具体鉴定的实体的 1 种或多种生物活性,例如引发 1 种或多种由具体鉴定的脂质或脂质部分引发的生物效应的能力。功能性变体可以来自相同的物种或来自其他的物种并且可以包括同系物、相似物和同源物。

[0204] 在本申请中,功能性变体将优选地保持具体鉴定的脂质或脂质部分的至少部分的杀虫活性。

[0205] 测定由本发明的脂质或脂质部分引发的 1 种或多种生物效应(例如杀虫效力)的方法和实验是本领域中熟知的,并且这些方法和实验能够用于鉴别或验证本发明的 1 种或多种脂质或脂质部分的 1 种或多种功能性变体。例如,本发明的脂质的杀死目标昆虫或对抗目标昆虫(例如本文实施例中所述的那些)生长的能力的实验适合于鉴别 1 种或多种脂质的功能性变体。

[0206] 如本文所用的术语“鉴别特征”是指参照实体所具有的和可测定的 1 个或多个属性,例如包括物理化学特征、例如光谱图上存在或不存在特定的峰、在色谱分析中存在或不具有给定的迁移率或洗脱谱的化合物或部分,例如在 TLC 上存在或不具有给定迁移率的带。

[0207] 如本文所用的术语“脂质”包括高度减少的富碳物质,其不溶于水并且包含 1 种或多种脂肪酸、具有长度范围通常为 4-36 个碳原子的烃链的羧酸。脂质包括三酰基甘油、磷脂(包括甘油磷脂和鞘磷脂)、糖脂和甾醇。

[0208] 如本文所用的术语“脂质部分”包括包含 1 种或多种脂质、游离脂肪酸或者两者均有的组合物,其中该部分包含未分离的原料中所存在的总脂质的亚组或由该亚组组成。一般地,脂质部分将具有可测定和可鉴别的组成,例如特征性的色谱图或质谱图。脂质部分的实例在本文中呈现。

[0209] 如本文所用的术语“植物”不仅包括整株植物,而且扩展到植物的部分、切割物以及植物产品,其包括根、叶、花、种子、茎、愈合组织、坚果和水果、鳞茎、块茎、球茎、谷粒、切割物、根状茎或嫩芽,并且包括任意的植物材料,不论是种植前、生长期间和收获时或之后。可以受益于本发明的应用的植物涵盖大范围的农业和园艺作物。本发明的组合物也特别适合于应用于有机生产系统。

[0210] 当用作杀虫剂(例如杀虫脂质或昆虫致病性的真菌菌株)时,术语“保持杀虫效力”或“保持昆虫致病性的效力”和语法上意义相同的词及其衍生词是为了表示具有有用的杀虫或昆虫致病性的活性的试剂。优选地,保持的活性是原始活性的至少约 35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99 或 100%,并且有用的范围可以在这些数值的任意两者间选择(例如从约 35 至约 100%、从约 50 至约 100%、从约 60 至约 100%、从约 70 至约 100%、从约 80 至约 100% 和从约 90 至约 100%)。例如,本发明的优选的脂质功能性变体或成分应该保持杀虫活性,即保持特定的原始脂质或脂质部分的杀虫活性的至少约 35、40、45、50、55、

60、65、70、75、80、85、90、95、99 或 100%。因此,本文所述的脂质部分之一的功能性变体(例如在实施例中列举的脂质部分的变体)应该保持相应的脂质部分的杀虫活性的至少约 35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、99 或 100%。类似地,本发明的优选的组合物能够支持维持其所包含的昆虫致病剂的有效昆虫致病性的活性,并且能够被称为理想地保持昆虫致病性的活性直至使用本文所研究的方法进行施用。

[0211] 如本文所用,当用于本发明的组合物时术语“稳定的”是指组合物能够支持杀虫或昆虫致病性的效力达若干周,优选地约 1、约 2、约 3、约 4、优选地约 5、更优选地约 6 个月或更长时间。例如,当用于另外包含 1 种或多种昆虫致病性的真菌的组合物时,术语“稳定的”是指组合物能够支持昆虫致病性的真菌的复制生存性达若干周,优选地约 1、约 2、约 3、约 4、优选地约 5、更优选地约 6 个月或更长时间。

[0212] 包括特定菌株的同系物或变种的“具有[特定菌株]的鉴别特征的菌株”或“具有[特定菌株]的鉴别特征的培养物”密切地相关于(即享有共同的祖先)或者来源于特定的菌株,但是通常在 1 个或多个基因型或表型特征中不同于该特定菌株。变种通常可通过遗传差别的评估来鉴别。同系物通过遗传、生物化学和形态学差异的程度的评估和使用分类学方法(包括例如分析,例如遗传分类学)来鉴别。然而,具有[特定菌株]的鉴别特征的菌株(包括特定菌株的同系物和变种)将保持昆虫致病性的效力,将不同于其他的菌株,并且使用本文所述的技术可鉴别为亲本的同系物或变种。

[0213] 当用于接受本发明的真菌、方法和组合物的植物时,术语“周围环境”包括毗邻或邻近植物或其根、块茎等的土壤、水、落叶层和/或生长介质、邻近的植物、所述植物的切割物、支撑物、向植物给予的水、和包衣(包括种子包衣)。其进一步包括贮藏、包装或加工材料,例如保护涂层、盒子和包装纸、和种植、养护或收割设备。

[0214] 植物病原体的控制

[0215] 本发明考虑许多国家的园艺部门(包括例如美国、新西兰和欧洲的许多国家的园艺部门)面临在致植物病的昆虫害虫中增加的杀虫剂耐药性的问题。在某些管理制度下由管理制度障碍导致的新的化学杀虫剂的可用性降低加重了这种情况。

[0216] 作为生物控制剂的来源于真菌的杀虫脂质的应用为该问题提供了解决方案。有效的生物控制剂能够根据其致残或杀死目标致植物病的昆虫或昆虫种群的能力进行选择。在有益条件下,致植物病的昆虫(例如蚜虫、蓟马和粉虱)可能感染植物及其周围环境(包括土壤、落叶层、邻近植物、支撑物等)。可以施用来源于真菌的杀虫脂质和由其衍生的试剂来致残和/或杀死致植物病的昆虫,从而防止或限制病原体的致病能力。在该领域中,来源于真菌的杀虫脂质的有效性经常因此依赖于其在各种气候条件下保持杀虫效力的能力,例如被湿润期和干燥所阻断。来源于昆虫致病性的真菌的试剂(例如本文所述的脂质)的有效性通常不需要维持存活,而是需要维持杀虫效力。

[0217] 根据本发明有效对抗昆虫(例如致植物病的昆虫)并且因此适合于使用的本发明的脂质或脂质部分被鉴定为相对于对照处理(本发明的脂质或其功能性变体与对照进行比较)能以统计学上显著的量而有效地减少目标昆虫的种群的物质。这些脂质或脂质部分能够被视为具有杀虫效力。如本文所述,目标昆虫的种群的减少可能依赖于各种拮抗机制。例如,脂质可以致残、致不育、抑制生长或发育、和/或优选地杀死致植物病的昆虫,或者可以支持或促进同时存在的 1 种或多种昆虫病原微生物(例如与本发明的脂质或脂质部分一

起存在于组合物中的昆虫致病性的真菌（不论是分别地、同时地或先后地施用）的生长和昆虫致病性的效力。就其本身而言，本发明的脂质或脂质部分可以实现或者支持昆虫病原微生物（例如昆虫致病性的真菌）的寄生、致残、致不育和 / 或优选地杀死致植物病的昆虫的能力。本发明的脂质或脂质部分也可以通过提供不利于致植物病的昆虫的环境（例如将 1 种或多种真菌施用于植物或其周围环境）来减少目标昆虫的种群。在该实施方案中，脂质或脂质部分可以被认为用作驱虫剂并且在植物或其周围环境的邻近地区减少目标昆虫的有效种群。

[0218] 在 1 个实施方案中，脂质是如本文所定义的功能性变体。

[0219] 优选地，合适的本发明的脂质或脂质部分或其功能性变体表现出约 5% 杀虫效力、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、更优选至少约 50% 的杀虫效力，其表示为相对于对照处理的相关昆虫种类的种群的百分比减少。通过举例说明，本文所述的方法用于鉴别有效对抗各种目标昆虫的白僵菌属的脂质部分分离物，而类似于本文所述方法的方法能够用于其它的真菌和昆虫种类。

[0220] 尽管对于被视为适合于用作生物控制剂的脂质或脂质部分的杀虫效力是主要的必备条件，但是脂质或脂质部分可以具有另外的适合于用作生物控制剂的特征。

[0221] 例如，脂质或脂质部分应该能够以有效的形式贮存合理的时间，最终使其作为生物控制剂以有效的形式和浓度被施用于目标植物或其周围环境。

[0222] 本领域的技术人员应当理解，本发明的脂质或脂质部分和组合物可以包含 1 种或多种本发明的脂质或脂质部分的 1 种或多种功能性变体，或者本发明的方法可以使用 1 种或多种本发明的脂质或脂质部分的 1 种或多种功能性变体，包括本文中所举例的那些。脂质或脂质部分与其功能性变体的组合也是有用的。

[0223] 分离脂质的方法

[0224] 生产和分离 1 种或多种本发明的脂质或脂质部分的示例性的方法如本文中所记载。其包括从 1 种或多种子囊菌门真菌（例如白僵菌物种（包括例如巴西安白僵菌 K4B3）或者木霉菌物种）的培养物分离出 1 种或多种脂质或脂质部分。

[0225] 或者，本发明的脂质或脂质部分，包括其功能性变体，可以使用本领域中熟知的脂质合成方法进行制备。

[0226] 包含昆虫致病性的真菌的组合物

[0227] 如果在某些管理制度下并非不可能，那么昆虫致病性的真菌的引入常常是有问题的、昂贵的和不切实际的。例如，由于管理和法律禁止，在某国之外的国家可获得的昆虫致病性的真菌对于该国内的园艺师可能是不可获得的。因此，本发明认为鉴别和制备具有来自这些真菌的昆虫致病性的效力或者能够支持或促进昆虫致病性的真菌（或者其他的昆虫病原微生物）的生长并能够帮助这些昆虫病原微生物在各种环境条件下繁荣、或者两者兼有的试剂具有显著的优势。

[0228] 所述真菌的分离物可以方便地从环境获得，包括例如从植物、其周围环境，和从所述的植物的病原体获得。在某些实施方案中，所述真菌的分离物可以从目标昆虫、或者从将要随后施用包含所述真菌的生物控制剂或包含所述真菌的组合物的植物物种（或周围环境）获得。

[0229] 测定在不同条件下所述真菌的生长方法（包括不同的温度和在不同的介质或

其他底物上)是本领域中熟知的。同样地,测定本发明的脂质对真菌生长的正面影响(例如,与不存在所述的脂质时所发现的情况相比,存在脂质时所述真菌的毒性或昆虫致病性的效力增加)的方法也是本领域中熟知的。本文记载了测定本发明的脂质在各种温度或者在各种植物、环境或目标有机体上影响真菌生长的能力的方法的实例。

[0230] 尽管昆虫致病性的效力是分离物被认为适合于用作生物控制剂的主要必备条件,但是真菌分离物应该具有另外的适合于用作生物控制剂的特征。

[0231] 例如,真菌应该能够以可存活的形式贮存理合的时间,最终使其作为生物控制剂以有效的形式和浓度被施用于目标植物或其周围环境。

[0232] 当真菌因为其适合于用作生物控制剂而被施用于植物或其周围环境时,其也应该能够达到感染阈值。如本文所用,感染阈值是指真菌在目标植物或其周围环境建立从而具有昆虫致病性的效力所需的真菌浓度。应当理解,为了达到感染阈值,真菌的某些分离物可能需要以几乎不现实的或不可行的高比率施用。而且,不论其施用的浓度或比率如何,某些真菌分离物可能不能达到感染阈值。合适的昆虫致病性的真菌当以不小于 10^{10} 孢子/公顷的比率施用时、或者以不小于 10^7 孢子每毫克组合物的浓度(此时所述的组合物以约 1kg/1000L/公顷的比率施用)施用时能够达到感染阈值。

[0233] 测定感染阈值的方法是本领域中熟知的,并且这些方法的实例在本文中呈现。在某些实施方案中,感染阈值能够直接测定,例如通过分析 1 个或多个从目标植物、其周围环境、和/或所述植物的病原体获得的样本和测定所述的样本中真菌是否存在或真菌的量。在其他的实施方案中,感染阈值能够间接测定,例如通过观察 1 种或多种致植物病的昆虫的种群数量的减少。也包括这些方法的组合。

[0234] 巴西安白僵菌是土壤生的真菌,其攻击幼虫和成虫,包括例如蝗虫、蚜虫、蓟马、蛾和若干其他种类。通常,巴西安白僵菌能够从昆虫尸体分离出来,例如蚜虫、蛀虫和蓟马,并且也可以从土壤分离出来。示例性的昆虫致病性的巴西安白僵菌菌株 K4B3 可以用于本发明的某些实施方案,并且出于专利程序的目的根据布达佩斯条约于 2008 年 10 月 14 日将其保藏于澳大利亚国家测量所(NMIA,前身是澳大利亚政府分析实验室(AGAL)), 1Suakin Street, Pymble, 新南威尔士, 澳大利亚。分离群已经被授予保藏编号 V08/025855。

[0235] 因此,在 1 个方面本发明提供方法和组合物,其包含 1 种或多种本发明的脂质、或者 1 种或多种对其编码的多核苷酸、以及复制可存活的形式和量的巴西安白僵菌菌株 K4B3, NMIA 号 V08/025855、或具有菌株 K4B3, NMIA 号 V08/025855 的鉴别特征的白僵菌。

[0236] 巴西安白僵菌菌株 K4B3 是特别有效的生物控制剂,其能够存活于间断的潮湿期、干燥,并且能够寄生、致残和杀死田野中的致植物病的昆虫,例如但不限于蚜虫、毛虫、粉虱、蛾、瓦螨属小虫、蝉和蓟马。

[0237] 在本发明的其他实施方案中,巴西安白僵菌 K4B3 可以用于制备包含 1 种或多种本文所鉴别的脂质的组合物。

[0238] 在 1 个实施方案中,方法包含维持巴西安白僵菌 K4B3V08/025855 的培养物在适合于至少 1 种脂质的产生的条件下;和从巴西安白僵菌 K4B3V08/025855 分离出至少 1 种脂质。

[0239] 在 1 个实施方案中,组合物包含 2 种或更多种如本文所述的脂质。显然,这些脂质与白僵菌属已知的杀虫剂(例如白僵菌素、白僵菌素-F 和类白僵菌素)不具有显著的同一

性或同源性。在 1 个实施方案中,组合物是包含 2 种或更多种如本文所述的脂质的协同组合物。

[0240] 在另一个实施方案中,组合物另外包含少于约 1mgL^{-1} 白僵菌素,少于约 0.5mgL^{-1} 白僵菌素、少于约 0.1mgL^{-1} 白僵菌素、少于约 0.05mgL^{-1} 白僵菌素、少于约 0.01mgL^{-1} 白僵菌素、少于约 0.005mgL^{-1} 白僵菌素、少于约 0.001mgL^{-1} 白僵菌素、少于约 0.0005mgL^{-1} 白僵菌素或少于约 0.0001mgL^{-1} 白僵菌素。

[0241] 在另一个实施方案中,组合物另外包含少于约 1mgL^{-1} 白僵菌素 -F,少于约 0.5mgL^{-1} 白僵菌素 -F、少于约 0.1mgL^{-1} 白僵菌素 -F、少于约 0.05mgL^{-1} 白僵菌素 -F、少于约 0.01mgL^{-1} 白僵菌素 -F、少于约 0.005mgL^{-1} 白僵菌素 -F、少于约 0.001mgL^{-1} 白僵菌素 -F、少于约 0.0005mgL^{-1} 白僵菌素 -F 或少于约 0.0001mgL^{-1} 白僵菌素 -F。

[0242] 在另一个实施方案中,组合物另外包含少于约 1mgL^{-1} 的类白僵菌素、少于约 0.5mgL^{-1} 的类白僵菌素、少于约 0.1mgL^{-1} 的类白僵菌素、少于约 0.05mgL^{-1} 的类白僵菌素、少于约 0.01mgL^{-1} 的类白僵菌素、少于约 0.005mgL^{-1} 的类白僵菌素、少于约 0.001mgL^{-1} 的类白僵菌素、少于约 0.0005mgL^{-1} 的类白僵菌素或少于约 0.0001mgL^{-1} 的类白僵菌素。

[0243] 在多种实施方案中,组合物是协同组合物,其包含 1 种或多种如本文所述的脂质、以及 1 种或多种白僵菌素(例如白僵菌素 -A、白僵菌素 -D、白僵菌素 -E 或白僵菌素 -F) 或 1 种或多种类白僵菌素、或其任意组合。

[0244] 例如,组合物另外包含多于约 0.1mgL^{-1} 的白僵菌素、多于约 0.5mgL^{-1} 的白僵菌素、多于约 1mgL^{-1} 的白僵菌素、多于约 5mgL^{-1} 的白僵菌素、多于约 10mgL^{-1} 的白僵菌素、多于约 50mgL^{-1} 的白僵菌素或多于约 100mgL^{-1} 的白僵菌素。

[0245] 在另一个实施例中,组合物另外包含多于约 0.1mgL^{-1} 的类白僵菌素、多于约 0.5mgL^{-1} 的类白僵菌素、多于约 1mgL^{-1} 的类白僵菌素、多于约 5mgL^{-1} 的类白僵菌素、多于约 10mgL^{-1} 的类白僵菌素、多于约 50mgL^{-1} 的类白僵菌素或多于约 100mgL^{-1} 的类白僵菌素。

[0246] 在另一个实施方案中,组合物是协同组合物,其包含 1 种或多种如本文所述的脂质和 1 种或多种如本文所述的昆虫致病性的真菌、以及 1 种或多种白僵菌素(例如白僵菌素 -A、白僵菌素 -D、白僵菌素 -E 或白僵菌素 -F) 或 1 种或多种类白僵菌素、或其任意组合。

[0247] 本发明的巴西安白僵菌菌株 K4B3 可以单独使用,或者与本文所述的其他的昆虫致病性的真菌组合使用。其他的昆虫致病性的真菌的实例更详细地记载于下文中。

[0248] 巴西安白僵菌菌株 K4B1 分离自新西兰的 Bombay 的松林内的蛀虫幼虫。出于专利程序的目的,根据布达佩斯条约,该巴西安白僵菌分离群已经于 2005 年 3 月 16 日被保藏于澳大利亚国家测量所,1 Suakin Street, Pymble, 新南威尔士, 澳大利亚。分离群已经被授予保藏编号 NM05/44595。

[0249] 巴西安白僵菌分离群 K4B1 表现出对蓟马成虫的偏好,并且对蓟马幼体和蛹、蚜虫和粉虱也是致病性的。K4B1 的分生孢子形成奶油状聚集体。

[0250] 巴西安白僵菌分离群 K4B2 分离自新西兰的 Aka Aka 平原中的向日葵上的鳞翅目毛虫。出于专利程序的目的根据布达佩斯条约该巴西安白僵菌分离群已经于 2006 年 3 月 3 日被保藏于澳大利亚国家测量所。分离群已经被授予保藏编号 NM06/00010。

[0251] 巴西安白僵菌分离群 K4B2 表现出对毛虫(包括大豆尺蠖毛虫以及粉蝶和粘虫毛虫)的偏好。该分离群对蓟马幼体、成虫和蛹、蚜虫和粉虱也是致病性的。K4B2 的分生孢子

形成黄色粉尘状聚集体。

[0252] NMIA 号 V08/025855、NMIA 号 NM05/44595、NMIA 号 NM06/00010 和巴西安白僵菌的其他合适的分离群可以与 1 种或多种本发明的脂质或其功能性变体或片段组合使用,并且是特别有效的生物控制剂,其能够存活于间断的潮湿期、干燥,并且能够寄生、致残和杀死田野中的致植物病的昆虫,例如但不限于蚜虫、毛虫、粉虱、蛾、瓦螨属小虫和蓟马。巴西安白僵菌的这些分离群杀死粉虱、蓟马和蚜虫的程度通常与常用的如上所述的杀虫剂一样好。对这些杀虫剂的耐药性已经发生;在这些和其他情况中,包含巴西安白僵菌分离群的组合物或使用巴西安白僵菌分离群的方法提供了昆虫控制的有效替代方案。在植物病害的控制中的有效活性以及没有发现任何由巴西安白僵菌引起的植物病原性,证明这些物种的分离群具有用作生物控制剂的理想属性。

[0253] 以前尚未描述过木霉属物种的任何杀虫活性或作用。木霉培养物通常在 25–30°C 快速生长,但在 35°C 将不生长。起初菌落在培养基(例如玉米粉右旋糖琼脂(CMD))上是透明的或者在更丰富的培养基(例如马铃薯右旋糖琼脂(PDA))上是白色的。菌丝体通常在 CMD 上是不明显的,分生孢子通常在 1 周内形成绿色或黄色或较少见的白色的致密或松散的簇。黄色色素可以被分泌到琼脂中,特别是在 PDA 上。某些物种产生特征性的甜味或“椰子”气味。

[0254] 分生孢子梗高度分枝,因此其难以定义或测量,其松散地或致密地簇生,通常形成于不同的同心环中或者沿着缺乏的气生菌丝生长。分生孢子梗的主要分枝产生可以成对或不成对的横向侧枝,最长的分枝远离末端并且通常从靠近末端的主轴上直接产生瓶状小梗。分枝可以再分枝,二级分枝经常是成对的并且最长的二级分枝最接近主轴。所有一级和二级分枝以相对于主轴 90° 或接近 90° 产生。具有成对的分枝的典型木霉分生孢子梗呈现金字塔形外观。通常,分生孢子梗终止于 1 个或几个瓶状小梗中。在某些物种(例如多孢木霉)中,主要的分枝被长的、单一的或分枝的、钩形的、直的或弯曲的、有隔膜的、薄壁的、不育的或末端能育的延伸终止。主轴可以与瓶状小梗的基底有相同的宽度或者其可以更宽得多。

[0255] 瓶状小梗通常在中部增大,但可以是圆柱形的或近球形的。瓶状小梗可以以相对于轮形体的其他成员呈 90° 的角度保持在轮形体中,或者其可以是各种画笔状的(胶枝霉样)。瓶状小梗可以在宽的主轴上密集地簇生(例如多孢木霉、钩状木霉)或者其可以是独生的(例如长枝木霉)。

[0256] 分生孢子通常显得干燥的,但是在某些物种中其可以包含在澄明的绿色或黄色液滴中(例如绿木霉、暗黄木霉)。大多数物种的分生孢子是椭圆形的, $3-5 \times 2-4 \mu\text{m}$ ($L/W \geq 1.3$);球形的分生孢子 ($L/W < 1.3$) 是罕见的。分生孢子通常是光滑的,但是已知在几个物种中是有结节的精细扁平化的分生孢子。

[0257] 聚囊粘菌属是由也具有典型的木霉脓包的某些物种形成的。聚囊粘菌属通过其独特的分生孢子梗而被识别,该分生孢子梗轮生分枝并且在每一个瓶状小梗的末端在澄明的绿色液滴中产生分生孢子。

[0258] 原膜孢子可以由所有物种产生,但是在 CMD 上在 20°C 在 10 天内并非所有物种都产生原膜孢子。原膜孢子通常是单室近球形的并且终止短菌丝;其也可以在菌丝细胞内形成。某些物种的原膜孢子是多室的(例如子座木霉)。

[0259] *Lecanicillium muscarium* 是具有广泛宿主范围（包括同翅类昆虫和其他的节肢动物群）的昆虫致病性的真菌。*L. muscarium* 被认为是物种综合体，其包括各种形态学和生物化学特征的分离群。通常，*L. muscarium* 能够分离自昆虫尸体（例如蚜虫、蓟马、粉虱和粉介壳虫），并且也可分离自土壤。

[0260] *Lecanicillium muscarium* 菌株 K4V1 分离自新西兰的 Pukekohe 的温室番茄作物中的粉虱。出于专利程序的目的根据布达佩斯条约该 *L. muscarium* 分离群已经于 2005 年 3 月 16 日被保藏于澳大利亚国家测量所。分离群已经被授予保藏编号 NM05/44593。

[0261] K4V1 具有其他的鉴别特征：在粉虱介壳虫上 60% 分生孢子 1.0x1.0 微米，在蓟马幼体（幼虫）上 30% 分生孢子 2.0x1.0 微米，在蓟马蛹上 10% 分生孢子 2.5x1.3 微米。在稀少地起皱的菌丝体菌体的下方，菌丝体菌体非常容易地从琼脂移除。

[0262] *L. muscarium* 菌株 K4V2 分离自新西兰的 Ruakaka 的黄瓜温室中的粉虱。出于专利程序的目的根据布达佩斯条约该 *L. muscarium* 分离群已经于 2005 年 3 月 16 日被保藏于澳大利亚国家测量所。分离群已经被授予保藏编号 NM05/44594。

[0263] K4V2 具有其他的鉴别特征：50% 分生孢子 2.0x1.5 μm ，30% 分生孢子 2.0x1.0 μm ，20% 分生孢子 1.0x1.0 μm ，对粉虱成虫致病，同时芽生孢子对蚜虫致病。在经常起皱的菌丝体菌体的下方，菌丝体菌体难以从琼脂表面移除。

[0264] *L. muscarium* 菌株 K4V4 分离自户外有机番茄作物。出于专利程序的目的根据布达佩斯条约该 *L. muscarium* 分离群已经于 2006 年 3 月 3 日被保藏于澳大利亚国家测量所。分离群已经被授予保藏编号 NM06/00007。

[0265] K4V4 具有其他的鉴别特征：50% 分生孢子 1.0x0.5 μm ，对粉虱介壳虫和成虫致病，在低湿度 65-75%、高温 28-32° 非常有攻击性。通常 $v.1 > 75\%$ 。50% 分生孢子 0.5x0.5 μm 。在稀少地起皱的菌丝体菌体的下方，菌丝体菌体在培养基中扩散糕黄色至浅橙色色素。

[0266] NMIA 号 NM05/44593、NMIA 号 NM05/44594、NMIA 号 NM06/00007 和 *L. muscarium* 的其他合适的分离群可以与 1 种或多种本发明的脂质或功能性变体组合使用，并且是特别有效的生物控制剂，其能够存活于间断的潮湿期、干燥，并且能够寄生、致残和杀死田野中的致植物病的昆虫，例如但不限于蚜虫、粉虱、粉介壳虫、瓦螨属小虫和蓟马。

[0267] *Lecanicillium longisporum* 是特别对蚜虫致病的昆虫致病性的真菌。*Lecanicillium longisporum* 菌株 KT4L1 分离自 Franklin, Auckland, 新西兰的大麦草屑植物中的蚜虫。出于专利程序的目的根据布达佩斯条约该 *L. longisporum* 分离群已经于 2006 年 3 月 3 日被保藏于澳大利亚国家测量所。分离群已经被授予保藏编号 NM06/00009。

[0268] 分离群 KT4L1 具有以下鉴别特征：100% 分生孢子 6.0x2.1 μm ，菌丝体菌体米色至黄色，生长极快，其可以被描述为稠度起伏不定的。菌丝体菌体扩散浅红棕色至琼脂。

[0269] NMIA 号 NM06/00009 和 *L. longisporum* 的其他合适的分离群可以与 1 种或多种本发明的脂质或功能性变体组合使用，并且是特别有效的生物控制剂，其能够存活于间断的潮湿期、干燥，并且能够寄生、致残和杀死田野中的致植物病的昆虫，例如蚜虫。

[0270] 玫烟色拟青霉菌是在感染和死亡的昆虫中、和在某些土壤中发现的昆虫致病性的真菌。玫烟色拟青霉菌通常感染粉虱、蓟马、蚜虫和毛虫。

[0271] 玫烟色拟青霉菌的 K4P1 菌株分离自新西兰 Runciman 的卷心菜上出现的小菜蛾毛虫。出于专利程序的目的根据布达佩斯条约该玫烟色拟青霉菌分离群已经于 2006 年 3 月

3 日被保藏于澳大利亚国家测量所。分离群已经被授予保藏编号 NM06/00008。

[0272] NMIA 号 NM06/00008 和玫烟色拟青霉菌的其他合适的分离群可以与 1 种或多种本发明的脂质或功能性变体组合使用,并且是特别有效的生物控制剂,其能够存活于间断的潮湿期、干燥,并且能够寄生、致残和杀死田野中的致植物病的昆虫,例如但不限于粉虱、瓦螨属小虫和鳞翅目毛虫。

[0273] 如上所述,许多植物致病昆虫已经发展出对大量杀虫剂的耐药性;在这些和其他情况中,任选地包含或与其共同给予 1 种或多种真菌分离群(例如上述的那些)的本发明的组合物提供昆虫控制的有效替代方案。在植物病害控制中的有效活性以及没有发现任何由这些试剂引起的植物病原性,证明本发明的脂质和当存在这些物种的真菌分离群时具有用作生物控制剂的理想属性。

[0274] 本发明提供组合物,其包含 1 种或多种本发明的脂质或脂质部分或其功能性变体、以及 1 种或多种昆虫致病性的真菌和至少 1 种载体。

[0275] 组合物可以包括昆虫致病性的真菌的多种菌株,并且在某些实施方案中,多种菌株可以用于靶向于大量的致植物病物种、或大量的不同发育阶段的单一植物病原体、或其组合。例如致植物病的昆虫的蛹形式可以用 1 种真菌菌株进行靶向,而致植物病的昆虫的成虫形式也可以能够用另一种真菌菌株进行靶向,其中两种菌株都包含于本发明的组合物中。在其他的实施方案中,优选 3 种或更少的菌株,并且经常优选单一的菌株。

[0276] 合适地,组合物包含真菌,所述的真菌选自 *Lecanicillium muscarium* 菌株 K4V1(NMIA 登记号 NM05/44593) 或具有其鉴别特征的菌株;*Lecanicillium muscarium* 菌株 K4V2(NMIA 登记号 NM05/44594) 或具有其鉴别特征的菌株;*Lecanicillium muscarium* 菌株 K4V4(NMIA 登记号 NM06/00007) 或具有其鉴别特征的菌株;巴西安白僵菌菌株 K4B1(NMIA 登记号 NM05/44595) 或具有其鉴别特征的菌株;巴西安白僵菌菌株 K4B2(NMIA 登记号 NM06/00010) 或具有其鉴别特征的菌株;*Lecanicillium longisporum* 菌株 KT4L1(NMIA 登记号 NM06/00009) 或具有其鉴别特征的菌株;和玫烟色拟青霉菌株 K4P1(NMIA 登记号 NM06/00008) 或具有其鉴别特征的菌株。

[0277] 特别关注包含 1 种或多种本发明的脂质或其功能性变体和 *Lecanicillium muscarium* 菌株 K4V1(NM05/44593) 或具有其鉴别特征的菌株的组合物、包含 1 种或多种本发明的脂质或其功能性变体和 *Lecanicillium muscarium* 菌株 K4V2(NM05/44594) 或具有其鉴别特征的菌株的组合物、和包含 1 种或多种本发明的脂质或其功能性变体和 *Lecanicillium muscarium* 菌株 K4V1(NM05/44593) 或具有其鉴别特征的菌株的组合物、包含 1 种或多种本发明的脂质或其功能性变体和 *Lecanicillium muscarium* 菌株 K4V2(NM05/44594) 或具有其鉴别特征的菌株的组合物。

[0278] 包含昆虫致病性的真菌的组合物实例是本领域中熟知的,并且包括如在例如 Mycotech 公司的 W095/10597(以 PCT/US94/11542 公开)、由农业部长代表的美国的 W02003/043417(以 PCT/US2002/037218 公开)、McCabe 等人的美国专利号 4,530,834 和 Wright 等人的美国专利申请号 10/657,982(以 US2004/0047841 公开)中所述的那些,将每一个以其整体引入本文作为参考。

[0279] 为了适合施用于植物或其周围环境,所述的至少 1 种载体是农业上可接受的载体,更优选地是选自填充剂刺激物、防结块剂、润湿剂、乳化剂和抗氧化剂,更优选地所述的

组合物包含填充剂刺激物、防结块剂、润湿剂、乳化剂和抗氧化剂的至少之一。优选地,所述的填充剂刺激物是碳水化合物源,例如二糖,包括例如蔗糖、果糖、葡萄糖、或右旋糖,所述的防结块剂选自滑石粉、二氧化硅、硅酸钙、或高岭粘土,所述的润湿剂是脱脂奶粉,所述的乳化剂是基于大豆的乳化剂(例如卵磷脂)或基于植物的乳化剂(例如单二甘油酯),和所述的抗氧化剂是谷氨酸钠或柠檬酸。然而,可以用本领域中熟知的其他实例替换,条件是保持组合物支持杀虫或昆虫致病性的效力和在必要时的真菌活力的能力。

[0280] 优选地,所述的组合物是生物控制组合物。需要有效地作为生物控制剂的组合物中所存在的本发明的杀虫脂质或脂质部分的浓度可根据植物的最终用途、生理调节;病原体感染的类型(包括昆虫物种)、浓度和程度;温度、季节、湿度、生长季的阶段和植物龄;所施用的常规杀虫剂或其他处理(包括杀真菌剂)的数量和类型而变化;植物处理(例如脱叶和剪枝)都可以在配制组合物中考虑在内。

[0281] 杀虫组合物

[0282] 脂质组合物和应用的方法

[0283] 发明人考虑本文所公开的脂质组合物将发现作为用于局部和/或系统的施用于农作物、草、水果和蔬菜、草地、树和/或观赏植物的 BCA 组合物的特别的应用。或者,本文所公开的脂质可以被配制成用于杀死昆虫或控制昆虫种群的喷雾剂、粉尘、粉末、或者其他水制剂、粉化剂或气雾剂。本文所公开的脂质组合物可以预防性地使用,或者一旦认为在特定的环境中目标昆虫将被处理就可以将其投放到环境。脂质组合物可以包含单个的脂质或者可以含有本文所公开的脂质的各种组合。

[0284] 不论施用的方法,以杀虫有效量施用活性脂质部分的量,其将因这些因素而异,例如将被控制的特定的目标昆虫、将被处理的特定的环境、位置、植物、作物或农业场所、环境条件,和杀虫活性脂质组合物的施用的方法、比率、浓度、稳定性和数量。制剂也可以因气候条件、环境因素、和/或施用的频率和/或昆虫感染的严重性而异。

[0285] 通过配制 1 种或多种脂质、其功能性变体或其功能性片段、任选地连同真菌细胞和/或孢子悬液、连同需要的农业上可接受的载体,可以制备所述的组合物。组合物可以在投放前用合适的方法(例如低压冻干、冷冻干燥、烘干)或在水性载体、介质或合适的稀释剂(盐水或其他缓冲液)中进行配制。配制的组合物可以是粉尘或颗粒状材料、或者油(植物或矿物)混悬液、或水或油/水乳剂的形式、或者作为可湿润的粉末、或者组合任意其他的适合于农业应用的载体材料。合适的农业载体能够是固体或液体并且是本领域中熟知的。术语“农业上可接受的载体”涵盖所有通常用于杀虫剂制剂技术中的辅料、惰性成分、分散剂、表面活性剂、增粘剂、粘合剂等;这些是杀虫剂制剂的技术人员所熟知的。制剂可以与 1 种或多种固体或液体辅料混合并且通过各种方法进行制备,例如通过使用常规的制剂技术使杀虫组合物与合适的辅料均匀地进行混合、搀合/或研磨。

[0286] 组合物可以包括 1 种或多种真菌菌株,可以包括 1 种或多种细菌物种,或者包括两者。典型的细菌物种包括例如苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌、土壤杆菌或假单胞菌的物种。

[0287] 油性可流动混悬液

[0288] 在 1 个示例性的实施方案中,生物杀虫剂组合物包含 1 种或多种本发明的脂质或其功能性变体或其功能性片段的油性可流动混悬液,以及任选的 1 种或多种真菌细胞,其

包括表达 1 种或多种本文所公开的新蛋白质的 1 种或多种真菌细胞。

[0289] 水可分散的颗粒

[0290] 在另一个重要的示例性的实施方案中,生物杀虫剂组合物包含水可分散的颗粒。该颗粒包含 1 种或多种本发明的脂质或其功能性变体或其功能性片段,以及任选的 1 种或多种真菌细胞,其包括产生本文所公开的本发明的脂质或脂质部分的 1 种或多种真菌细胞。

[0291] 粉末、粉尘和孢子制剂

[0292] 在第三个重要的示例性的实施方案中,生物杀虫剂组合物包含可湿润的粉末、粉尘、孢子制剂、细胞碎片或胶体浓缩物。该粉末包含 1 种或多种本发明的脂质或其功能性变体或其功能性片段,以及任选的 1 种或多种真菌细胞,其包括产生本文所公开的本发明的脂质或脂质部分的 1 种或多种真菌细胞。杀虫组合物的这些干燥形式可以配制成遇湿立即溶解或者以控释、缓释、或其他时间依赖的方式溶解。这些组合物可以施用于目标昆虫或被目标昆虫摄食,并因此可用于控制既定环境中的昆虫的数量、或这些昆虫的传播。

[0293] 水混悬液和真菌细胞滤液或溶胞产物

[0294] 在第四个重要的示例性的实施方案中,生物杀虫剂组合物包含 1 种或多种本发明的脂质或其功能性变体或其功能性片段的水性混悬液,以及任选的 1 种或多种真菌细胞,其包括能够产生本文所公开的本发明的脂质或脂质部分的 1 种或多种真菌细胞。该水性混悬液可以在施用前进行稀释的浓缩的储备溶液或者以即时使用的稀释的溶液提供。

[0295] 当杀虫组合物包含产生有益的脂质的完整细胞时,这些细胞可以以多种方法进行配制。通过与各种惰性材料(例如无机矿物质(层状硅酸盐、碳酸盐、硫酸盐、磷酸盐等)或植物材料(粉末状的玉米芯、稻壳、胡桃壳等))混合,其可以以可湿润的粉末、颗粒或粉尘应用。制剂可以包括展着剂-粘着剂辅料、稳定剂、其他的农药添加剂、或表面活性剂。液体制剂可以是基于水的或非水的,并且可以以泡沫剂、混悬剂、可乳化的浓缩物等应用。成分可以包括流变学试剂、表面活性剂、乳化剂、分散剂或聚合物。

[0296] 或者,新的杀虫脂质可以通过体外天然或重组表达系统进行制备并且被分离出来随后用于田间施用。这些脂质或脂质部分可以以粗细胞溶胞产物、混悬液、胶体等,或者可以在配制到活性杀虫制剂中之前进行纯化、精制、缓冲调节、和/或进一步处理。同样地,在某些环境下,可能需要从产生脂质的培养物分离出脂质或孢子,并且施用作为活性生物杀虫组合物的这些脂质或孢子的溶液、混悬液或胶体制剂。

[0297] 多功能制剂

[0298] 在某些实施方案中,例如当需要控制多种昆虫种类时,本文所述的杀虫制剂也可以进一步包含 1 种或多种化学杀虫剂(例如化学杀虫剂、杀线虫剂、杀真菌剂、杀病毒剂、杀微生物剂、杀变形虫剂、杀虫剂等)和/或具有与本文所鉴定的杀虫脂质或脂质部分相同或不同的杀虫活性或杀虫特异性的 1 种或多种脂质或脂质部分。杀虫脂质或脂质部分也可以与其他的处理组合使用,例如肥料、除草剂、抗冻剂、表面活性剂、洗涤剂、杀虫皂、休眠油、聚合物、和/或允许在制剂的单次施用之后目标区域长期给药的按时间释放或生物可降解的载体制剂。同样地,制剂可以被制成可食的“饵”或者被制作成昆虫“陷阱”从而允许杀虫制剂对目标昆虫的喂养或摄食。

[0299] 本发明的杀虫组合物也可以用于单独地或者与 1 种或多种另外的杀虫剂、农药、

化学制品、肥料或其他化合物组合向环境场所连续的或同时的施用。

[0300] 包含真菌的组合物

[0301] 当存在于用作生物控制剂的组合物中时,本发明的昆虫致病性的真菌应该是复制地可存活的形式。本文所用的术语复制可存活的包括真菌的菌丝体和孢子形式。例如,出于大多数目的,真菌菌株有利地以孢子(分生孢子或芽生孢子)的形式引入组合物。孢子可以从本文所述的真菌菌株获得,并且可以使用已知的现有技术进行生产。包含1种或多种本发明的脂质或其功能性变体或其功能性片段、任选地连同1种或多种真菌细胞(其包括1种或多种可从本文所述的真菌菌株获得的孢子)构成了本发明的进一步的方面。组合物中真菌孢子的浓度将取决于组合物的用途。典型的浓度范围是从约 1×10^6 至 1×10^{12} 孢子/ml、优选地从约 1×10^7 至 2×10^{10} 、和更优选地 1×10^7 至 1×10^8 孢子/ml。

[0302] 理论上,1个感染单位应该足以感染宿主,但实际上需要最小量的感染单位来引发感染。通常与化学杀虫剂一起使用的致死剂量(LD)的概念对于微生物杀虫剂是不合适的,其中昆虫致病性的某些因素依赖于昆虫致病性的真菌寄生于植物或其周围环境。感染剂量(ID)或感染浓度(IC)的概念是更准确或适用的。ID或IC是指引发感染所需的感染单位的实际量或者暴露于致死的病原体的感染单位的量。因此,施用于田间或温室内的对抗病原体的感染单位的量将影响控制的程度。在适当的地点和正确的时间施用需要的浓度的抗致植物病真菌从而获得害虫的良好控制是重要的;这称为“感染阈值”。

[0303] 显然地,为施用所配制的组合物中的真菌孢子的浓度可以小于为例如贮存所配制的组合物中的真菌孢子的浓度。申请人已经测定,施用本文所述的昆虫致病性的真菌,当以约1L/公顷的比率施用时,感染阈值是约 10^7 孢子/ml的可喷雾的溶液。因此,在1个实施例中,为施用所配制的组合物将优选地具有至少约 10^7 孢子/ml的浓度。在另一个实施例中,为贮存所配制的组合物(例如能够配制成适合于施用的组合物的组合物,例如可湿润的粉末)将优选地具有约 10^{10} 孢子/毫克的浓度。显然地,为贮存所配制的并且随后配制成适合于施用的组合物的组合物的孢子浓度必须足以使所述的用于施用的组合物也充分地浓缩以便能够施用从而达到感染阈值。

[0304] 在某些实施方案中,组合物是能够在超过约2周、优选超过约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、更优选超过约6个月的时间支持杀虫效力(例如1种或多种脂质的效力)的稳定的组合物。为了适用于使用1种或多种昆虫病原微生物(例如如本文所述的昆虫致病性的真菌)的实施方案,组合物优选地能够在超过约6个月的时间支持昆虫病原微生物的复制活力或昆虫致病性的效力。

[0305] 使用本领域中熟知的常规的固体底物和液体发酵技术,本发明的杀虫脂质能够以足够的量生产从而允许用作生物控制剂。例如本发明的脂质或脂质部分可以使用这些生长技术以足够量生产,并且示例性的技术在本文中存在于实施例中。通常在有氧条件下在满足有机体生长的任意温度下进行生长。例如对于巴西安白僵菌,优选从10至32℃、优选25至30℃、和最优选23℃的温度范围。生长介质的pH是微酸性至中性的,即约5.0至7.0,和最优选5.5。对于分离群的孵育时间足以达到静止生长期,当在23℃孵育时约21天,并且将发生于正常的光周期。

[0306] 使用营养膜、浸没培养和大米底物培养技术,来自所选择的菌株的孢子能够大量生产,用于田间施用。通过本领域中熟知的方法可以收获孢子,例如通过常规的过滤或沉降

法（例如离心分离），或者使用旋风分离系统干燥收获孢子。孢子能够立即使用或在 0° 至 6°C、优选 2°C 冷冻地贮存，只要其能够保持复制活力。然而，通常优选当不加入到本发明的组合物中时，在收获后的 2 周内使用。

[0307] 类似地，当需要时，由巴西安白僵菌 K4B3 产生的 1 种或多种脂质可以通过本领域中熟知的方法从巴西安白僵菌 K4B3 分离出来，例如通过分离、过滤或沉降技术（例如离心分离），不论与 1 个或多个细胞裂解步骤（例如对于细胞内的脂质）组合与否（例如对于被分泌到生长介质中的脂质）。

[0308] 本发明的组合物也可以包括 1 种或多种载体，优选 1 种或多种农业上可接受的载体。在 1 个实施方案中，载体（例如农业上可接受的载体）能够是固体或液体。本文中可用的载体包括通常用于配制农业组合物的任意的物质。

[0309] 在 1 个实施方案中，农业上可接受的载体可以选自填充剂、溶剂、赋形剂、表面活性剂、助悬剂、展着剂 / 粘着剂（粘合剂）、消泡剂、分散剂、润湿剂、降漂移剂、辅助剂、辅料或其混合物。

[0310] 本发明的组合物可以通过已确立的方法配制成例如浓缩物、溶液、喷雾剂、气雾剂、浸浴、滴剂、乳剂、可湿润的粉末、可溶的粉末、混悬浓缩物、粉尘、颗粒、水可分散颗粒、微囊、糊剂、凝胶和其他制剂类型。

[0311] 这些方法包括活性成分和农业上可接受的载体物质（例如填充剂、溶剂、赋形剂、表面活性剂、助悬剂、展着剂 / 粘着剂（粘合剂）、消泡剂、分散剂、润湿剂、降漂移剂、辅助剂和辅料）的混合和 / 或研磨。

[0312] 在 1 个实施方案中，固体载体非限制性地包括矿物质土（例如硅酸、硅胶、硅酸盐、滑石粉、高岭土、活性白土、石灰石、石灰、白垩、红玄武土、黄土、粘土、白云石、硅藻土、硫酸铝钙、硫酸镁、氧化镁、地面塑料）、肥料（例如硫酸铵、磷酸铵、硝酸铵和尿素）、和植物产品（例如谷物粉、树皮粉、木粉和坚果壳粉、纤维粉等）。对于作为固体载体的颗粒剂，以下是合适的：粉碎的或分离的天然岩石（例如方解石、大理石、浮石、海泡石和白云石）；无机或有机粉的合成颗粒；有机材料的颗粒（例如锯屑、椰壳、玉米芯、玉米皮或烟草茎）；硅藻土、磷酸三钙、粉末化的岩石或吸附的碳黑；水溶性聚合物、树脂、蜡；或者固体肥料。如果需要，这些固体组合物可以含有 1 种或多种相容的润湿剂、分散剂、乳化剂或着色剂，当其是固体时也可以用作稀释剂。

[0313] 在 1 个实施方案中，载体也可以是液体，例如水；醇类（特别是丁醇或乙二醇）及其醚或酯（特别是乙酸甲基乙二醇酯）；酮类，特别是丙酮、环己酮、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、或异佛尔酮；石油馏分，例如石蜡族或芳香族烃，特别是二甲苯或烷基萘；矿物或植物油；脂肪族氯代烃，特别是三氯乙烷或二氯甲烷；芳香族氯代烃，特别是氯苯；水溶性或强极性溶剂，例如二甲基甲酰胺、二甲亚砜或 N-甲基吡咯烷酮；液化气体；或类似的或其混合物。

[0314] 在 1 个实施方案中，表面活性剂包括非离子表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂和 / 或两性表面活性剂并且促进聚集体在喷雾期间保持在溶液中的能力。

[0315] 展着剂 / 粘着剂促进本发明的组合物粘附于植物表面的能力。表面活性剂、展着剂 / 粘着剂的实例非限制性地包括吐温和 Triton (Rhom and Hass 公司)、Deep Fried™、

Fortune®、Pulse、C. **Daxoil®**、Codacide **oil®**、D-C. **Tate®**、Supamet Oil、

Bond[®]、Penetrant、**Glowelt[®]**和Freeway、**Citowett[®]**、Fortune Plus[™]、Fortune Plus Lite、Fruimec、Fruimec lite、碱金属、碱土金属和芳族磺酸（例如木质素磺酸，苯酚磺酸、萘磺酸和二丁基萘磺酸）的铵盐和脂肪酸的铵盐，烷基和烷基芳基磺酸酯、和烷基、十二烷基醚和脂肪醇硫酸酯、和硫酸化十六烷醇、十七烷醇、和十八烷醇的盐、脂肪醇乙二醇醚的盐、磺化萘和萘衍生物与甲醛的缩合产物、萘或萘磺酸与苯酚和甲醛的缩合产物、聚氧乙烯辛基苯酚醚、乙氧基化异辛基苯酚、乙氧基化辛基苯酚和乙氧基化壬基苯酚、烷基酚聚乙二醇醚、三丁基苯基聚乙二醇醚、烷基芳基聚醚醇、异十三烷基醇、脂肪醇环氧乙烷缩合物、乙氧基化蓖麻油、聚氧乙烯烷基醚、乙氧基化聚氧化丙烯、月桂醇聚乙二醇醚缩醛、山梨醇酯、木素-亚硫酸废液和甲基纤维素。在被选择用于包含时，1种或多种农业表面活性剂（例如吐温）按照需要根据已知的规定包含于组合物中。

[0316] 润湿剂降低组合物中水的表面张力并因此增加可以施用的给定量的组合物的表面积。润湿剂的实例非限制性地包括聚丙烯酸的盐、木素磺酸的盐、苯酚磺酸或萘磺酸的盐、环氧乙烷与脂肪醇或脂肪酸或脂肪酯或脂肪胺的缩聚物、取代的苯酚（特别是烷基苯酚或芳基苯酚）、磺基琥珀酸酯的盐、牛磺酸衍生物（烷基牛磺酸酯）、醇的磷酸酯或环氧乙烷与苯酚的缩聚物的磷酸酯、脂肪酸与多元醇的酯、或上述化合物的硫酸盐、磺酸盐或磷酸盐官能衍生物。

[0317] 在1个实施方案中，施用本发明的化合物或组合物的优选方法是通过手持枪或购买的喷气器将稀释液或浓缩溶液喷雾。

[0318] 如上所述，本发明的组合物可以单独或者与1种或多种其他的农业试剂组合使用，所述的农业试剂包括农药、杀虫剂、杀螨剂、杀真菌剂或杀细菌剂（条件是这些杀真菌剂或杀细菌剂对组合物中所存在的任意的真菌或细菌不是有害的或有毒性的）、除草剂、抗生素、抗微生物剂、杀线虫剂、杀鼠剂、昆虫病原微生物、信息素、引诱剂、植物生长调节剂、植物激素、昆虫生长调节剂、化学绝育剂、微生物害虫控制剂、驱虫剂、病毒、诱食剂、植物营养物、植物肥料和生物学控制。当与其他的农业试剂组合使用时，两种试剂的给药可以分开的、同时的或顺序的。这些农业试剂的具体实例是本领域的技术人员已知的，并且许多容易购买得到。

[0319] 植物营养物的实例非限制性地包括氮、镁、钙、硼、钾、铜、铁、磷、锰、钼、钴、硼、铜、硅、硒、镍、铝、铬和锌。

[0320] 抗生素的实例非限制性地包括土霉素和链霉素。

[0321] 杀真菌剂的实例非限制性地包括以下种类的杀真菌剂：羧酰胺类、苯并咪唑类、三唑类、羟基吡啶类、二羧酰胺类、苯酰胺类、噻二唑类、氨基甲酸酯、氰基-脒类、肉桂酸衍生物、吗啉类、咪唑类、 β -甲氧基丙烯酸酯类和吡啶/嘧啶类。

[0322] 杀真菌剂的进一步的实例非限制性地包括天然杀真菌剂、有机杀真菌剂、基于硫的杀真菌剂、铜/钙杀真菌剂和植物宿主防御的诱发剂。

[0323] 天然杀真菌剂的实例非限制性地包括全乳、乳清、脂肪酸或酯化的脂肪酸。

[0324] 有机杀真菌剂的实例非限制性地包括通过有机验证标准的任意的杀真菌剂，例如生物控制剂、天然产物、诱发剂（某些也可以被分类为天然产物）、和硫和铜杀真菌剂（有限使用）。

[0325] 基于硫的杀真菌剂的实例是 Kumulus[™]DF (BASF, 德国)。

[0326] 铜杀真菌剂的实例是 **Kocide®** 2000DF (Griffin 公司, USA)。

[0327] 诱发剂的实例非限制性地包括壳聚糖、Bion™、BABA (DL-3-氨基-n-丁酸、β-氨基丁酸) 和 Milsana™ (Western Farm Service, Inc., USA)。

[0328] 在某些实施方案中, 可以使用非有机杀真菌剂。非有机杀真菌剂的实例非限制性地包括 Bravo™ (用于葫芦上的 PM 的控制); Supershield™ (Yates, NZ) (用于玫瑰上的葡萄孢属和 PM 的控制); **Topas®** 200EW (用于葡萄和葫芦上的 PM 的控制); Flint™ (用于苹果和葫芦上的 PM 的控制); **Amistar®** WG (用于谷物上的锈菌属和 PM 的控制); 和 Captan™、Dithane™、Euparen™、Rovral™、Scala™、Shirlan™、Switch™ 和 Teldor™ (用于葡萄上的葡萄孢属的控制)。

[0329] 杀虫剂的实例非限制性地包括腈嘧菌酯、联苯三唑醇、萎锈灵、Cu₂O、霜脲氰、环丙唑醇、cyprodinil、dichlofluamid、恶醚唑、烯唑醇、epoxiconazole、拌种咯、咯菌腈、fluquiconazole、氟硅唑、粉唑醇、呋霜灵、guazatin、己唑醇、恶霉灵、伊米萨利、亚胺唑、种菌唑、kresoxim-甲基、代森锰锌、甲霜灵、R-甲霜灵、叶菌唑、恶霜灵、稻瘟酯、配那唑、纹枯脉、丙氯灵、丙环唑、pyroquilone、SSF-109、spiroxamin、戊唑醇、噻苯达唑、tolifluamid、咪唑嗪、三唑酮、三唑醇、粉锈胺、灭菌唑和烯效唑。

[0330] 本文所述的真菌菌株以外的生物控制剂的实例是包含奥德曼细基格孢 (*Ulocladium oudemansii*) 的 BotryZen™ 生物控制剂。

[0331] 组合物也可以包含宽范围的添加剂, 例如稳定剂和用于增强活性成分的渗透剂和所谓“压力”添加剂从而改善孢子活力、萌发和存活性, 例如氯化钾、甘油、氯化钠和葡萄糖。添加剂也可以包括在长期贮存中辅助维持微生物活性的组合物, 例如未精炼的玉米油和含有在外层的油和蜡以及在内层的水、海藻酸钠和分生孢子的混合物的所谓的转化乳剂。

[0332] 本领域的技术人员应当理解, 重要的是, 所用的任何添加剂的量不干扰生物控制剂的效力。

[0333] US5780023 中提供了包括载体、防腐剂、表面活性剂和润湿剂、展着剂和营养物的合适的组合物的实例, 将其全部引入本文作为参考。

[0334] 申请人也已经确定许多常用的杀真菌剂当其存在时不会不利地影响如本文所述的昆虫致病性的真菌。因此包含所述真菌的本发明的组合物也可以包括这些杀真菌剂。或者, 在控制程序中, 组合物可以与这些杀真菌剂联合、但分开使用。

[0335] 本发明也提供生产包含 1 种或多种本发明的脂质或脂质部分或其 1 种或多种功能性变体和 1 种或多种本文所述的昆虫致病性的真菌的组合物的方法, 所述的方法包含提供所述的昆虫致病性的真菌的有复制活力的形式、并且将所述的昆虫致病性的真菌的所述的有复制活力的形式与 1 种或多种本发明的脂质或脂质部分或其功能性变体和至少 1 种农业上可接受的载体组合。

[0336] 组合物可以制备成多种形式。1 种制剂包含粉末形式的本发明的组合物, 其可以喷粉到植物或其周围环境上。在进一步的形式中, 组合物与稀释剂 (例如水) 混合从而形成喷雾剂、泡沫剂、凝胶或滴剂并且使用已知的方法进行恰当地施用。在目前优选的实施方案中, 使用加压喷雾器以约 1gm/L 或者在不少于 1000L 水 / 公顷中以约 1-3kg / 公顷, 将如上配制的组合物与水进行混合。优选地, 作为 UV 和干燥保护剂以约 1ml/L 将 DeepFried™ 或

Fortune Plus™ 加入到组合物中。包含 *L. muscarium*、*L. longisporum* 或玫瑰色拟青霉菌的组合物能够以相似的方式施用。

[0337] 也可以使用为其他的施用方法（例如注射、摩擦或刷）配制的组合物，其实际上可以是任意的已知的本领域的方法。组合物向植物周围或环境（例如土壤、水或种子包衣）的间接施用是潜在上可能的。

[0338] 如上所述，本发明的组合物的浓度可以根据最终用途、植物的生理条件；病原体感染的类型（包括昆虫种类）、浓度和程度；温度、季节、湿度、生长季的阶段和植物年龄；所施用的常规的杀虫剂或其他处理（包括杀真菌剂）的数量和类型；和植物处理（例如摘叶子和剪枝）而变化，包括施用如本文所述的昆虫致病性的真菌的本发明的组合物从而成为有效的生物控制剂。

[0339] 其他的施用技术（包括喷粉、喷洒、土壤浸泡、土壤注射、种子包衣、幼苗包衣、叶喷雾、吹气、蒙上薄雾、雾化、熏蒸、气溶胶化等）也是可行的并且可以在某些情况下是必需的，例如导致根或茎感染的昆虫，或者用于施用于精美植物或装饰植物。

[0340] 本发明的杀虫组合物也可以配制用于预防性施用于区域，并且在某些情况下可以施用于宠物、家畜、动物垫草、或在农场设备中或周围、谷仓、住所或农业或工业设施等。

[0341] 用于环境的、系统的、局部的或叶上施用的杀虫组合物的浓度根据具体制剂的性质、施用的方法、环境条件和杀生物活性的程度而有很大变化。通常，在所施用的制剂中存在的生物杀虫组合物的浓度是按重量计至少约 1% 并且可以达到并包括按重量计约 99%。脂质组合物的干燥制剂可以是按脂质或脂质部分组合物的重量计从约 1% 至约 99% 或更多，而液体制剂可以通常包含按重量计从约 1% 至约 99% 或更多的活性成分。就其本身而论，各种制剂是可制备的，其包括包含按重量计从约 5% 至约 95% 或更多的杀虫脂质的那些制剂，包括包含按重量计从约 10% 至约 90% 或更多的杀虫脂质的那些制剂。很自然地，包含按重量计从约 15% 至约 85% 或更多的杀虫脂质的组合物、和包含按重量计从约 20% 至约 80% 或更多的杀虫脂质的制剂也认为落入本文的范围内。

[0342] 在其中包含含有杀虫脂质的完整的真菌细胞的组合物的情况中，制剂将通常含有从约 10^4 至约 10^8 个细胞 /mg，尽管在某些实施方案中可能需要使用包含从约 10^2 至约 10^4 个细胞 /mg 的制剂，或者当需要更高浓度的制剂时，也可以配制包含从约 10^8 至约 10^{10} 或 10^{11} 个细胞 /mg 的组合物。或者，可以制备细胞糊剂、孢子浓缩物、或者脂质或脂质部分混悬浓缩物，其含有从约 10^{12} 至 10^{13} 个细胞 /mg 活性脂质的当量，并且这些浓缩物可以在施用之前进行稀释。

[0343] 在 1 种或多种所需要的施用中，上述的杀虫制剂可以向特定的植物或目标区域给药，典型的田间施用比率每公顷范围在从约 50g/ 公顷至约 500g/ 公顷的活性成分的数量级，或者可以使用从约 500g/ 公顷至约 1000g/ 公顷。在某些情况中，甚至可能需要以从约 1000g/ 公顷至约 5000g/ 公顷或更多的活性成分的施用比率向目标区域施用杀虫制剂。事实上，认为在从约 50g 活性脂质 / 公顷至约 10,000g/ 公顷的范围内的所有施用比率都可用于使用该杀虫制剂的目标昆虫害虫的管理、控制和杀灭中。因此，在上文所述的杀害虫制剂的某些农业、工业和驯养的应用中，可以使用约 100g/ 公顷、约 200g/ 公顷、约 300g/ 公顷、约 400g/ 公顷、约 500g/ 公顷、约 600g/ 公顷、约 700g/ 公顷、约 800g/ 公顷、约 900g/ 公顷、约 1kg/ 公顷、约 1.1kg/ 公顷、约 1.2kg/ 公顷、约 1.3kg/ 公顷、约 1.4kg/ 公顷、约 1.5kg/

公顷、约 1.6kg/ 公顷、约 1.7kg/ 公顷、约 1.8kg/ 公顷、约 1.9kg/ 公顷、约 2.0kg/ 公顷、约 2.5kg/ 公顷、约 3.0kg/ 公顷、约 3.5kg/ 公顷、约 4.0kg/ 公顷、约 4.5kg/ 公顷、约 6.0kg/ 公顷、约 7.0kg/ 公顷、约 8.0kg/ 公顷、约 8.5kg/ 公顷、约 9.0kg/ 公顷、和甚至达到并且包括约 10.0kg/ 公顷或更高的活性脂质的比率。

[0344] 例如,在某些应用中,包含本文所述真菌的组合物可以以从约 1×10^{10} 至约 1×10^{15} 孢子 / 公顷、优选从约 1×10^{12} 至约 1×10^{14} 孢子 / 公顷、更优选从约 5×10^{12} 至约 1×10^{14} 孢子 / 公顷、更优选约 $1-3 \times 10^{13}$ 孢子 / 公顷的比率使用。

[0345] 在进一步的方面,本发明提供用于控制 1 种或多种致植物病的昆虫的方法,所述的方法包含向植物或其周围环境施用本文所述的脂质或脂质部分。

[0346] 在 1 个实施方案中,施用 1 种或多种如本文所例举的脂质部分以及 1 种或多种如本文所述的其他的昆虫致病性的真菌。

[0347] 优选地,所述的 1 种或多种其他的真菌选自巴西安白僵菌菌株 K4B3 (NMIA 登记号 V08/025855) 或具有其鉴别特征的菌株 ;*Lecanicillium muscarium* 菌株 K4V1 (NMIA 登记号 NM05/44593) 或具有其鉴别特征的菌株 ;*Lecanicillium muscarium* 菌株 K4V2 (NMIA 登记号 NM05/44594) 或具有其鉴别特征的菌株 ;*Lecanicillium muscarium* 菌株 K4V4 (NMIA 登记号 NM06/00007) 或具有其鉴别特征的菌株 ;巴西安白僵菌菌株 K4B1 (NMIA 登记号 NM05/44595) 或具有其鉴别特征的菌株 ;巴西安白僵菌菌株 K4B2 (NMIA 登记号 NM06/00010) 或具有其鉴别特征的菌株 ;*Lecanicillium longisporum* 菌株 KT4L1 (NMIA 登记号 NM06/00009) 或具有其鉴别特征的菌株 ;和玫烟色拟青霉菌株 K4P1 (NMIA 登记号 NM06/00008) 或具有其鉴别特征的菌株。

[0348] 此外,在控制过程中可以使用本发明的多种脂质,不论其是否与具有对抗 1 种或多种致植物病的昆虫物种的活性的昆虫致病性的真菌的多种菌株组合。

[0349] 幼小的幼苗通常非常容易受来自昆虫害虫的损害影响。因此,考虑在显露之前本发明的组合物向刚刚种植的作物施用,正如在显露时施用。

[0350] 也考虑在作物周期中相同或不同的时间重复的施用。可以在季节早期或晚期施用本发明的杀虫脂质、包含本发明的杀虫脂质的组合物。这可以是开花或结果期间。也可以在收获之前或收获之后立即施用本发明的杀虫脂质或包含本发明的杀虫脂质的组合物从而迅速寄生到坏死或老化的叶、果实、茎、机械收割的茎等,以便防止昆虫寄生。也可以在冬季向休眠的植物施用本发明的杀虫脂质或本发明的组合物从而延缓昆虫在休眠组织上的生长。

[0351] 施用可以在萌芽之前或之后以及收获之前和之后。然而,处理优选在开花和收获之间进行。为了增强效力,优选本发明的杀虫脂质或本发明的组合物的多次施用(例如在开花至结果的阶段 2 至 6 次施用)。

[0352] 在雨后也应当考虑本发明的杀虫脂质或组合物的再施用。使用昆虫传染性预测模型或感染分析数据,BCA 的施用也能够及时应对昆虫感染风险期。

[0353] 在各种示例性的实施方案中,本发明的脂质或脂质部分和包含这些脂质或脂质部分的组合物对于其以能够达到杀虫效力的剂量比率所施用的植物或植物周围环境不是有害的。

[0354] 在目前优选的实施方案中,以溶液施用本发明的杀虫脂质或包含杀虫脂质的组合

物,例如如上所述的,使用加压喷雾器进行。植物部分应该被轻轻地喷洒直至其恰好用完之前。可以向植物的任意部分和 / 或其周围环境进行施用,例如向整个植物株冠、向株冠中的花和发育的果实聚集的区域、或向植物茎和 / 或邻近根、块茎等或者在其周围的土壤、水或生长介质。

[0355] 优选地,组合物是稳定的。如本文所用,术语“稳定的”是指组合物能够支持杀虫效力若干周,优选约 1、约 2、约 3、约 4、优选约 5、更优选约 6 个月或者更长。优选地,组合物不需贮存在特定的条件(例如冷藏或冷冻)下就是稳定的。

[0356] 所施用的组合物控制致植物病的昆虫。致植物病的昆虫对许多收获前和收获后的疾病负责,所述的疾病攻击植物部分并且降低生长率、开花、结果、生产并且可能导致受害的植物死亡。如本文所用,致植物病的昆虫包括其本身是植物病原体的昆虫、和可以作为其他植物病原体例如致植物病的真菌和细菌的媒介的昆虫。应当理解,通过控制作为其他植物病原体的媒介的宿主昆虫,植物病的发生率和 / 或严重性能够降至最低。

[0357] 影响许多生长于新西兰的重要园艺作物的主要的致植物病的昆虫实例呈现于下表 1 中。

[0358] 表 1. 主要的昆虫害虫

[0359]

作物	种植者的数目	种植面积 (ha)	主要的害虫
樱桃		550	蚜虫
马铃薯	321	10,611	蚜虫、粉虱
番茄(室内)	390	167	粉虱、毛虫
芸苔	227	3,746	粉虱、毛虫
南瓜	181	6,560	粉虱、蚜虫
番茄 (Tamarillos)	175	270	粉虱、蚜虫
草莓	125	361	蚜虫、蓟马
黄瓜(室内)		55	蚜虫、蓟马、粉虱
洋葱	150	5,488	蓟马
番茄(室外)	80	609	粉虱、毛虫、蓟马
辣椒	142	87	蓟马、蚜虫、粉虱、毛虫
莴苣	252	1,287	蚜虫、蓟马
西葫芦	125	1,033	粉虱、蚜虫

[0360] 特别关注使用本发明的脂质和脂质部分、组合物和方法控制包括在以上所列作物中的半翅目昆虫（例如粉虱、蓟马、蚜虫和毛虫）。也特别关注使用单独的或与 1 种或多种巴西安白僵菌真菌菌株或 *L. muscarium* 或玫烟色拟青霉菌一起的本发明的脂质或脂质部分和包含其的本发明的组合物控制瓦螨属小虫 (*Varroa mite*)。

[0361] 本发明的方法具有在收获前或后对植物和植物产品的特定的施用。例如本发明的组合物可以施用于以上所列类型的贮存的产品，其包括水果、蔬菜、插瓶花和种子。合适的施用技术包含以上所鉴定的那些，特别是喷雾。

[0362] 与直接施用于植物相反，组合物能够有效地用于处理或预处理土壤或种子。组合物可以发现在植物处理材料（例如保护性涂层、盒子和包裹物）中的应用。

[0363] 本发明也包含直接用本发明的脂质或本发明的组合物处理的植物、植物产品、土壤和种子。

[0364] 本发明包括上述内容，并且也可理解下文给出的只是实施例，并不以任何方式限制本发明的范围。

[0365] 实施例 1 - 昆虫控制的生物分析

[0366] 该实施例描述了建立测定各种脂质或脂质部分的杀虫效力的稳定的生物分析。

[0367] 使用标准 1) 有效性、2) 敏感性和 3) 易用性建立和评价目标昆虫分析。

[0368] 在恒温室中在卷心菜植物上培养的目标昆虫烟蚜（桃蚜，半翅目）用于所有的实验。为了用脂质部分样品接种蚜虫，将蚜虫转移至在 1% 水琼脂板的表面上的一片卷心菜叶，使用 0.05% 吐温 80 作为叶和琼脂间的润湿剂。使用混合年龄的蚜虫，通常每个 Petri 皿为 30-50 只。

[0369] 对手持 Paasche 喷枪进行改进从而采用微体积并且用于雾化 300 μ l 的试验或对照溶液。随后，具有处理的蚜虫的板维持在 20°C、12h 光照 : 12h 黑暗并且每日检查。移除死掉的。在喷雾后直接计数接种的蚜虫从而避免 在死亡率 % 中包括新生的蚜虫，但是不去努力移除在孵育期间的新生若虫。

[0370] 实施例 2 - 杀虫脂质的鉴定

[0371] 该实施例描述了来自白僵菌 K4B3 的杀虫脂质部分的鉴定和制备。

[0372] 方法

[0373] 样品

[0374] 有机溶剂 - 为这些研究提供并且使用提取的 K4B3 菌丝体样品。

[0375] 分析型 TLC

[0376] 在 Merck 高效薄层色谱 (HPTLC) 板上使用由 Macala 等人 (1983) 记载的溶剂系统进行分析型 TLC。通过浸入硫酸铜 - 磷酸并且在 170° 加热 15-30 分钟使板显影。

[0377] SAX 酸性 / 非酸性分离

[0378] Waters AccellPlus QMA 固相萃取盒用于阴离子交换从非酸性中分离出酸性脂质。盒先用氯仿 - 甲醇 - 0.8M 醋酸钠 (30:60:8) 调节，然后用氯仿 - 甲醇 - 水 (30:60:8) 洗涤。在后者的溶剂混合物中装载样品，该溶剂混合物也用于洗脱非保留（非酸性）成分。保留的酸性脂质用氯仿 - 甲醇 - 0.8M 醋酸钠 (30:60:8) 洗脱。

[0379] WAX 酸性 / 非酸性分离

[0380] 为了更大规模地从非酸性分离出酸性脂质，按照上述的过程，除了柱子用已经用

氯仿-甲醇-0.8M 醋酸钠 (30:60:8) 调节的 DEAE- 交联葡聚糖凝胶 A50 (Pharmacia) 进行自填充,然后用氯仿-甲醇-水 (30:60:8) 平衡。

[0381] 正相色谱法

[0382] 在氯仿中自填充的硅胶 60 (BDH, 120 孔) 柱上进行正相色谱法。在氯仿中装载样品,并且用氯仿 (~ 7 柱床体积)、氯仿-丙酮 (9:1, ~ 7 柱床体积) 和最终的甲醇 (~ 7 柱床体积) 洗脱。

[0383] 制备型 TLC

[0384] 在用 2:1 或 3:1 的比例用氯仿稀释的氯仿-甲醇-乙酸-甲酸-水 (35:15:6:2:1) 展开的 20x20cm 硅胶板 (Merck, 2mm 厚度) 上进行制备型 TLC。通过将展开的板的每一个垂直边缘的约 1cm 浸在碘的氯仿溶液中定位带。然后从板刮下相关区域并且用甲醇从硅胶上洗脱分离出的成分。

[0385] MALDI-TOF/TOF 质谱法

[0386] Bruker Daltonics Ultraflex III MALDI-TOF/TOF 用于化合物的质量测定和 MS/MS 碎片化。 α -氰基-羟基肉桂酸被用作 MALDI 基质。样品与基质混合并且在 Bruker Anchorchip 目标板上产生斑点。使用 Bruker 肽校准混合物进行校准。

[0387] NMR

[0388] Varian 500MHz NMR 用于来自正相色谱的甲醇-洗脱部分的部分 3 的分析。

[0389] 结果和讨论

[0390] 离心分离

[0391] 起始材料进行离心。离心的颗粒材料和过滤的上层清液在生物分析中测试。发现全部生物活性包含在颗粒材料中。该材料具有脂肪样稠度并且难溶于水。材料的显微镜分析显示没有清晰的定义或可鉴定的结构。

[0392] 进行薄层色谱法 (TLC) 用于测定脂质的存在。图 1 表明展开的 TLC 板。样品明显含有大量类似于脂质标准物的迁移的组分。强脂肪酸组分是特别明显的。

[0393] 酸性 / 非酸性的分离

[0394] 使用 SAX SPE (强阴离子交换固相萃取) 将脂质分离为酸性和非酸性部分。两部分都在 TLC 上运行 (图 2) 并且在生物分析中进行测试。结果表明尽管仅仅实现酸性物与非酸性物的不完全分离,但是在非酸性部分中明显有更强的活性 (图 3)。

[0395] 正相色谱法

[0396] 使用正相柱色谱法根据极性分离出非酸性样品。收集 6 种部分,在 TLC 上运行 (图 4) 并且在生物分析中测试 (图 5)。最强的活性发现于部分 5 中,但部分 1 在接种后的 2 天也显示出活性。这强有力地表明来自多种化合物的生物活性。

[0397] 部分 1 用氯仿洗脱并且主要含有低极性组分,而部分 5 用甲醇洗脱并且含有高比例的高极性材料。

[0398] 如上制备的样品包含较大量的酸性脂质 (图 4)。因此,采取使用可选的阴离子交换色谱介质 (DEAE- 交联葡聚糖凝胶) 的新的酸性 / 非酸性分离技术,其有效地基本上除去所有酸性脂质 (如图 6 中第 2 道所示)。

[0399] 进行正相色谱法分离,收集更小的亚部分,关注用甲醇洗脱的部分。收集到 11 个部分并且使用 TLC 对其进行分析 (图 6)。组合某些部分 (4-5 和 7-11) 用于在生物分析中

进行测试（图 7）。部分 2 和 4-5 表现出最高的生物活性。

[0400] 制备型 TLC

[0401] 为了进一步纯化活性化合物，采用制备型 TLC，其允许收集相对大量的每一条分离的带。9 条带被从制备型 TLC 板收集并且通过分析型 TLC 进行分析，显示出成功的分离。遗憾的是，部分 3 在旋转蒸发中丢失。

[0402] 8 种部分在生物分析中进行分析（图 9）。部分 4 和 5 表现出最高的活性，随后是部分 2 和 9。显著地，在 TLC 中部分 3 表现出强带，其也以较少量存在于部分 4 和 5 中，尽管没有直接的生物分析数据包括在随后的分析中。

[0403] 运行新的制备型 TLC，使用经优化的在极性区最大程度分离的条件（之前的部分 2-5）。

[0404] 新的分离提供 6 种部分：2、3、4b、5a、5b 和 6（这些部分的编号与之前的分离保持一致）。使用分析型 TLC 对样品进行检验（图 10），其显示组分的分离比在之前的制备型 TLC 中已经达到的分离更好。在部分 3、4b、5a 和 5b 中发现了在生物分析中最强的活性（图 11）。这些部分的生物分析结果与之前的结果高度一致（图 9）。

[0405] 质谱法

[0406] 使用 MALDI-TOF 质谱法 (MS) 分析部分 2、3、4b、5a 和 5b（图 12）。发现了大量令人感兴趣的峰并且被选择用于 MS/MS（碎片）分析（表 2）。

[0407] 表 2. 选择用于 MS/MS 的峰

[0408]

1	部分	2	m/z
3	2	4	444.82
		5	655.94
6	3	7	454.19
8	4b	9	750.66
10	5a	11	393.39
		12	750.67
13	5b	14	692.69
		15	694.72
		16	716.71
		17	531.34

[0409] 选择部分 3 作为这些部分中的第一个用于随后的研究，因为其在 TLC 上和 MS 中表现为最纯的化合物。而且，该部分含有提供生物分析的最低的绝对量的材料（按重量计）

(约是其他部分中 50% 的量),但仍然表现出与部分 4b、5a 和 5b 相同水平的生物活性。

[0410] 部分 3 的 NMR 分析为低分子量化合物提供证据。实际上,在低质量范围内,MS 分析(图 13)显示在 m/z 86.02 和 146.97 的候选物质。因此,推断出部分 3 含有超过 1 种可以导致生物活性的化合物。

[0411] 改进的制备方案

[0412] 对活性化合物的性质的理解使我们为化合物制备方案的改进提供初期的建议。该方案应用于实验室规模(50ml)并且在生物分析中进行测试。该优化的制剂的活性被证实是非常高的。

[0413] 另外的分离

[0414] 在甲醇萃取的样品中的脂肪残留通过生物分析进行测试从而确定该固体部分是否含有活性化合物。针对蚜虫,发现来自 K4B3-MeOH 样品的该固体部分比液体部分更有活性(图 14)。该生物分析也证明在过滤来自巴西安白僵菌 K4B3 的另一个培养物的菌丝之后的活性极小。

[0415] 从 K4B3 菌丝体培养物的氯仿萃取

[0416] 氯仿萃取用于将脂质与其他的部分分离。将 50ml 的生物反应器产生的 K4B3 菌丝体培养物离心从而收集菌丝体,其进行匀浆并且使用 40ml 的 1:2 甲醇:氯仿进行过滤。加入 9ml 的 0.02%CaCl₂ 并混合。当相分离时,移出顶层相并且使氯仿在室温蒸发过夜。使用 1ml 的甲醇使干燥的残留物重新混悬。对蚜虫测定 300 μ l 的该溶液(图 15),表现出有高活性。

[0417] HP20 样品

[0418] 发现 K4B3 菌丝体培养物的培养物滤液的甲醇提取物(HP20 样品)缺乏对抗蚜虫的活性(图 16),但是有对抗小菜蛾的幼虫的活性(图 17)。HP20 样品在 4-5 天的生物分析过程中确实影响叶子,这表明可能存在某些植物毒性成分。

[0419] 结论

[0420] 这些实验表明存在由丝状真菌(例如巴西安白僵菌 K4B3)产生的多种活性杀虫脂质。使用本发明所提供的制备方法已经产生了具有改善的生物活性(包括改善的杀虫活性)的脂质部分。

[0421] 实施例 3 - 昆虫控制的生物分析

[0422] 该实施例描述了扩大范围的生物分析的建立,从而确定各种脂质或脂质部分的杀虫效力。

[0423] 使用标准 1) 有效性、2) 敏感性和 3) 易用性建立和评价若干目标昆虫分析。4 种昆虫系统被测试:粉虱、小菜蛾、粉虫和蚊子。

[0424] 1. 粉虱若虫(半翅目)

[0425] 粉虱是主要的目标物种,目前缺乏合适的控制剂。从 Bioforce Ltd(Auckland, 新西兰)获得粉虱若虫。使用 K4B3 脂质部分的样品和对照液体接种从而通过 Potter 塔接种约 100 只若虫的组。

[0426] 2. 粉虫(黄粉虫甲)幼虫(鞘翅目)

[0427] 从生物供应商获得拟步行虫属幼虫。10 只幼虫用 K4B3 脂质样品或水对照进行喷雾并且监测 2 周。

[0428] 3. 小菜蛾 -DBM(*Plutella xylostella*) 幼虫 (鳞翅目)

[0429] 小菜蛾是世界范围内芸苔作物的主要害虫并且是已经变得对大多数控制化合物有耐药性。从林肯大学得到培养物用于 K4B3 脂质样品测试。

[0430] 标准方法使用迷你版的 Potter 塔。改进手持 A320 喷枪从而采用微体积使脂质样品或对照溶液雾化。幼虫保持在使用 0.05% 吐温 80 的水琼脂板 (水 +1% 琼脂) 表面上的小的卷心菜叶上。在每一个实验中使用全部大小的 5-20 个幼虫 (从第 1 天至蛹前)。在 1 项测试中,也将幼虫浸入溶液滴中。进行液滴饲喂用于测定毒性是局部的还是摄食的。

[0431] 将 38 只第 2 至第 6 龄的幼虫接种到 K4B3 脂质部分中,在对照中接种 19 只。在接种后,幼虫保持在 20°C 在 16hL:8hD 中。

[0432] 4. 蚊子幼虫

[0433] 进行生物分析,其中将各种量的 K4B3 脂质部分加到约 12.5ml 的含有库蚊 (*Culex perviligans*) 幼虫的水的瓶中。幼虫接近蛹化并且在实验期间某些可能化蛹。

[0434] 实施例 4 - 在哺乳动物模型中巴西安白僵菌 K4B3 脂质的毒性

[0435] 介绍

[0436] 该实施例描述了在哺乳动物模型中 K4B3 脂质的毒性的评估。

[0437] 方法

[0438] 如在实施例 2 中所述分离出 K4B3 脂质部分。

[0439] 根据 OECD 准则 425 (急性口服毒性 - 反复程序) 在小鼠中进行试验。由于预计该材料不是高毒性的,所以选择通过口腔插管法使用 2,000mg/kg 的单一剂量水平的限度试验。除了在特殊的情况下,该剂量是由 OECD 推荐用于评价急性毒性的最高剂量。

[0440] 通过口腔插管法向 5 只雌性瑞士小鼠给予单一 2,000mg/kg 剂量的 K4B3 脂质,如下所述。

[0441] 试验条件

[0442] 在约 4pm 从小鼠之一收回食物并且测量其体重。第二天早上,再对小鼠称重并且计算提供 2,000mg/kg 的剂量所需的 K4B3 脂质的重量。该量进行称重,并且用 150 μ l 水稀释。通过管饲法向小鼠给予全体积。

[0443] 在给药后,使小鼠立即接近食物。在给药后认真观察 60 分钟,然后在给药当天和随后的天中以若干间隔进行观察,如 OECD 化学品检验准则,修订稿准则 425,2000 年 10 月中所说明的。第二只小鼠在第一只之后 48 小时以 2,000mg/kg 体重再给予 K4B4 多肽。第三、第四和第五只小鼠随后以 48 小时的间隔全部以 2,000mg/kg 给药。

[0444] 小鼠单独饲养,水和食物自由进食 (除了在给药前的过夜禁食)。每天观察小鼠并且在给药后 2 周测量体重。在给药后 1 天、1 周和 2 周记录体重,随后通过二氧化碳吸入杀死动物并且接受死后检查。

[0445] 结果

[0446] 结果显示在 K4B3 复合物给药后没有毒性作用,在整个观察期间小鼠保持健康,在给药后短时间喂食,并且在给药日和整个实验期间行为正常,该结果表明没有毒性。

[0447] 体重。结果显示在整个实验期间以各种时间间隔小鼠的平均体重没有改变,例如下表 3 中所示的,该结果表明没有毒性。

[0448] 表 3. 接受 K4B3 脂质的小鼠的体重

[0449]

	食物撤回前 体重 (g)	给药时体 重 (g)	给药后 1 天 体重 (g)	给药后 7 天 体重 (g)	给药后 14 天 体重 (g)
平均值	25.0	22.6	24.4	25.3	25.4
小鼠 1	25.4	23.1	25.6	26.5	25.6
2	25.5	23.2	24.4	25.8	27.7
3	27.1	24.1	25.3	25.6	26.1
4	23.0	20.8	22.7	23.8	23.1
5	24.0	21.6	24.0	24.6	24.7

[0450]

[0451] 在过夜禁食之后,小鼠通常丧失平均 2.4 克的体重。在有些情况中给药后在进食之后第二天该体重丧失大幅地恢复,和在有些情况中在给药之后在整个 2 周观察期间小鼠保持其体重,表明没有毒性。

[0452] 死后发现。结果显示在尸体解剖中小鼠体内没有发现异常,并且例如下表 4 中所示的结果表明小鼠的肝、肾、脾、心脏、肺和肠(幽门至肛门)的重量在其正常范围内,结果表明没有毒性。

[0453] 表 4. 接受 K4B3 脂质的小鼠的相关器官重量

[0454]

	相关器官重量(g/100g 体重)					
	肝	肾	脾	心脏	肺	肠
平均值	5.17	1.39	0.50	0.548	0.874	10.49
小鼠 1	4.96	1.35	0.50	0.512	0.836	10.17
2	5.83	1.43	0.690	0.534	0.903	10.77
3	5.55	1.33	0.475	0.498	0.858	9.79
4	4.73	1.39	0.394	0.589	0.931	10.93
5	4.79	1.43	0.441	0.607	0.842	10.79

[0455] 讨论

[0456] 结果显示 K4B3 多肽以 2,000mg/kg 的剂量向小鼠的口服给药没有引起可辨别的副作用,其中没有死亡发生,解剖中未发现异常,器官重量在正常范围内,小鼠行为完全正常,

结果表明低急性毒性。

[0457] 这些结果表明 K4B3 脂质表现出低急性口服毒性,其具有高于 2,000mg/kg 体重的 LD₅₀。该结果表明 K4B3 脂质将被分入新西兰危险物质和新生物体 (HSNO) 法案 1996 中的最低级危险类别。

[0458] 实施例 5 - 来自真菌的总脂质对蚜虫和小菜蛾的毒性的评估

[0459] 介绍

[0460] 该实施例描述了来自多种丝状真菌的脂质对蚜虫和小菜蛾的毒性的评估。

[0461] 方法

[0462] 4 种真菌用于制备脂质提取物:

[0463] 1. 巴西安白僵菌菌株 AM2。

[0464] 2. 巴西安白僵菌菌株 F480。

[0465] 3. 木霉菌属分离群 1328。

[0466] 4. 绿僵菌物种。

[0467] 全部真菌在室温在 100ml 的 PDB 中、以 140-160rpm 振荡生长~3 天。50ml 的真菌培养物以 3000rpm 离心 10 分钟。丢弃上层清液并且将沉淀的菌丝体加入到 20ml 的 1:2 甲醇:氯仿中。菌丝体用手摇匀,然后用 Whatman1 号滤纸过滤。另外的 20ml 的 1:2 甲醇:氯仿用于洗涤过滤器。加入 9ml 的 0.02%CaCl₂ 并且混合物静置分离 2 小时或更多。丢弃顶层并且氯仿/脂质溶液进行蒸发过夜。一旦干燥,用 1ml 的 100% 甲醇使脂质重新混悬。

[0468] 也使用如上所述制备的来自巴西安白僵菌菌株 K4B3 的液体提取物 (50ml)。

[0469] 使用在恒温室中在卷心菜植物上培养的烟蚜(桃蚜)或小菜蛾幼虫。使用混合虫龄的蚜虫,通常 30-50 只/Petri 皿。使用 3-5th 龄虫的 DBM 幼虫。

[0470] 为了用提取物接种蚜虫或幼虫,将昆虫转移至在 1% 水琼脂板的表面上的卷心菜叶上,使用 0.05% 吐温 80 作为叶和琼脂之间的润湿剂。

[0471] 对手持 Paasche 喷枪进行改进从而采用微体积并且用于雾化 300 μ l 的试验或对照溶液。随后,具有处理的蚜虫的板维持在 20°C、12h 光照:12h 黑暗并且每日检查。移除死去的。在喷雾后直接计数接种的蚜虫从而避免在死亡率 % 中包括新生的蚜虫,但是不去努力移除在孵育期间的新生若虫。

[0472] 结果

[0473] 通常,50ml 的白僵菌属和绿僵菌培养物产生约 3ml 当量的湿的菌丝。50ml 的木霉培养物产生 15ml 湿的菌丝当量。

[0474] 从巴西安白僵菌菌株 AM2、F480 和 K4B3 提取的总脂质的生物分析显示这些脂质具有极其有效的杀虫活性。如在图 18 中所能够看到的,施用来自每一种菌株的总脂质在仅仅 21 个小时后导致几乎 100% 死亡率。类似地,来自巴西安白僵菌菌株 K4B3 的脂质部分 4 和 5 在目标蚜虫中诱发 100% 死亡率。

[0475] 来自其他的丝状真菌的总脂质也观察到这些结果。与来自巴西安白僵菌的脂质类似,来自木霉和绿僵菌的脂质显示出有效的杀虫活性。如图 19 中所示,在仅仅 21 个小时之后观察到在暴露于来自木霉和巴西安白僵菌菌株 K4B3 的脂质的蚜虫中接近 100% 死亡率,在同一时间点观察到在暴露于来自绿僵菌的脂质的蚜虫中几乎 50% 死亡率。通过甲醇阴性对照建立基准死亡率。

[0476] 该生物分析持续总共 3 天,并且桃蚜中的累积死亡率 % 在图 20 中显示。该数据表明这些脂质所表现出的杀虫活性起效迅速,在更长的时间框架内有某些另外的杀死。

[0477] 来自巴西安白僵菌菌株 K4B3(白僵菌属)、木霉和绿僵菌的各种脂质部分对抗小菜蛾幼虫的生物分析表明这些脂质中的某些尽管比对抗蚜虫的有效性差、但仍表现出一些对抗蛾幼虫的杀虫活性。如图 21 中所示,使用来自巴西安白僵菌菌株 K4B3 和绿僵菌的脂质在 4 至 5 天时观察到超过 30% 的累积死亡率。

[0478] 图 22 显示出在来自如本文实施例 5 中所述的巴西安白僵菌菌株 K4B3 和木霉的各种脂质部分的生物分析中,在 21 小时(在 20℃)桃蚜的死亡率 %。所测试的部分包括甲醇(-MeOH)提取的和氯仿(-氯仿)提取的部分,用甲醇和水作为阴性对照。

[0479] 来自木霉的和来自巴西安白僵菌的各种脂质部分对抗蚜虫的生物分析表明氯仿-和甲醇-提取的脂质部分具有有效的杀虫活性。如图 22 中所示,在仅仅 21 个小时暴露之后,在暴露于来自木霉和巴西安白僵菌菌株 K4B3 的氯仿-和甲醇-提取的脂质的蚜虫中观察到接近 100% 死亡率。FS-MeOH 和 Beaublast-MeOH 是来自 K4B3 产物的不同提取物。

[0480] 讨论

[0481] 该实施例表明已经从一定范围的丝状真菌制备了杀虫脂质,并且这些脂质的产生不限于巴西安白僵菌 K4B3 菌株。提取的脂质具有有效的杀虫活性,常常在 24 小时暴露之内杀死接近 100% 的目标昆虫。

[0482] 工业应用

[0483] 根据以上所述可知,本发明提供用于控制昆虫(例如致植物病的昆虫)的来自丝状真菌的杀虫脂质或脂质部分、以及包含所述的脂质或脂质部分的组合物。也提供这些脂质或脂质部分在控制昆虫(例如致植物病的昆虫)的方法中的应用。本发明的脂质或脂质部分以及组合物在大范围的农业和园艺应用中具有实用性。

[0484] 出版物

[0485] Anis, A. I. M. ;Brennan, P. 1982 Susceptibility of different populations of glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*, Westwood to a range of chemical insecticides. Faculty of General Agriculture University College of Dublin, Research report 1980-1981 :55.

[0486] Elhag, E. A. ;Horn, D. J. 1983 Resistance of greenhouse whitefly (Homoptera : Aleyrodidae) to insecticides in selected Ohio greenhouses. Journal of Economic Entomology 76 :945-948.

[0487] Georghiou, G. P. 1981 The occurrence of resistance to pesticides in arthropods, an index of cases reported through 1980. FAO of UN, Rome 1981. 172p.

[0488] Gorman, K. ;Devine, G. J. ;Denholm, I. 2000 Status of pesticide resistance in UK populations of glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, and the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. The BCPC Conference :Pests and diseases :1 :459-464

[0489] Grossman, J. 1994 Onion thrips. IPM Practitioner. 16(4) :12-13

[0490] Hommes, M. 1986 Insecticide resistance in greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*, Westw.) to synthetic pyrethroids.

Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft
232 :376.

[0491] OECD1998 :Guidelines for the Testing of Chemicals. www.oecd.org

[0492] Wardlow, L. R. 1985 Pyrethroid resistance in glasshouse
whitefly(*Trialeurodes vaporariorum*, Westw.).

[0493] Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit,
Gent50 (2b) :164-165.

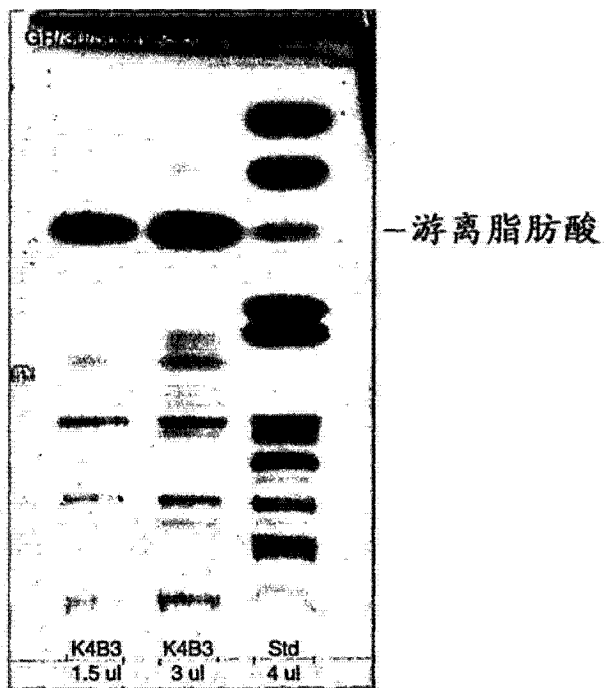


图 1

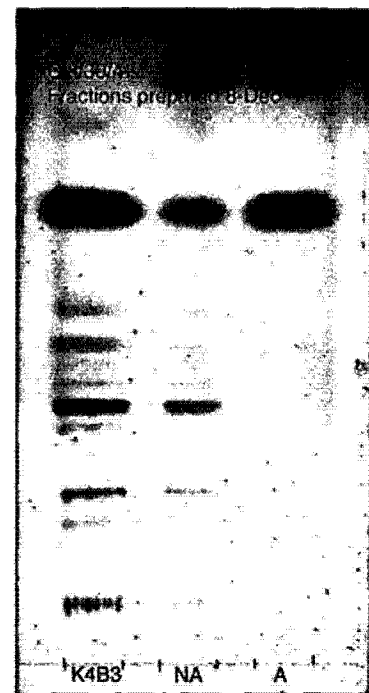


图 2

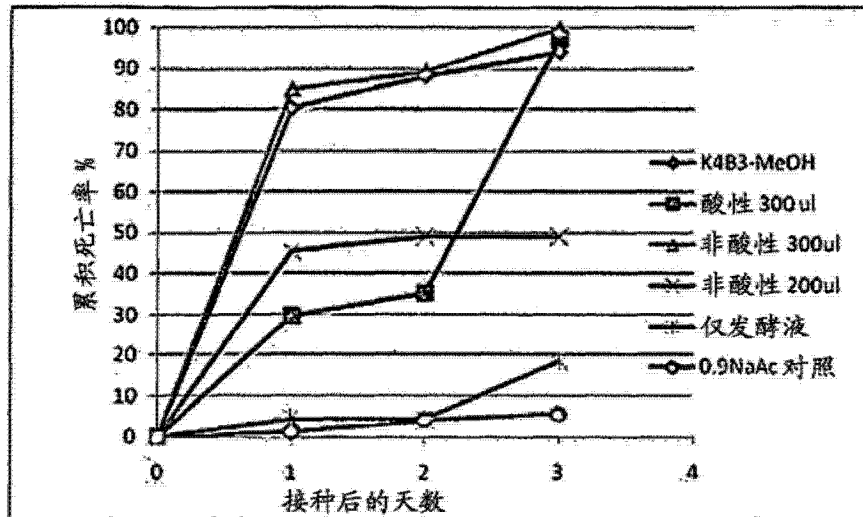


图 3

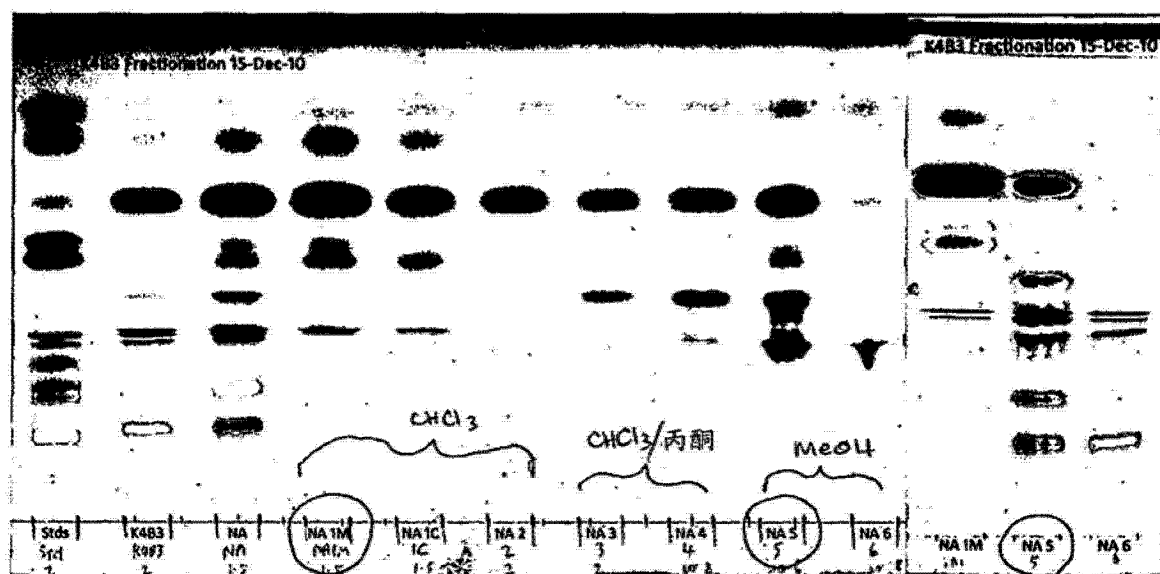


图 4

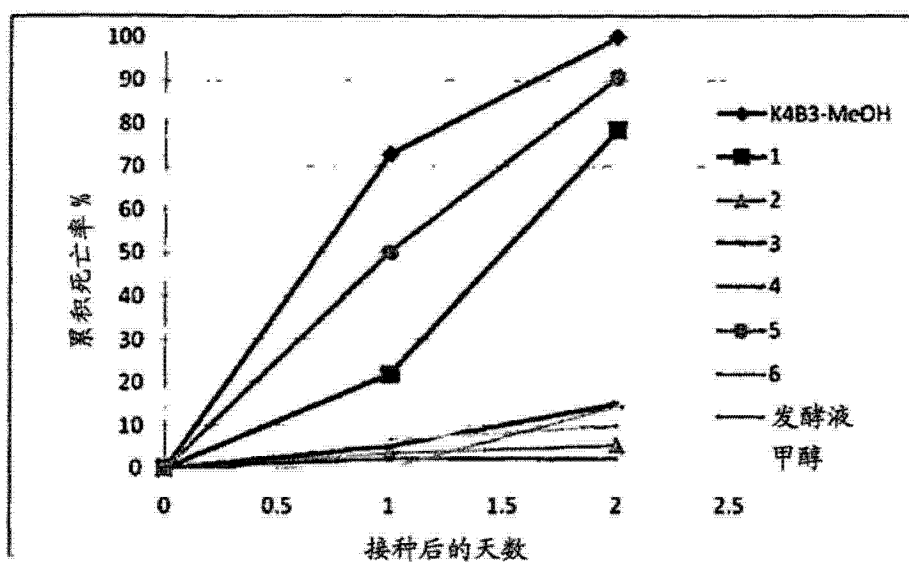


图 5

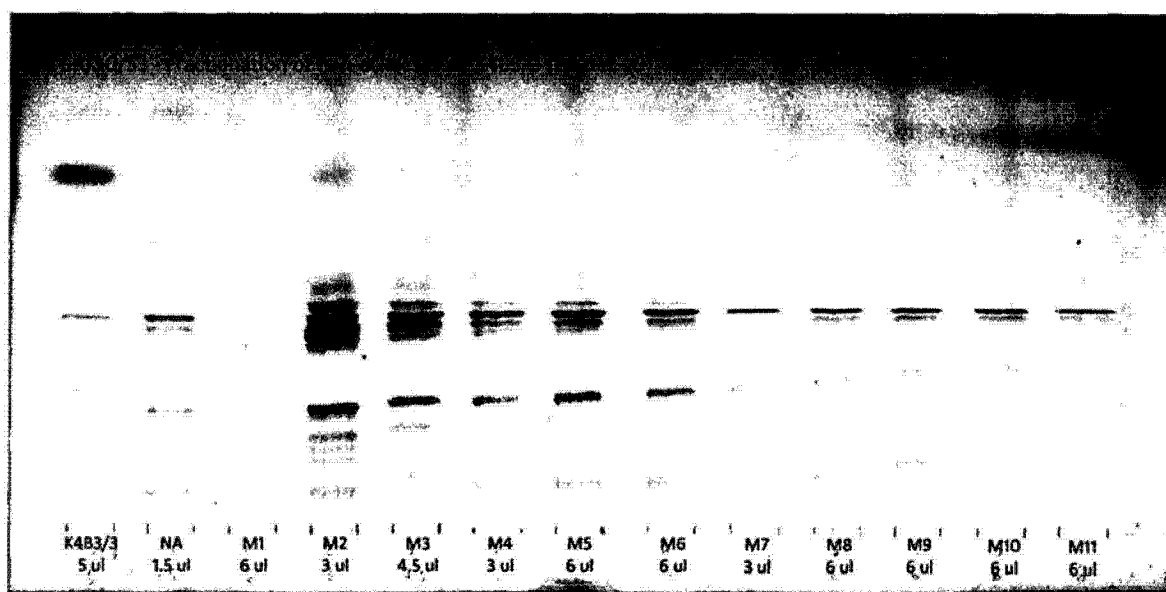


图 6

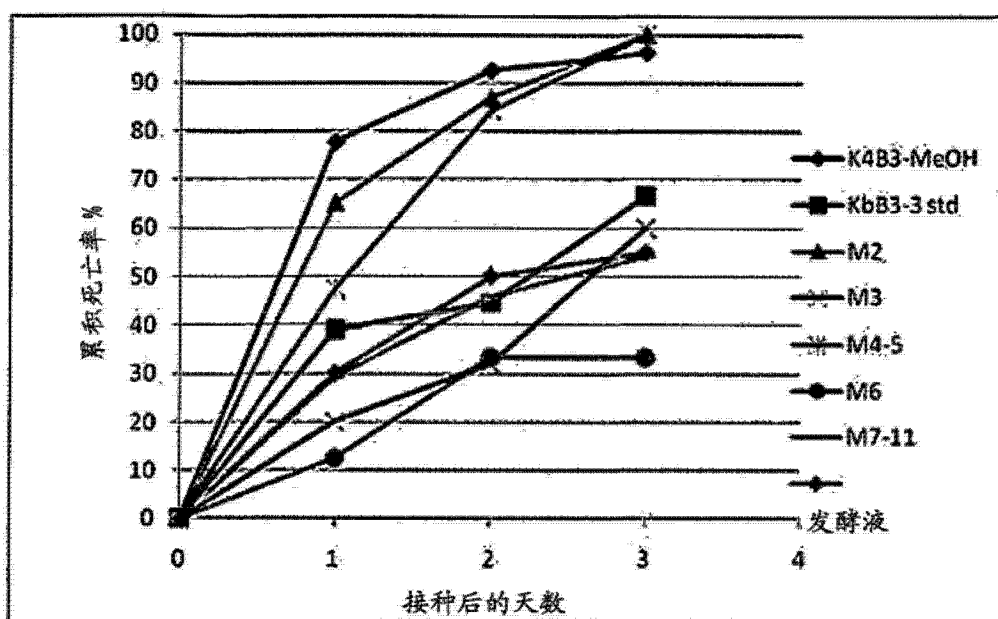


图 7

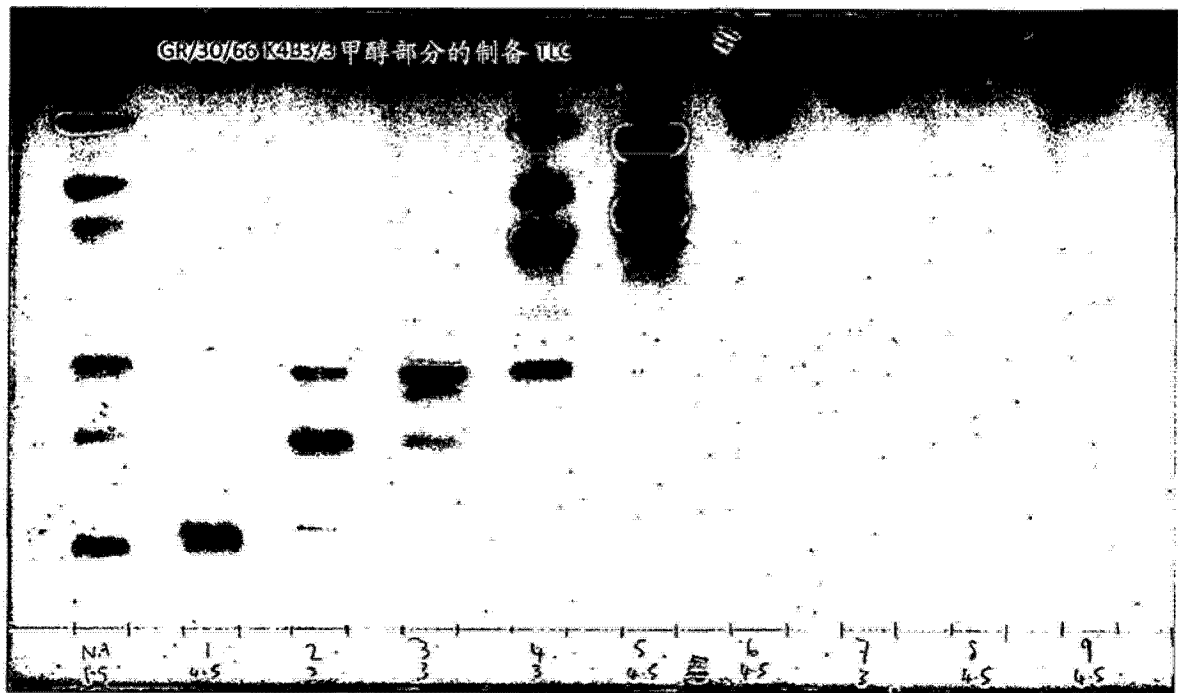


图 8

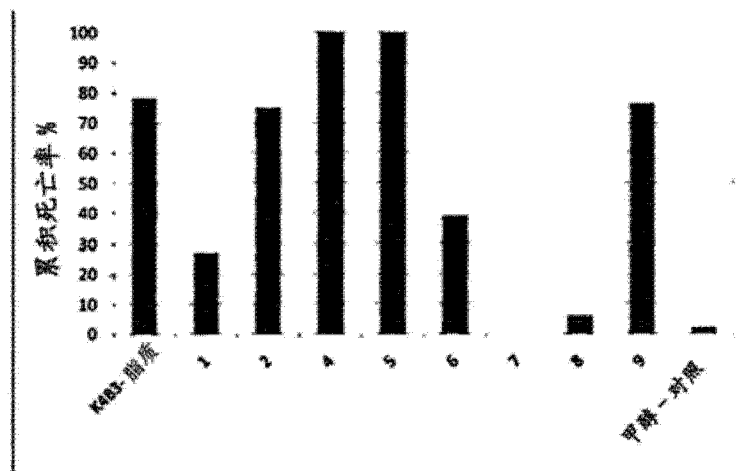


图 9

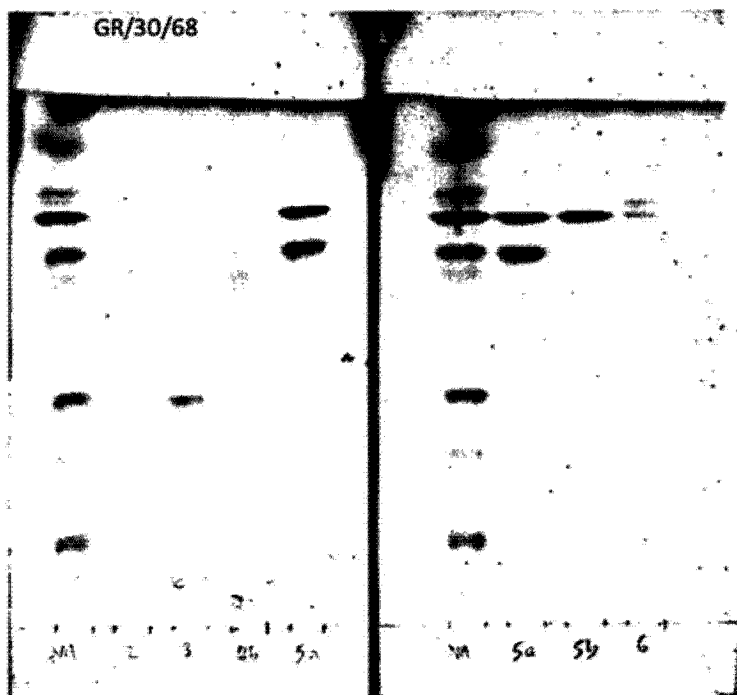


图 10

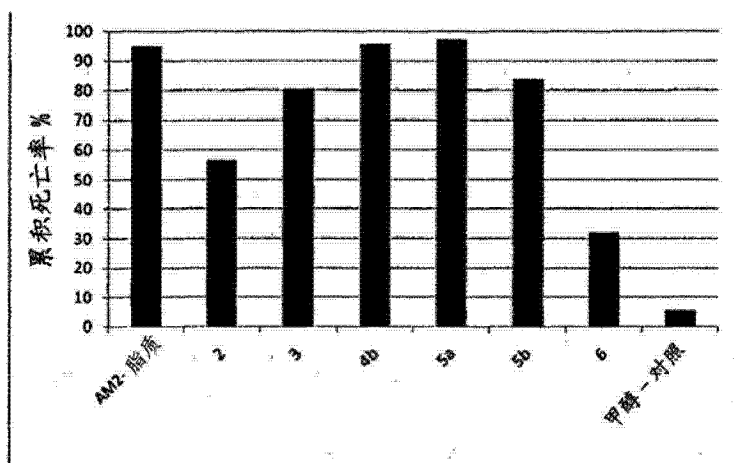


图 11

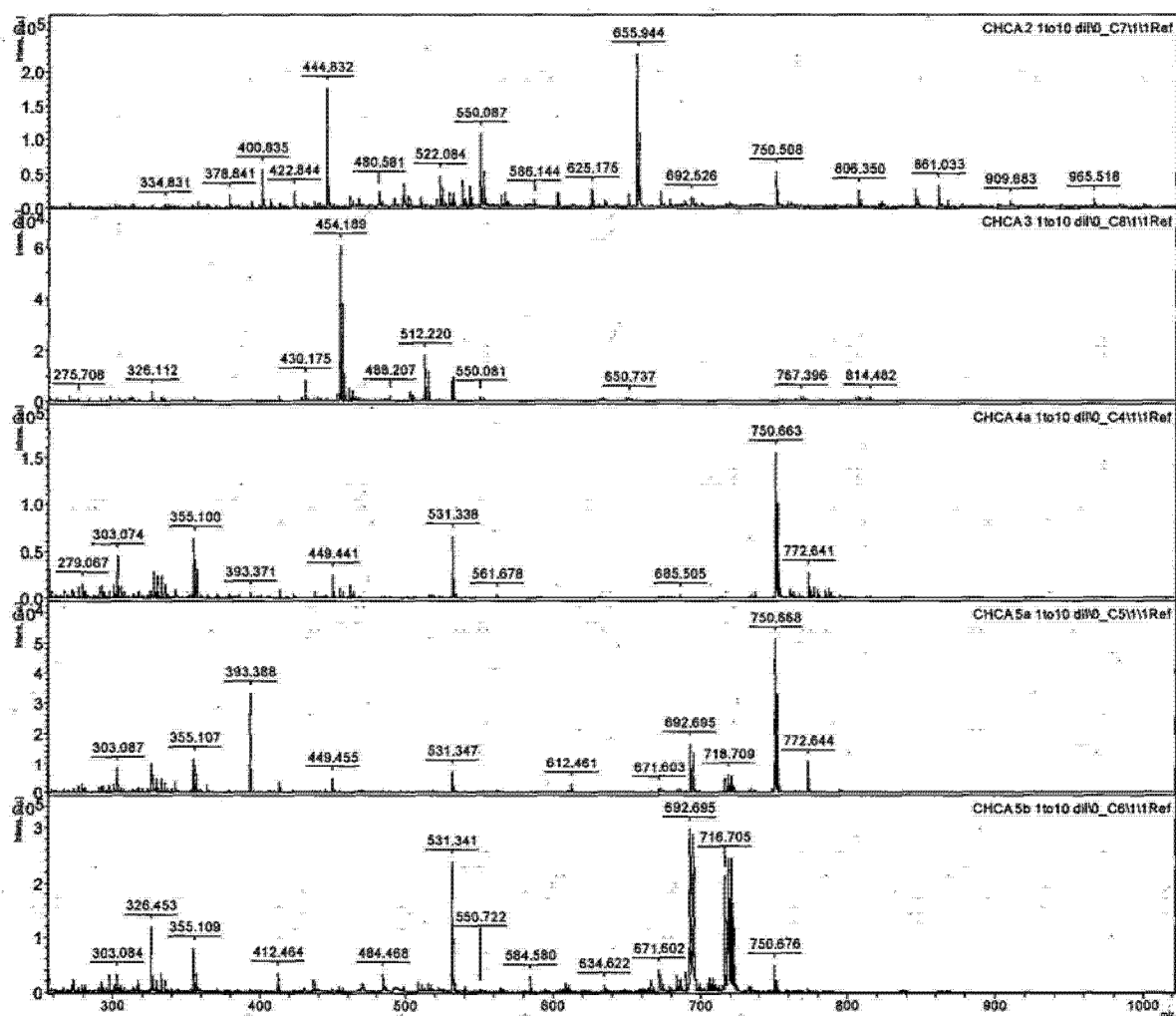


图 12

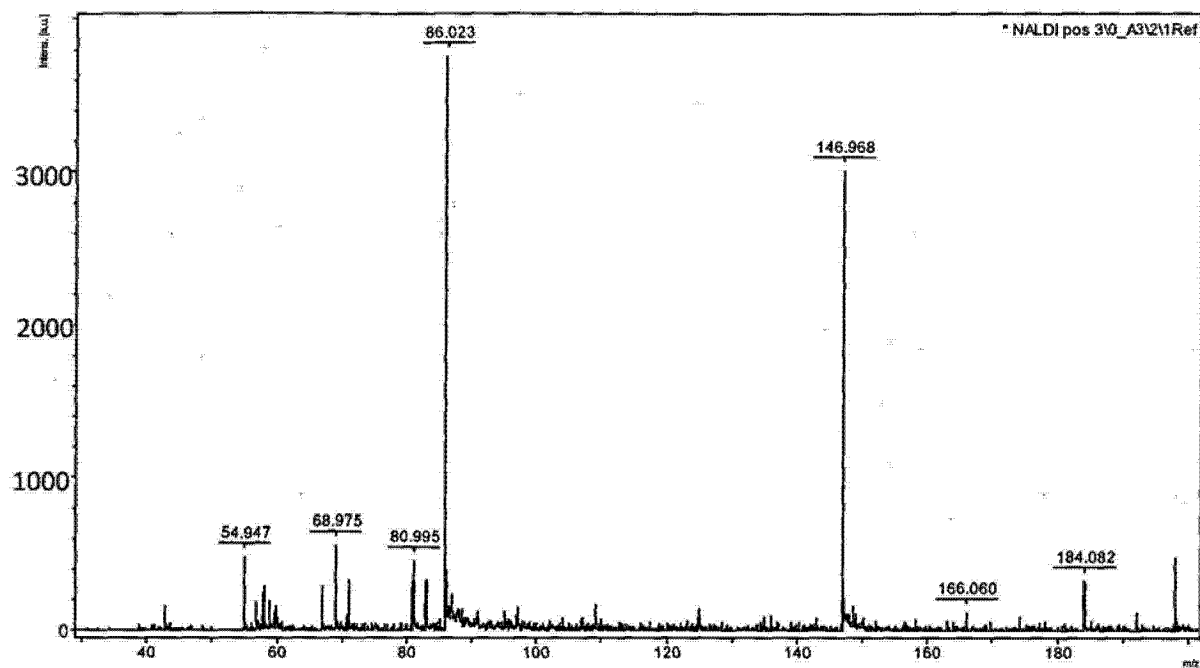


图 13

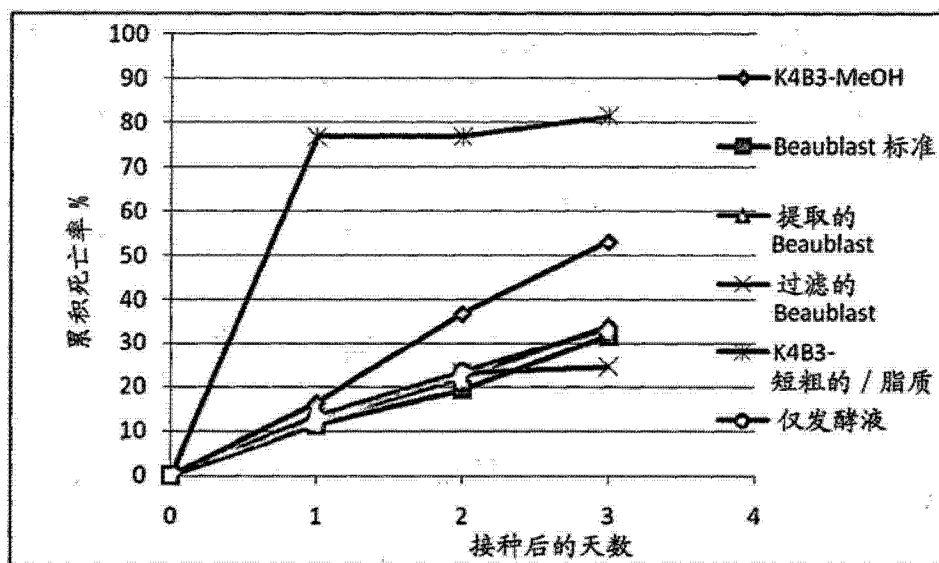


图 14

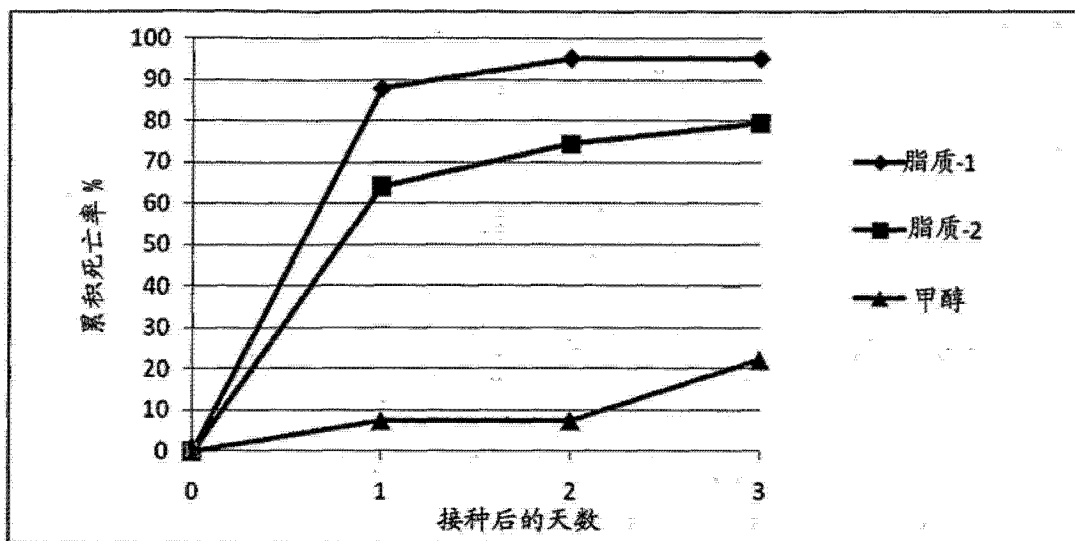


图 15

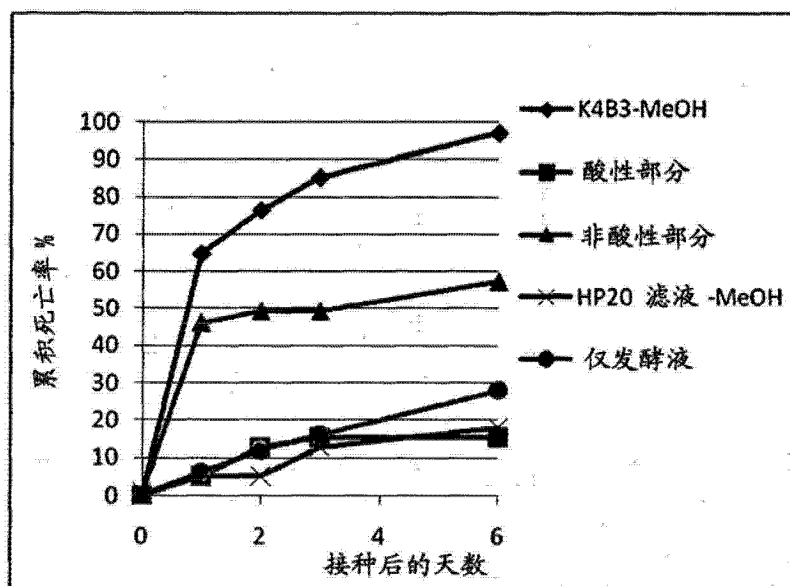


图 16

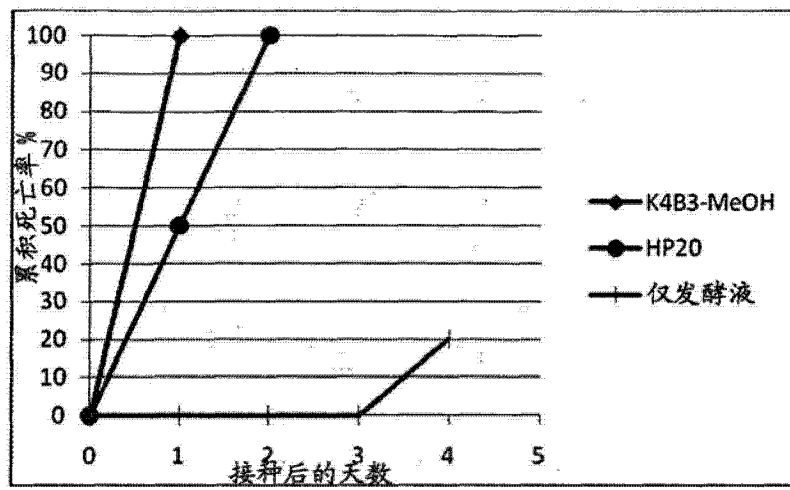


图 17

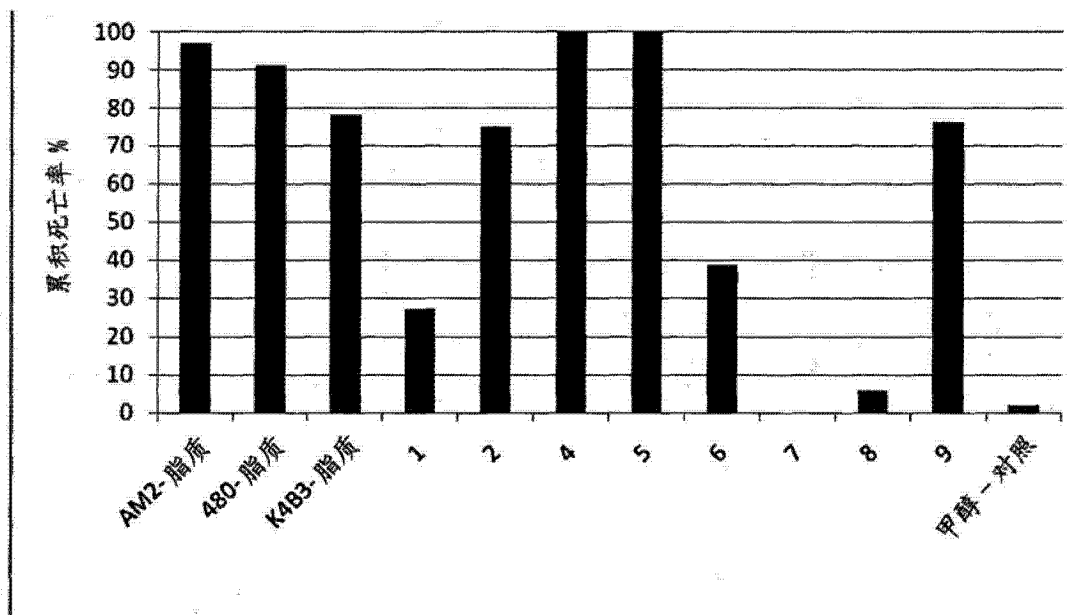


图 18

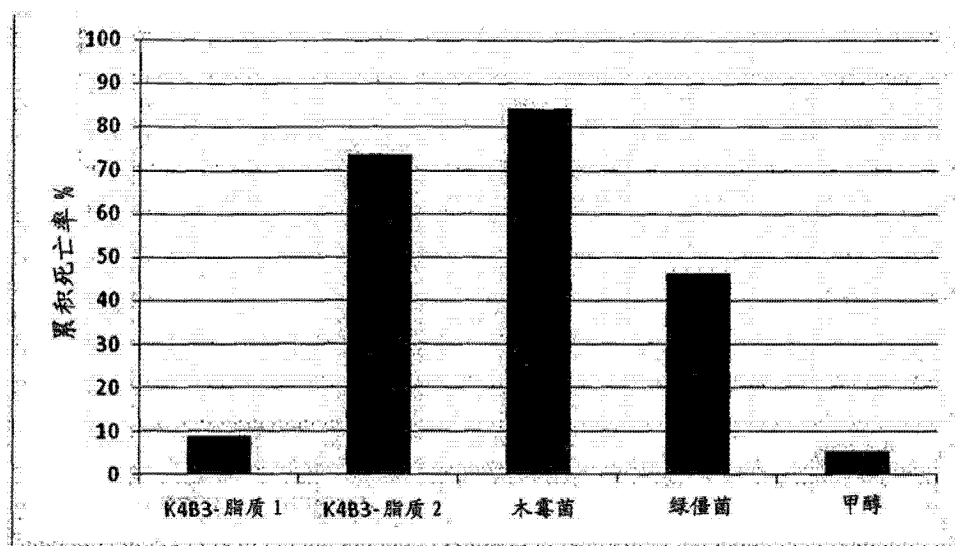


图 19

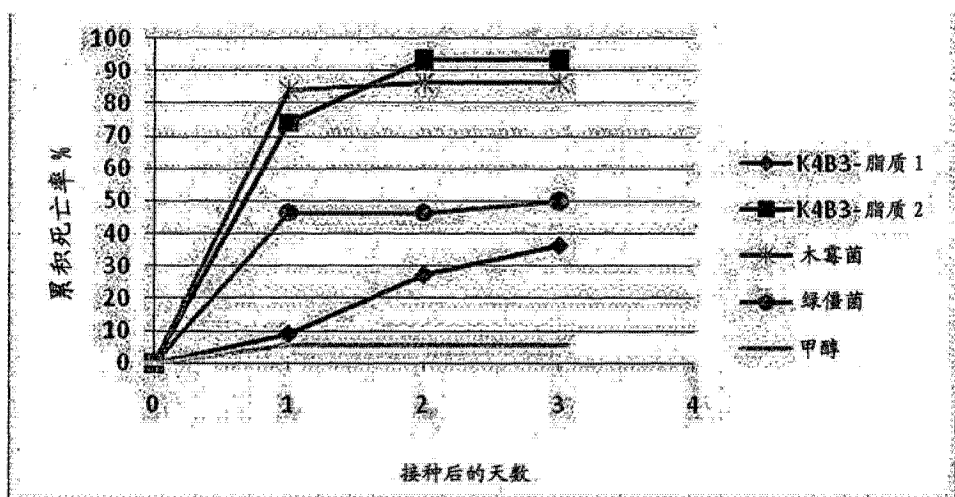


图 20

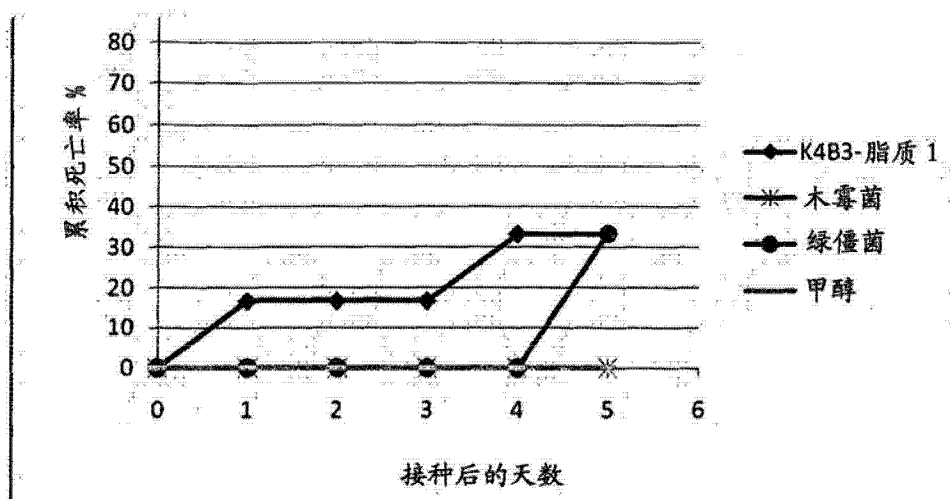


图 21

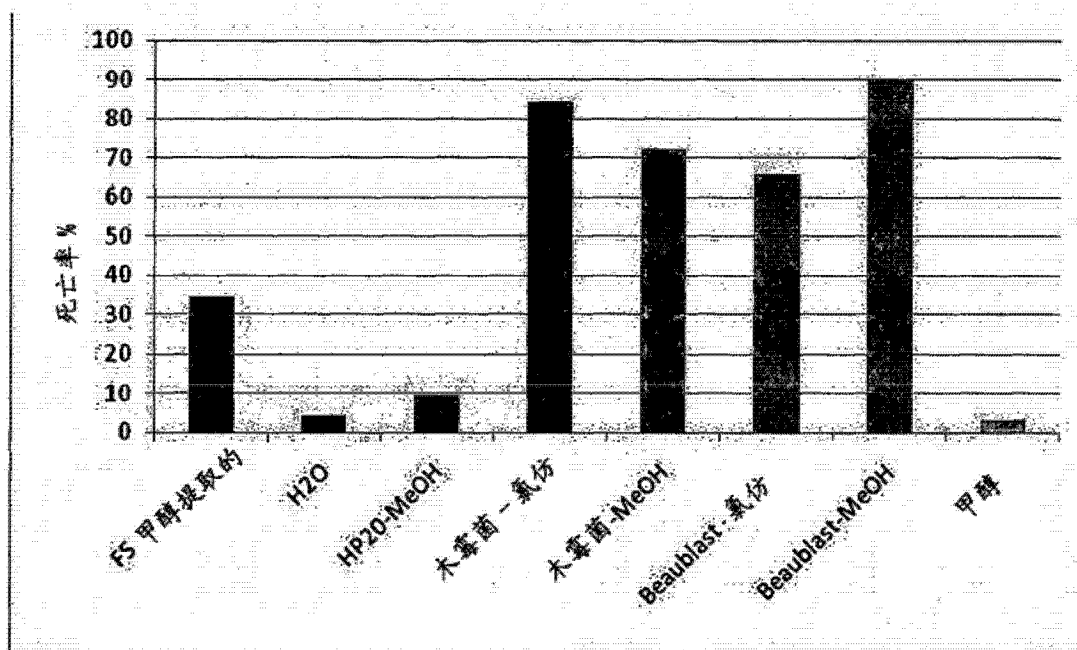


图 22