



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108271342 B

(45) 授权公告日 2021. 12. 07

(21) 申请号 201680045456.7
 (22) 申请日 2016.06.10
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 108271342 A
 (43) 申请公布日 2018.07.10
 (30) 优先权数据
 62/173,789 2015.06.10 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2018.02.01
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2016/036968 2016.06.10
 (87) PCT国际申请的公布数据
 WO2016/201284 EN 2016.12.15
 (83) 生物保藏信息
 NRRL B-50930 2014.03.12
 NRRL B-50931 2014.03.12
 NRRL B-50933 2014.03.12
 NRRL B-50940 2014.03.12
 NRRL B-50941 2014.03.12
 (73) 专利权人 新叶共生有限公司
 地址 美国密苏里州
 (72) 发明人 蕾妮·里乌

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
 有限责任公司 11204
 代理人 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.
 A01N 63/20 (2020.01)
 C12N 11/02 (2006.01)
 A01N 63/60 (2020.01)
 C12N 1/20 (2006.01)
 A01P 3/00 (2006.01)

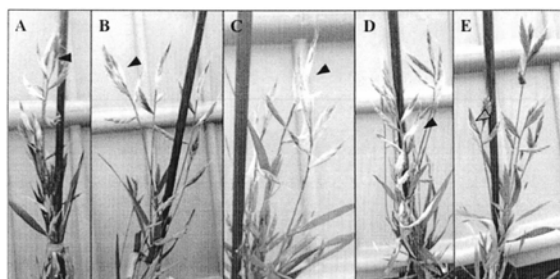
(56) 对比文件
 CN 104508118 A, 2015.04.08
 CN 104603260 A, 2015.05.06
 US 6133196 A, 2000.10.17
 CA 2183275 C, 2000.02.01
 WO 2015085117 A1, 2015.06.11
 US 2008148432 A1, 2008.06.19
 R. Poorniammal et.al..In Vitro
 Biocontrol Activity of Methylobacterium
 Exorquens Against Fungal Pathogens.
 《International Journal of Plant
 Protection》.2009,第2卷(第1期),第59-62页.

审查员 刘庆虎

权利要求书2页 说明书45页 附图3页

(54) 发明名称
 抗真菌甲基杆菌组合物及使用方法

(57) 摘要
 提供了包含具有抗真菌活性的甲基杆菌
 (Methylobacterium) 的组合物,控制植物致病真
 菌的方法,以及制备所述组合物的方法。



1. 阻抑由植物致病真菌引起的病害的方法,其中所述方法包括向植物或植物部分施用一定量的包含甲基杆菌(*Methylobacterium*)菌株的组合物,相对于未施用所述组合物的对照植物、对照植物部分或由所述对照植物部分长出的对照植物的病害的发病率和/或严重性,所述量提供所述植物、植物部分或由所述植物部分长出的植物中所述植物致病真菌引起的病害的发病率和/或严重性的降低,所述甲基杆菌菌株选自(i) NLS0089 (NRRL B-50933)和(ii)由甲基杆菌菌株NLS0089获得的遗传转化菌株,其中所述植物致病真菌是镰刀菌属(*Fusarium*)物种、丝核菌属(*Rhizoctonia*)物种、核盘菌属(*Sclerotinia*)物种或壳针孢属(*Septoria*)物种。

2. 如权利要求1所述的方法,其中相对于所述对照植物、所述对照植物部分或由所述对照植物部分长出的对照植物的感染,施用所述组合物在所述植物、植物部分或由所述植物部分长出的植物中提供植物致病真菌感染40%、50%、75%、85%或95%的抑制。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述植物部分选自:叶、茎、花、根、块茎和种子。

4. 如权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括下述步骤:从所述植物、植物部分或由所述植物部分长出的植物收获选自叶、茎、花、根、块茎或种子中的至少一种植物部分。

5. 如权利要求1所述的方法,其中相对于所述对照植物、所述对照植物部分或由所述对照植物部分长出的对照植物,所述植物、植物部分或由所述植物部分长出的植物中的真菌毒素水平降低50%、75%、85%或95%。

6. 如权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括从所述植物、植物部分或由所述植物部分长出的植物获得经加工的食品或饲料组合物。

7. 如权利要求6所述的方法,其中相对于获自所述对照植物、所述对照植物部分或由所述对照植物部分长出的对照植物的经加工的食品或饲料组合物,从所述植物、植物部分或由所述植物部分长出的植物获得的经加工的食品或饲料组合物中真菌毒素的水平降低50%、75%、85%或95%。

8. 如权利要求3所述的方法,其中所述植物或植物部分是谷类植物或植物部分。

9. 如权利要求1所述的方法,其中所述植物或植物部分选自下述植物或其植物部分:水稻、大豆、花生、番茄、小麦、玉米、大麦、粟、高粱、燕麦以及黑麦。

10. 如权利要求1所述的方法,其中所述组合物还包含选自以下的其他活性剂:杀昆虫剂、杀真菌剂、杀线虫剂、生物杀虫剂和有益微生物。

11. 如权利要求10所述的方法,其中所述组合物还包含选自以下的其他活性剂:甲霜灵、种菌唑和吡虫啉。

12. 如权利要求10所述的方法,其中所述物杀虫剂或有益微生物为芽孢杆菌属物种、假单胞菌属物种、盾壳霉属物种、泛菌属物种、链霉菌属物种或木霉属物种。

13. 如权利要求4所述的方法,其中所述植物部分是种子,并且其中将 1.0×10^3 、 1.0×10^4 、 1.0×10^5 至 1.0×10^7 、 1.0×10^8 、 1.0×10^9 或 1.0×10^{10} CFU的所述甲基杆菌施用于所述种子。

14. 如权利要求1所述的方法,其中所述组合物是含有5%或更低的含水量的基本上干燥的产品。

15. 如权利要求1所述的方法,其中所述组合物的滴度为至少 5×10^7 个克隆形成单位/克或至少 5×10^7 个克隆形成单位/毫升。

16. 如权利要求1所述的方法,其中通过作为喷洒或作为种子处理施用所述甲基杆菌来

处理所述植物。

17. 如权利要求1所述的方法,其中所述植物或植物部分由所述组合物至少部分涂布。

18. 如权利要求1所述的方法,其中所述植物或植物部分选自芸苔、苜蓿、向日葵、红花、烟草、马铃薯、棉花、番薯、木薯、咖啡、椰子、菠萝、柑橘树、可可、茶、香蕉、鳄梨、无花果、番石榴、芒果、橄榄、木瓜、腰果、夏威夷果、扁桃、甜菜、甘蔗、莴苣、绿豆、利马豆、豌豆、葫芦、观赏植物、针叶树和草坪用草植物或植物部分。

19. 如权利要求1所述的方法,其中所述植物是玉米、小麦或大豆植物。

20. 如权利要求19所述的方法,其中所述病害由禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*)、核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、大豆褐纹壳针孢 (*Septoria glycines*) 或立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 引起。

21. 如权利要求1所述的方法,其中所述病害是赤霉病、猝倒病、白霉病或褐斑病。

22. 如权利要求1-21中任一项所述的方法,其中所述组合物还包含甲基杆菌 (*Methylobacterium*) 菌株NLS0020 (NRRL B-50930) 或NLS0017 (NRRL B-50931) 或由NLS0017或NLS0020获得的遗传转化菌株。

抗真菌甲基杆菌组合物及使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本国际专利申请要求于2015年6月10日提交的美国临时专利申请第62/173,789号的权益,将所述申请通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表声明

[0004] 通过USPTO的EFS系统同时提供序列表,其包含于2016年6月10日创建的命名为53907_153532_SL.txt(14,824,692个字节,在**MS-Windows®**中确定)的文件,所述序列表包含9,188条序列,并将其通过引用整体并入本文。

[0005] 发明背景

[0006] 诸如甲烷和甲醇的一碳有机化合物在自然界中广泛存在,并且被归类为甲烷氧化菌和甲基营养菌的细菌用作碳源。甲烷氧化细菌包括下述属中的物种:甲基细菌属(Methylobacter)、甲基单胞菌属(Methylomonas)、甲基微菌属(Methylomicrobium)、甲基球菌属(Methylococcus)、甲基弯曲菌属(Methylosinus)、甲基孢囊菌属(Methylocystis)、甲基球形菌属(Methylosphaera)、甲基暖菌属(Methylorhizidium)以及甲基细胞菌属(Methylocella)(Lidstrom,2006)。甲烷氧化菌具有甲烷单加氧酶,其将来自O₂的氧原子掺入甲烷中,形成甲醇。所有甲烷氧化菌均为专性一碳利用者,其不能利用包含碳-碳键的化合物。另一方面,甲基营养菌还可以利用更复杂的有机化合物,如有机酸、高级醇、糖等。因此,甲基营养细菌是兼性甲基营养菌。甲基营养细菌包括下述属中的物种:甲基杆菌属(Methylobacter)、生丝微菌属(Hyphomicrobium)、嗜甲基菌属(Methylophilus)、甲基芽孢杆菌属(Methylobacillus)、噬甲基菌属(Methylophaga)、氨基杆菌属(Aminobacter)、耗甲基杆菌属(Methylorhabdus)、甲基球形菌属(Methylopila)、甲基磺酰菌属(Methylosulfonomonas)、马氏磺酰菌属(Marinosulfonomonas)、副球菌属(Paracoccus)、黄色杆菌属(Xanthobacter)、弯杆菌属(Ancylobacter)(也被称为微环菌属(Microcyclus))、硫杆菌属(Thiobacillus)、红假单胞菌属(Rhodopseudomonas)、红细菌属(Rhodobacter)、醋杆菌属(Acetobacter)、芽孢杆菌属(Bacillus)、分支杆菌属(Mycobacterium)、节杆菌属(Arthobacter)以及诺卡菌属(Nocardia)(Lidstrom,2006)。

[0007] 甲基杆菌属的大部分甲基营养细菌均为粉红色。它们通常被称为PPFM细菌,是粉红色兼性甲基营养菌。Green(2005,2006)鉴定了十二种经验证的甲基杆菌属物种,具体为:噬胺甲基杆菌(M.aminovorans)、氯甲烷甲基杆菌(M.chloromethanicum)、二氯甲烷甲基杆菌(M.dichloromethanicum)、扭脱甲基杆菌(M.extorquens)、藤泽氏甲基杆菌(M.fujisawaense)、嗜中温甲基杆菌(M.mesophilicum)、嗜有机甲基杆菌(M.organophilum)、耐辐射甲基杆菌(M.radiotolerans)、罗得西亚甲基杆菌(M.rhodesianum)、玫瑰红甲基杆菌(M.rhodinum)、硫氰酸盐甲基杆菌(M.thiocyanatum)以及扎氏甲基杆菌(M.zatmanii)。但是,巢状甲基杆菌(M.nidulans)是非PPFM的固氮甲基杆菌(Sy等人,2001)。甲基杆菌在自然界(存在于土壤、灰尘、淡水、沉积物和叶片表面)以及工业环境和临床环境中普遍存在(Green,2006)。

[0008] 禾谷镰刀菌(Fusarium graminearum)是小麦、大麦以及其它谷类的赤霉病(FHB)

的病因。该病原体还导致玉米的穗和茎腐烂。除了引起产量和谷粒质量显著降低,禾谷镰刀菌还产生有害的真菌毒素,其是动物饲料工业中的主要问题。此外,农业上存在诸如禾谷镰刀菌的真菌病原体对多种化学杀真菌剂形成抗性这一日益严重的问题。因此,农业和动物饲料工业上存在开发控制真菌病原体的有效新方法的需求。

[0009] 立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 是多寄主性 (polyphagous) 担子菌类真菌,其具有涵盖多种经济上重要的单子叶和双子叶植物的广泛宿主范围。已知立枯丝核菌主要作为猝倒病病原体,因为它侵袭幼苗,防止其从土壤发芽或者在发芽之后立即杀死它们。该土壤传播的病原体通过作为孢子体存活以及通过形成被称为菌核的休眠存活结构体在土壤中存留数年。除了烟熏之外(由于费用和环境问题,其通常不可行),避开宿主作物多年轮作、化学种子处理以及促进植物健康的栽培技术是病害治理的优选方法。但是,这些处理均不是完全有效的,特别是在促进病原体生长和胁迫幼苗健康的凉爽、潮湿的年份。

[0010] 核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 是多寄主性子囊菌类真菌,其具有涵盖数千种双子叶植物的宿主范围。由核盘菌引起的大豆和其它豆类作物的白霉病在农学上特别重要。在凉爽、潮湿的环境条件下,该病引起早衰并大幅降低产量。对于白霉病无可用的完整遗传抗性,并且部分抗性仅略微有效。此外,施用对白霉病特异的杀真菌剂的施用仅在极有可能发病的年份施用,并且必须在窄窗内施用以提供有效保护。

[0011] 大豆猝死综合征在1971年首次发生于阿肯色州,并且自此传播至美国中西部的州 (Rupe等人,1991)。该病害由之前被称为茄病镰刀菌 (*Fusarium solani* f.sp.*Glycines*) 的土壤传播的真菌 *Fusarium virguliforme* 引起,并且通过高土壤湿度和土壤压实的条件恶化 (Ringler,1995;Roy等人,1997)。SDS的症状包括叶片组织的马赛克样外观(其中主脉仍是绿色,但是其它叶片区域萎黄或坏死)、木质部组织变红、根部组织黑化或腐烂,以及整体植物健康和产量显著降低。1994-2010年,由镰刀菌属 (*Fusarium*) 物种引起的病害导致的大豆产量损失估计为3620万蒲式耳 (bushels) /年,并且这些损失大部分归因于 *F.virguliforme* (Wrather等人,2010)。

[0012] 缺乏有效的病害治理措施是由镰刀菌属物种(在此期间,其可以归因于 *F.virguliforme*) 导致的大部分大豆产量损失的主要原因。由于该病害的土壤传播性质,一旦其被引入,则存在较少根除该病原体的选择。因此,促进植物健康的培养方法、抗性品种和种子处理是优选的SDS管理策略。这些策略均不能提供病害的完全控制,并且标记用于SDS的抗性品种和种子处理选择是有限的。此外,用于SDS的主要种子处理选择 iLevo (fluoopyram; Bayer CropScience) 很昂贵,并且对季节早期植物健康有负面影响。PPFM细菌的施用连同对抗SDS的其它策略施用为改善该经济上重要的病害的阻抑并对抗由其导致的显著产量损失提供了具有吸引力的方法。

[0013] 发明概述

[0014] 本文提供了包含抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌的组合物,利用所述组合物控制植物、植物部分以及由其衍生的植物的真菌感染的方法,以及制备所述组合物的方法。此类抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌,在某些情况下,在本文被称为“抑制植物致病真菌的甲基杆菌”,或者在某些背景下,被简称为“甲基杆菌”。在某些实施方案中,可以通过分析甲基杆菌抑制植物或分离的植物部分中的真菌病害的能力,将抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌与不抑制植物致病真菌的其它甲基杆菌区分开来。

[0015] 本文提供的组合物,其包含抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌的单培养物或共培养物,以及农业上可接受的赋形剂和/或农业上可接受的佐剂。在某些实施方案中,甲基杆菌物种选自:噬胺甲基杆菌、扭脱甲基杆菌、藤泽氏甲基杆菌、嗜中温甲基杆菌、耐辐射甲基杆菌、罗得西亚甲基杆菌、结瘤甲基杆菌 (*M.nodulans*)、*M.phyllosphaerae*、硫氰酸盐甲基杆菌以及稻甲基杆菌 (*M.oryzae*)。在某些实施方案中,甲基杆菌不是耐辐射甲基杆菌或稻甲基杆菌。在某些实施方案中,植物致病真菌选自:链格孢属 (*Alternaria*) 物种、壳二孢属 (*Ascochyta*) 物种、曲霉属 (*Aspergillus*) 物种、双极霉属 (*Bipolaris*) 物种、葡萄孢属 (*Botrytis*) 物种、盘霜霉属 (*Bremia*) 物种、尾孢属 (*Cercospora*) 物种、旋孢腔菌属 (*Cochliobolus*) 物种、刺盘孢属 (*Colletotrichum*) 物种、色二孢属 (*Diplodia*) 物种、白粉菌属 (*Erysiphe*) 物种、突脐蠕孢属 (*Exserohilum*) 物种、镰刀菌属 (*Fusarium*) 物种、禾顶囊壳属 (*Gaeumanomyces*) 物种、壳球孢属 (*Macrophomina*) 物种、稻瘟病菌 (*Magnaporthe*) 物种、丛赤壳属 (*Nectria*) 物种、霜霉属 (*Peronospora*) 物种、层锈菌属 (*Phakopsora*) 物种、瓶霉属 (*Phialophora*) 物种、茎点霉属 (*Phoma*) 物种、瘤梗孢属 (*Phymatotrichum*) 物种、疫霉属 (*Phytophthora*) 物种、单轴霉属 (*Plasmopara*) 物种、柄锈菌属 (*Puccinia*) 物种、叉丝单囊壳属 (*Podosphaera*) 物种、核腔菌属 (*Pyrenophora*) 物种、梨孢属 (*Pyricularia*) 物种、腐霉属 (*Pythium*) 物种、丝核菌属 (*Rhizoctonia*) 物种、小核菌属 (*Sclerotium*) 物种、核盘菌属 (*Sclerotinia*) 物种、壳针孢属 (*Septoria*) 物种、壳多孢属 (*Stagonospora*) 物种、根串珠霉属 (*Thielaviopsis*) 物种、钩丝壳属 (*Uncinula*) 物种、黑粉菌属 (*Ustilago*) 物种、黑星菌属 (*Venturia*) 物种以及轮枝孢属 (*Verticillium*) 物种。在某些实施方案中,镰刀菌属物种选自禾谷镰刀菌、轮枝镰刀菌 (*Fusarium verticillioides*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、*Fusarium virguliforme* 以及茄病镰刀菌 (*Fusarium solani*)。在以上提及的任何组合物的某些实施方案中,组合物包含固体物质,其中甲基杆菌的单培养物或共培养物附着于该固体物质。在某些实施方案中,植物致病真菌是丝核菌属物种或核盘菌属物种。在某些实施方案中,丝核菌属物种是立枯丝核菌或禾谷丝核菌 (*Rhizoctonia cerealis*)。在某些实施方案中,核盘菌属物种是核盘菌或币斑病菌 (*Sclerotinia homoeocarpa*)。在某些实施方案中,组合物包含胶体,其由其上附着甲基杆菌的单培养物或共培养物的固体物质与液体形成。在某些实施方案中,胶体是凝胶。在以上提及的任何组合物的某些实施方案中,组合物是乳状液。在以上提及的任何组合物的某些实施方案中,甲基杆菌是 NLS0066 (NRRL B-50940)、NLS0089 (NRRL B-50933)、NLS0066 和 NLS0017 的组合 (NRRL B-50931) 或者以上的衍生物。在以上提及的任何组合物的某些实施方案中,组合物还包含甲基杆菌菌株 NLS0020 (NRRL B-50930) 或其衍生物。在以上提及的任何组合物的某些实施方案中,甲基杆菌是 NLS0066、NLS0089、NLS0066 和 NLS0017 的组合、NLS0066 和 NLS0020 的组合、NLS0089 和 NLS0020 的组合、或者以上的衍生物。在某些实施方案中,甲基杆菌是 NLS0089,并且植物致病真菌是丝核菌属物种或核盘菌属物种。在某些实施方案中,甲基杆菌是 NLS066、NLS066 和 NLS0017、NLS0089、或者 NLS0089 和 NLS0020,并且植物致病真菌是禾谷镰刀菌、玉蜀黍尾孢菌 (*Cercospora zea-maydis*) 或禾生刺盘孢 (*Colletotrichum graminicola*)。在某些实施方案中,甲基杆菌是 NLS0089、或者 NLS0089 和 NLS0020,并且植物致病真菌是小麦壳针孢 (*Septoria tritici*)、颖枯壳多孢 (*Stagonospora nodorum*)、腐霉属物种、立枯丝核菌、镰刀菌属物种、水稻稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*)、偃麦草核腔菌 (*Pyrenophora tritici-*

repentis)、微座孢属斑病菌 (*Microdochium nivale*)、核盘菌、大豆尾孢菌 (*Cercospora sojina*)、菊池尾孢 (*Cercospora kikuchii*)、镰刀菌属物种、立枯丝核菌、*Fusarium virguliforme*、腐霉属物种、立枯丝核菌、玉米赤霉 (*Gibberella zeae*) 或腐霉属物种。在以上提及的任何组合物的某些实施方案中,抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌属物种含有至少一种多态DNA元件或直向同源基因,其在甲基杆菌分离株NLS0066中存在但在不抑制植物禾谷镰刀菌杆菌感染的一种或多种甲基杆菌分离株NLS0020和NLS0037中不存在。在某些实施方案中,抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌属物种含有至少一种基因,其与选自SEQ ID NO:7279-9187和9188的至少一种基因直向同源,或者与选自SEQ ID NO:7279-9187和9188的至少一种基因具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性。在某些实施方案中,抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌属物种含有至少一种基因,其与选自SEQ ID NO:2585-4593和4594的至少一种蛋白直向同源,或者编码与选自SEQ ID NO:2585-4593和4594的至少一种蛋白具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性的蛋白。在以上提及的任何实施方案中,被抑制的植物致病真菌可以为其无性形式、为其有性形式、或者为其无性形式和为其有性形式这两种形式。在以上提及的任何实施方案中,组合物可以包含真菌抑制浓度的甲基杆菌单培养物或共培养物。在以上提及的任何实施方案中,组合物还可以包含选自唑类 (azole)、二硫代氨基甲酸酯类 (dithiocarbamate)、甲氧基丙烯酸酯类 (strobilurin) 和苯并咪唑类 (benzimidazole) 的抗真菌化合物。在某些实施方案中,唑类是种菌唑 (ipconazole)。本文还提供了以上提及的任何组合物在涂布或部分涂布植物部分 (例如种子) 以抑制以上提及的任何植物致病真菌的生长中的用途。

[0016] 还提供了植物或植物部分,其至少部分涂布以上提及的任何包含甲基杆菌的单培养物或共培养物的组合物。在某些实施方案中,至少部分涂布的植物或植物部分是谷类植物或谷类植物部分。在某些实施方案中,至少部分涂布的谷类植物选自下述植物:水稻、小麦、玉米、大麦、粟、高粱、燕麦以及黑麦。在某些实施方案中,至少部分涂布的谷类植物部分选自下述的植物部分:水稻、小麦、玉米、大麦、粟、高粱、燕麦以及黑麦。在某些实施方案中,至少部分涂布的植物或植物部分是双子叶植物的植物部分。在某些实施方案中,双子叶植物或植物部分是大豆、花生或番茄植物部分。在以上提及的任何植物或植物部分的某些实施方案中,组合物中的甲基杆菌获自不同于涂布组合物的植物或植物部分的属、种、亚种或品种的植物属、植物种、植物亚种或植物品种。还提供了包含可检测量的以上提及的任何组合物的任何甲基杆菌的经加工的植物产品。在某些实施方案中,检测的甲基杆菌获自不同于用于获得所述经加工的植物产品的属、种、亚种或品种的植物属、植物种、植物亚种或植物品种。在某些实施方案中,甲基杆菌是NLS066、NLS066和NLS0017、NLS0089、或者NLS0089和NLS0020,被抑制的植物致病真菌是禾谷镰刀菌,以及植物或植物部分是小麦植物或植物部分。在某些实施方案中,甲基杆菌是NLS066、NLS066和NLS0017、NLS0089、或者NLS0089和NLS0020,被抑制的植物致病真菌是玉蜀黍尾孢菌或禾生炭疽菌,以及植物或植物部分是玉米植物或玉米植物部分。在某些实施方案中,甲基杆菌是NLS0089、或者NLS0089和NLS0020,被抑制的植物致病真菌是小麦壳针孢、颖枯壳多孢、腐霉属物种、立枯丝核菌、镰刀菌属物种、水稻稻瘟病菌、偃麦草核腔菌、微座孢属斑病菌,以及植物或植物部分是小麦植物或小麦植物部分。在某些实施方案中,甲基杆菌是NLS0089或者NLS0089和NLS0020,被抑制的植物致病真菌是核盘菌、大豆尾孢菌、菊池尾孢、镰刀菌属物种、立枯丝核菌、*Fusarium*

virguliforme、腐霉属物种,以及植物或植物部分是大豆植物或大豆植物部分。在某些实施方案中,甲基杆菌是NLS0089、或者NLS0089和NLS0020,被抑制的植物致病真菌是镰刀菌属物种、腐霉属物种或玉米赤霉,以及植物或植物部分是玉米植物或玉米植物部分。在某些实施方案中,植物或植物部分包含真菌抑制量的甲基杆菌。在某些实施方案中,施用于植物部分(例如种子)的真菌抑制量的甲基杆菌为约 1.0×10^3 、 1.0×10^4 或者 1.0×10^5 至约 1.0×10^7 或者 1.0×10^8 CFU PPFM细菌/植物部分(例如种子)。在某些实施方案中,甲基杆菌与植物或植物部分异源。在以上提及的任何植物部分的某些实施方案中,植物部分是叶、茎、花、根、块茎或种子。

[0017] 还提供了制备以上提及的任何包含抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌的组合物的方法,其包括将抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌与农业上可接受的赋形剂和/或与农业上可接受的佐剂组合。在所述方法的某些实施方案中,甲基杆菌属物种选自:噬胺甲基杆菌、扭脱甲基杆菌、藤泽氏甲基杆菌、嗜中温甲基杆菌、耐辐射甲基杆菌、罗得西亚甲基杆菌、结瘤甲基杆菌、*M. phyllosphaerae*、硫氰酸盐甲基杆菌以及稻甲基杆菌。在所述方法的某些实施方案中,甲基杆菌不是耐辐射甲基杆菌或稻甲基杆菌。在所述方法的某些实施方案中,甲基杆菌是NLS0066、NLS0089、NLS0066与NLS0017的组合、或者以上的衍生物。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,组合物还包含甲基杆菌菌株NLS0020或其衍生物。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,甲基杆菌是NLS0066、NLS0089、NLS0066和NLS0017的组合、NLS0066和NLS0020的组合、NLS0089和NLS0020的组合、以及以上的衍生物。在某些实施方案中,植物或植物部分是大豆植物或大豆植物部分。在某些实施方案中,植物或植物部分选自下述植物或其植物部分:水稻、小麦、玉米、大麦、粟、高粱、燕麦以及黑麦。在某些实施方案中,甲基杆菌是NLS0089,并且植物致病真菌是丝核菌属物种或核盘菌属物种。在所述方法的某些实施方案中,抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌属物种含有至少一种多态DNA元件或直向同源基因,其在NLS0066中存在但在不抑制植物禾谷镰刀菌感染的一种或多种甲基杆菌分离株NLS0020和/或NLS0037中不存在。在所述方法的某些实施方案中,抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌属物种含有至少一种基因,其与选自SEQ ID NO:7279-9187和9188的至少一种基因直向同源,或者与选自SEQ ID NO:7279-9187和9188的至少一种基因具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性。在所述方法的某些实施方案中,抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌属物种含有至少一种基因,其与选自SEQ ID NO:2585-4593和4594的至少一种蛋白直向同源,或者编码与选自SEQ ID NO:2585-4593和4594的至少一种蛋白具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性的蛋白。在所述方法的某些实施方案中,植物致病真菌选自:链格孢属物种、壳二孢属物种、曲霉菌属物种、双极霉属物种、葡萄孢属物种、盘霜霉属物种、尾孢属物种、旋孢腔菌属物种、刺盘孢属物种、色二孢属物种、白粉菌属物种、突脐蠕孢属物种、镰刀菌属物种、禾顶囊壳物种、壳球孢属物种、稻瘟病菌物种、丛赤壳属物种、霜霉属物种、层锈菌属物种、瓶霉属物种、茎点霉属物种、瘤梗孢属物种、疫霉属物种、单轴霉属物种、柄锈菌属物种、叉丝单囊壳属物种、核腔菌属物种、梨孢属物种、腐霉属物种、丝核菌属物种、小核菌属物种、核盘菌属物种、壳针孢属物种、壳多孢属物种、根串珠霉属物种、钩丝壳属物种、黑粉菌属物种、黑星菌属物种以及轮枝孢属物种。在所述方法的某些实施方案中,植物致病真菌是镰刀菌属物种。在所述方法的某些实施方案中,镰刀菌属物种选自:禾谷镰刀菌、轮枝镰刀菌、尖孢镰刀菌、

Fusarium virguliforme、以及茄病镰刀菌。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,甲基杆菌的单培养物或共培养物附着于固体物质上。在所述方法的某些实施方案中,将附着于固体物质上的甲基杆菌与液体组合,以形成胶体组合物。在所述方法的某些实施方案中,胶体是凝胶。在所述方法的某些实施方案中,通过在存在固体物质的情况下培养甲基杆菌来提供附着于固体物质上的甲基杆菌的单培养物或共培养物。在所述方法的某些实施方案中,组合物包含乳状液。在所述方法的某些实施方案中,通过在乳状液中培养甲基杆菌来提供所述甲基杆菌。在以上提及的任何实施方案中,被抑制的植物致病真菌可以为其无性形式、为其有性形式、或者为其无性形式和有性形式这两种形式。在以上提及的任何实施方案中,组合物还可以包含选自唑类、二硫代氨基甲酸酯类、甲氧基丙烯酸酯类和苯并咪唑类的抗真菌化合物。在某些实施方案中,唑类是种菌唑。

[0018] 还提供了控制植物致病真菌的方法,其包括向植物或植物部分施用一定量的以上提及的任何包含抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌的组合物,相对于未施用所述组合物的对照植物、植物部分或由其获得的植物的感染,所述量提供植物、植物部分或由其获得的植物中所述植物致病真菌感染的抑制。在所述方法的某些实施方案中,相对于对照植物、植物部分或由其获得的植物的感染,施用所述组合物为植物、植物部分或由其衍生的植物提供植物致病真菌感染至少40%、50%、75%、至少85%或至少95%的抑制。在所述方法的某些实施方案中,植物部分选自:叶、茎、花、根、块茎和种子。在所述方法的某些实施方案中,所述方法还包括下述步骤:从所述植物或植物部分收获选自叶、茎、花、根、块茎或种子的至少一种植物部分。在所述方法的某些实施方案中,相对于获自对照植物、植物部分或由其获得的植物的植物部分,所述植物部分中的真菌毒素水平降低至少50%、至少75%、至少85%、或者至少95%。在以上提及的方法的某些实施方案中,所述方法还包括从植物或植物部分获得经加工的食品或饲料组合物。在以上提及的方法的某些实施方案中,相对于获自对照植物、植物部分或由其获得的植物的经加工的食品或饲料组合物,所述经加工的食品或饲料组合物中的真菌毒素降低至少50%、至少75%、至少85%、或至少95%。在某些实施方案中,向植物部分施用真菌抑制量的甲基杆菌。在某些实施方案中,向植物部分植物部分(例如种子)施用的真菌抑制量的甲基杆菌为约 1.0×10^3 、 1.0×10^4 或 1.0×10^5 至约 1.0×10^7 、 1.0×10^8 、 1.0×10^9 或 1.0×10^{10} CFU甲基杆菌/植物部分(例如种子)。在某些实施方案中,甲基杆菌与植物或植物部分异源。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,植物部分是叶、茎、花、根、块茎或种子。在所述方法的某些实施方案中,甲基杆菌是NLS0066、NLS0089、NLS0066和NLS0017的组合、或者以上的衍生物。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,所述组合物还包含甲基杆菌菌株NLS0020或其衍生物。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,甲基杆菌是NLS0066、NLS0089、NLS0066和NLS0017的组合、NLS0066和NLS0020的组合、NLS0089和NLS0020的组合、或者以上的衍生物。在某些实施方案中,植物或植物部分是大豆植物或大豆植物部分。在某些实施方案中,所述植物或植物部分选自下述植物或其植物部分:水稻、小麦、玉米、大麦、粟、高粱、燕麦和黑麦。在某些实施方案中,甲基杆菌是NLS0089,并且植物致病真菌是丝核菌属物种或核盘菌属物种。在某些实施方案中,甲基杆菌是NLS066、NLS066和NLS0017、NLS0089、或者NLS0089和NLS0020,被抑制的植物致病真菌是禾谷镰刀菌,以及植物或植物部分是小麦植物或植物部分。在某些实施方案中,甲基杆菌是NLS066、NLS066和NLS0017、NLS0089、或者NLS0089和NLS0020,被抑制的植物致病真菌是

玉蜀黍尾孢菌或禾生炭疽菌,以及植物或植物部分是玉米植物或玉米植物部分。在某些实施方案中,甲基杆菌是NLS0089、或者NLS0089和NLS0020,被抑制的植物致病真菌是小麦壳针孢、颖枯壳多孢、腐霉属物种、立枯丝核菌、镰刀菌属物种、水稻稻瘟病菌、偃麦草核腔菌、微座孢属斑病菌,并且植物或植物部分是小麦植物或小麦植物部分。在某些实施方案中,甲基杆菌是NLS0089或者NLS0089和NLS0020,被抑制的植物致病真菌是核盘菌、大豆尾孢菌、菊池尾孢、镰刀菌属物种、立枯丝核菌、*Fusarium virguliforme*、腐霉属物种,以及植物或植物部分是大豆植物或大豆植物部分。在某些实施方案中,甲基杆菌是NLS0089、或者NLS0089和NLS0020,被抑制的植物致病真菌是镰刀菌属物种、腐霉属物种或玉米赤霉,以及植物或植物部分是玉米植物或玉米植物部分。

[0019] 还提供了抑制植物致病真菌生长的分离的甲基杆菌。在某些实施方案中,甲基杆菌含有至少一种多态DNA元件或直向同源基因,其在NLS0066中存在但在不抑制植物禾谷镰刀菌感染的一种或多种甲基杆菌分离株NLS0020和/或NLS0037中不存在。在某些实施方案中,抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌属物种含有至少一种基因,其与选自SEQ ID NO: 7279-9187和9188的至少一种基因直向同源,或者与选自SEQ ID NO: 7279-9187和9188的至少一种基因具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性。在某些实施方案中,抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌属物种含有至少一种基因,其与选自SEQ ID NO: 2585-4593和4594的至少一种蛋白直向同源,或者编码与选自SEQ ID NO: 2585-4593和4594的至少一种蛋白具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性的蛋白。在某些实施方案中,甲基杆菌选自:噬胺甲基杆菌、扭脱甲基杆菌、藤泽氏甲基杆菌、嗜中温甲基杆菌、耐辐射甲基杆菌、罗得西亚甲基杆菌、结瘤甲基杆菌、*M. phyllosphaerae*、硫氰酸盐甲基杆菌以及稻甲基杆菌。在某些实施方案中,甲基杆菌不是耐辐射甲基杆菌或稻甲基杆菌。在某些实施方案中,植物致病真菌选自:链格孢属物种、壳二孢属物种、曲霉菌属物种、双极霉属物种、葡萄孢属物种、盘霜霉属物种、尾孢属物种、旋孢腔菌属物种、毛盘孢属物种、色二孢属物种、白粉菌属物种、突脐蠕孢属物种、镰刀菌属物种、禾顶囊壳物种、壳孢属物种、稻瘟病菌物种、丛赤壳属物种、霜霉属物种、层锈菌属物种、瓶霉属物种、茎点霉属物种、瘤梗孢属物种、疫霉属物种、单轴霉属物种、柄锈菌属物种、叉丝单囊壳属物种、核腔菌属物种、梨孢属物种、腐霉属物种、丝核菌属物种、小核菌属物种、核盘菌属物种、壳针孢属物种、壳多孢属物种、根串珠霉属物种、钩丝壳属物种、黑粉菌属物种、黑星菌属物种以及轮枝孢属物种。在以上提及的任何实施方案中,被抑制的植物致病真菌可以为其无性形式,为其有性形式,或者为其无性形式和有性形式这两种形式。

[0020] 附图简述

[0021] 附图并入本文并组成说明书的一部分,其阐明了本公开的某些实施方案。在附图中:

[0022] 图1是关于PPFM处理的二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)植株的代表性病害结果的照片。如通过大量白色真菌菌丝体和小穗坏死的存在所证明的,黑色箭头指示接受下述处理的植株的显著病害发展:A)无PPFM对照处理,B)PPFM菌株NLS0017种子处理,C)PPFM菌株NLS0020种子处理,以及D)PPFM菌株NLS0037种子处理。如通过灰色箭头所指示的,接受E)用PPFM菌株NLS0066进行种子处理的植株具有显著降低的小穗坏死和真菌菌丝体丰度。

[0023] 图2是显示NLS0089对大豆白霉病枯萎严重性的阻抑的柱状图。

[0024] 图3是显示NLS0089对大豆白霉病病变部位长度发展的阻抑的柱状图。

[0025] 发明详述

[0026] 定义

[0027] 本文使用的短语“附着于其上”和“附着的”，指通过在固体物质上生长生长或已经在固体物质上生长而与固体物质结合的甲基杆菌。

[0028] 本文使用的短语“农业上可接受的佐剂”，指增强用于处理植物和/或植物部分的组合物中的活性剂的性能的物质，所述组合物包含甲基杆菌的单培养物或共培养物。

[0029] 本文使用的短语“农业上可接受的赋形剂”，指可以用作用于处理植物和/或植物部分的组合物中的活性剂的稀释剂和/或载体的基本上是惰性的物质。在某些组合物中，活性剂可以包含甲基杆菌的单培养物或共培养物。

[0030] 当在甲基杆菌分离株的背景下使用时，本文使用的短语“其衍生物”，指获自甲基杆菌分离株的任何菌株。甲基杆菌分离株的衍生物包括但不限于：通过选择获得的菌株的变体、通过诱变和筛选所选择的菌株的变体、以及获自甲基杆菌分离株的遗传转化菌株。

[0031] 本文使用的术语“甲基杆菌”，指甲杆菌属的兼性甲基营养菌。因此，本文使用的术语甲基杆菌不涵盖为专性甲烷氧化菌的下述属中包含的物种：甲基细菌(Methylobacter)、甲基单胞菌属、甲基微菌属、甲基球菌属、甲基弯曲菌属、甲基孢囊菌属、甲基球状菌属、甲基暖菌属以及甲基细胞菌属。

[0032] 本文使用的短语“甲基杆菌的共培养物”，指包含至少两种甲基杆菌菌株或者至少两种甲基杆菌物种的甲基杆菌培养物。

[0033] 本文使用的术语“品种”，指已知仅栽培的任何植物，并且其包括无性繁殖的植物、有性繁殖的植物、近交系和杂种。

[0034] 本文使用的短语“污染性微生物”指在引入培养物、发酵液、发酵液产品或组合物中之前未被鉴别的所述培养物、发酵液、发酵液产品或组合物中的微生物。

[0035] 本文使用的术语“乳状液”，指两种不能混溶的液体的胶体混合物，其中一种液体是连续相，而另一种液体是分散相。在某些实施方案中，连续相是水性液体，而分散相是在所述水性液体中不能混溶或部分混溶的液体。

[0036] 本文使用的短语“基本不含污染性微生物”，指这样的培养物、发酵液、发酵产品或组合物：按量或类型计，至少约95%的存在于所述培养物、发酵液、发酵产品或组合物中的微生物有是期望的甲基杆菌或者预先确定身份的其它期望的微生物。

[0037] 本文使用的短语“真菌抑制浓度的甲基杆菌的单培养物或共培养物”是这样的浓度：相对于对照植物或植物部分的感染，其在植物、植物部分或由其衍生的植物中提供至少40%、50%、75%、至少85%、或至少95%的植物致病真菌感染抑制。

[0038] 当在至少部分涂布植物或植物部分的甲基杆菌的背景下使用时，本文使用的术语“异源”，指当植物或植物部分至少部分涂布甲基杆菌时，该甲基杆菌在天然状态下与该相同物种的植物或植物部分无关。在某些实施方案中，用于至少部分涂布第一植物物种的植物或植物部分的异源甲基杆菌是分离自或者可以分离自第二植物物种或不同植物物种的甲基杆菌。

[0039] 本文使用的短语“无生命的固体物质”，指在水中或水溶液中不溶或部分可溶的物

质,,其源自非活体或不是仍然存活的有机体的一部分。

[0040] 本文使用的短语“甲基杆菌的单培养物”,指由甲基杆菌的单一菌株组成的甲基杆菌培养物。

[0041] 如本文所使用的“杀虫剂”,指杀昆虫、杀真菌、杀线虫、杀细菌的试剂或者以上的任何组合。

[0042] 本文使用的短语“抑菌剂”,指抑制细菌生长但不杀死细菌的试剂。

[0043] 本文使用的短语“不显著抑制甲基杆菌生长的杀虫剂”,指这样的任何杀虫剂:当在包含含有其上附着甲基杆菌的单培养物或共培养物的固体物质的发酵产品的组合物中提供时,当向植物或植物部分施用所述组合物时,与缺乏所述杀虫剂的组合物相比,其导致甲基杆菌生长不多于50%的抑制。在某些实施方案中,当向植物或植物部分施用所述组合物时,与缺乏所述杀虫剂的组合物相比,所述杀虫剂导致甲基杆菌生长不多于40%、20%、10%、5%或1%的抑制。

[0044] 本文使用的术语“PPFM细菌”,指除结瘤甲基杆菌之外甲基杆菌属中的细菌物种,但不限于此。

[0045] 本文使用的短语“固体物质”,指在水或水溶液中不溶或部分可溶的物质。

[0046] 本文使用的短语“可以悬浮于其中的固相”通过搅拌可分布于整个液体中的固体物质。

[0047] 本文使用的术语“不可再生的”,指不能再生为完整植物的植物部分或经加工的植物产品。

[0048] 本文使用的短语“基本上所有固相均悬浮于液相中”,指这样的媒介物(media):通过搅拌,其中至少95%、98%或99%的构成固相的固体物质分布于整个液体中。

[0049] 本文使用的短语“基本上所有固相均不悬浮于液相中”指这样的媒介物:通过搅拌,其中少于5%、2%或1%的固体以颗粒形式分布于整个媒介物中。

[0050] 当任何前述定义与通过引用并入本文的任何专利或非专利参考文献、本文引用的任何专利或非专利参考文献或者别处发现的任何专利或非专利参考文献中提供的定义在一定程度上不一致时,应当理解本文将使用前述定义。

[0051] 抑制植物致病真菌的甲基杆菌、包含抑制植物致病真菌的甲基杆菌的组合物、其施用方法以及制备方法

[0052] 本文提供了抑制植物致病真菌的多种甲基杆菌、包含这些甲基杆菌的组合物、应用所述组合物抑制植物致病真菌的方法以及制备所述组合物的方法。如本文所使用的,植物致病真菌生长的抑制包括真菌生长任何可测量的降低,其中真菌生长包括但不限于真菌细胞、孢子、分生孢子或菌丝体的数目和/或程度的任何可测量的降低。如本文所使用的,植物致病真菌感染的抑制和/或植物致病真菌生长的抑制还被理解为包括植物中由真菌生长引起的不良作用的可测量的降低。植物中真菌生长的不良作用包括但不限于:任何类型的植物组织损伤或坏死、任何类型的植物产量降低、农作物植物产品价值的任何降低、和/或非期望的真菌代谢物或真菌生长副产物(包括但不限于真菌毒素)的产生。本文提供的组合物和甲基杆菌抑制的植物致病真菌可以为其无性形式、为其有性形式、或者为其无性形式和有性形式这两种形式。

[0053] 本文提供了抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌和包含所述甲基杆菌的组合物。在

某些实施方案中,甲基杆菌选自:噬胺甲基杆菌、扭脱甲基杆菌、藤泽氏甲基杆菌、嗜中温甲基杆菌、耐辐射甲基杆菌、罗得西亚甲基杆菌、结瘤甲基杆菌、*M. phyllosphaerae*、硫氰酸盐甲基杆菌以及稻甲基杆菌。在某些实施方案中,甲基杆菌不是耐辐射甲基杆菌或稻甲基杆菌。在某些实施方案中,当暴露于植物致病真菌时,与对照处理相比,甲基杆菌或组合物提供植物致病真菌生长至少约25%、至少约40%、至少约50%或至少约75%的抑制。在某些实施方案中,被抑制的植物致病真菌选自:链格孢属物种、壳二孢属物种、曲霉菌属物种、双极霉属物种、葡萄孢属物种、盘霜霉属物种、尾孢属物种、旋孢腔菌属物种、刺盘孢属物种、色二孢属物种、白粉菌属物种、突脐蠕孢属物种、镰刀菌属物种、禾顶囊壳物种、壳孢属物种、稻瘟病菌物种、丛赤壳属物种、霜霉属物种、层锈菌属物种、瓶霉属物种、茎点霉属物种、瘤梗孢属物种、疫霉属物种、单轴霉属物种、柄锈菌属物种、叉丝单囊壳属物种、核腔菌属物种、梨孢属物种、腐霉属物种、丝核菌属物种、小核菌属物种、核盘菌属物种、壳针孢属物种、壳多孢属物种、根串珠霉属物种、钩丝壳属物种、黑粉菌属物种、黑星菌属物种以及轮枝孢属物种。在某些实施方案中,被抑制的植物致病真菌是镰刀菌属物种。在某些实施方案中,被抑制的镰刀菌属物种选自禾谷镰刀菌、轮枝镰刀菌、尖孢镰刀菌、*Fusarium virguliforme*和茄病镰刀菌。在某些实施方案中,分离的甲基杆菌是NLS0066、NLS0089、NLS0066和NLS0017的组合、或者以上的衍生物。在某些实施方案中,所述组合物还包含甲基杆菌菌株NLS0020或其衍生物。本文提供的组合物和甲基杆菌抑制的植物致病真菌可以为其无性形式、为其有性形式、或者为其无性形式和有性形式这两种形式。

[0054] 还提供了包含抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌的组合物。在某些实施方案中,所述组合物还包含农业上可接受的赋形剂和/或农业上可接受的佐剂。在某些实施方案中,甲基杆菌属物种选自:噬胺甲基杆菌、扭脱甲基杆菌、藤泽氏甲基杆菌、嗜中温甲基杆菌、耐辐射甲基杆菌、罗得西亚甲基杆菌、结瘤甲基杆菌、*M. phyllosphaerae*、硫氰酸盐甲基杆菌以及稻甲基杆菌。在某些实施方案中,甲基杆菌不是耐辐射甲基杆菌或稻甲基杆菌。在某些实施方案中,当暴露于植物致病真菌时,与对照处理相比,所述组合物提供植物致病真菌生长至少约25%、约50%或约75%的抑制。在某些实施方案中,被抑制的植物致病真菌选自:链格孢属物种、壳二孢属物种、曲霉菌属物种、双极霉属物种、葡萄孢属物种、盘霜霉属物种、尾孢属物种、旋孢腔菌属物种、刺盘孢属物种、色二孢属物种、白粉菌属物种、突脐蠕孢属物种、镰刀菌属物种、禾顶囊壳物种、壳孢属物种、稻瘟病菌物种、丛赤壳属物种、霜霉属物种、层锈菌属物种、瓶霉属物种、茎点霉属物种、瘤梗孢属物种、疫霉属物种、单轴霉属物种、柄锈菌属物种、叉丝单囊壳属物种、核腔菌属物种、梨孢属物种、腐霉属物种、丝核菌属物种、小核菌属物种、核盘菌属物种、壳针孢属物种、壳多孢属物种、根串珠霉属物种、钩丝壳属物种、黑粉菌属物种、黑星菌属物种以及轮枝孢属物种。在某些实施方案中,被抑制的植物致病真菌是镰刀菌属物种。在某些实施方案中,被抑制的镰刀菌属物种选自禾谷镰刀菌、轮枝镰刀菌、尖孢镰刀菌、*Fusarium virguliforme*和茄病镰刀菌。在以上提及的任何组合物的某些实施方案中,所述组合物包含其上附着甲基杆菌的单培养物或共培养物的固体物质。在甲基杆菌附着于固体物质上的某些实施方案中,所述组合物包含由其上附着甲基杆菌的单培养物或共培养物的固体物质与液体形成的胶体。在某些实施方案中,胶体是凝胶。在以上提及的某些组合物的某些实施方案中,所述组合物是不包含固体物质的乳状液。在以上提及的任何组合物的某些实施方案中,甲基杆菌含有至少一种在NLS0066中存在

但在不抑制植物禾谷镰刀菌感染的一种或多种甲基杆菌分离株NLS0020和/或NLS0037中不存在的多态DNA元件或直向同源基因。在以上提及的任何组合物的某些实施方案中,抑制植物致病真菌的生长的甲基杆菌属物种含有至少一种与选自SEQ ID NO:7279-9187和9188的至少一种基因直向同源或者与其具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性的基因。在以上提及的任何组合物的某些实施方案中,抑制植物致病真菌的生长的甲基杆菌属物种含有至少一种编码与选自SEQ ID NO:2585-4593和4594的至少一种蛋白直向同源或者与其具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性的蛋白的基因。在以上提及的任何组合物的某些实施方案中,甲基杆菌是NLS0066、NLS0089、NLS0066和NLS0017的组合物、或者以上的衍生物。在以上提及的任何组合物的某些实施方案中,所述组合物还包含甲基杆菌菌株NLS0020或其衍生物。在以上提及的任何实施方案中,被抑制的植物致病真菌可以为其无性形式、为其有性形式、或者为其无性形式和有性形式这两种形式。

[0055] 在某些实施方案中,可以通过测试新分离的候选甲基杆菌属物种中的多态核酸、直向同源基因或基因序列的存在来鉴定抑制植物致病真菌的甲基杆菌属物种,所述多态核酸、直向同源基因或基因序列在本文提供的抑制某种植物致病真菌的甲基杆菌属物种中存在且在本文提供的不抑制植物禾谷镰刀菌感染的甲基杆菌属物种中不存在。当候选甲基杆菌属物种中的染色体和/或任何染色体外DNA:(i) 包含编码与抑制某种植物致病真菌的甲基杆菌属物种中存在的蛋白的全长氨基酸序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白的基因时;或者(ii) 包含与抑制某种植物致病真菌的甲基杆菌属物种中存在的基因的全长核酸序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%的序列同一性的基因时,所述候选甲基杆菌属物种含有至少一种与抑制某种植物致病真菌的甲基杆菌属物种中存在的基因直向同源的基因。在某些实施方案中,存在于所鉴定的抑制某种植物致病真菌的甲基杆菌属物种中的多态核酸、直向同源基因或基因序列也存在于本文提供的抑制某种植物致病真菌的甲基杆菌属物种分离株NLS0066中,但是不存在于本文提供的不抑制植物禾谷镰刀菌感染的一种或多种甲基杆菌属物种分离株NLS0020和/或NLS0037中。在某些实施方案中,存在于所鉴定的抑制植物致病真菌的甲基杆菌属物种中的多态核酸、直向同源基因或基因序列存在于甲基杆菌属物种分离株NLS0066中,但是不存在于不抑制植物禾谷镰刀菌感染的两种甲基杆菌属物种分离株NLS0020和NLS0037中。在某些实施方案中,可以用于鉴定抑制植物致病真菌的甲基杆菌的NLS0066中存在的蛋白序列包括但不限于SEQ ID NO:2585-4594。可以用于鉴定抑制植物致病真菌的甲基杆菌的NLS0066中存在的相应基因序列(即核酸序列)包括但不限于SEQ ID NO:7279-9188。在某些实施方案中,抑制植物致病真菌的甲基杆菌含有至少一种与选自SEQ ID NO:7279-9187和9188的至少一种基因直向同源或者与其具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性的基因。在某些实施方案中,抑制植物致病真菌的甲基杆菌含有至少一种编码与选自SEQ ID NO:2585-4593和4594的至少一种蛋白具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性的蛋白的基因。在某些实施方案中,抑制植物致病真菌的甲基杆菌属物种也可以含有至少1种、2种、3种、4种、6种、8种、10种、15种、20种或50种下述基因:(i) 其编码与具有SEQ ID_NO:2585-4593和4594的氨基酸序列的

蛋白直向同源的蛋白;或者(ii)其编码与选自SEQ ID NO:2585-4593和4594的蛋白具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性的蛋白。在某些实施方案中,抑制植物致病真菌的甲基杆菌属物种可以含有至少1种、2种、3种、4种、6种、8种、10种、15种、20种或50种与选自SEQ ID NO:7279-9187和9188的一种或多种基因直向同源或者与其具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性的基因。

[0056] 存在于抑制植物致病真菌的甲基杆菌属物种中的此类核酸多态性可以包括但不限于:单核苷酸多态性、RFLP、AFLP和/或其它DNA变体,如由于细菌基因组中的插入、缺失和置换(插入和缺失)而形成的重复序列、插入序列、转座子和基因组岛,所述细菌基因组包含可以存在于抑制植物致病真菌的甲基杆菌属物种中的染色体DNA以及任何染色体外核酸元件。此类染色体外核酸元件包括但不限于质粒、噬菌体DNA或RNA等。用于鉴定此类核苷酸多态性的方法包括但不限于:单碱基延伸(SBE)技术、等位基因特异性杂交(ASH)、实时PCR检测(即TaqMan™;美国专利第5,804,375号;第5,538,848号;第5,487,972号以及第5,210,015号,将其通过引用整体并入本文)、ASH和RT-PCR的组合物(KASP™检测系统,LGC Genomics, Middlesex,UK)、以及深度测序技术(美国专利申请第20120264632号,将其通过引用整体并入本文)。

[0057] 可以通过多种不同的技术确定甲基杆菌属物种含有编码蛋白的基因,所述蛋白与在抑制植物致病真菌的甲基杆菌属物种中存在但在一种或多种甲基杆菌属物种分离株中不存在的蛋白直向同源。在某些实施方案中,可以确定甲基杆菌属物种含有编码蛋白的基因,所述蛋白与在NLS0066中存在但在一种或多种甲基杆菌属物种分离株NLS0020和/或NLS0037中不存在的蛋白直向同源或者与在NLS0066中存在的蛋白直向同源。在某些实施方案中,可以通过下述确定甲基杆菌属物种含有编码与此类蛋白直向同源的蛋白的基因:用计算机和相关软件收集包含甲基杆菌属物种中存在的染色体DNA序列和染色体外DNA序列的完整电子基因组序列,并确定所述DNA序列中存在的任何开放阅读框(ORF)是否编码具有以上提及的百分数序列同一性的蛋白。在某些实施方案中,可以通过对电子收集的序列执行六向(six-way)翻译并用在NLS0066中存在但在一种或多种甲基杆菌属物种分离株NLS0020和/或NLS0037中不存在的蛋白序列或者用SEQ ID NO:2585-4594的氨基酸序列查询翻译的序列来鉴定ORF。在其它实施方案中,可以通过核酸分析或蛋白分析技术确定甲基杆菌属物种内给定序列的存在或不存在。编码SEQ ID NO:2585-4594的蛋白的核酸序列的实例分别包括但不限于SEQ ID NO:7279-9188。此类核酸分析包括但不限于:基于核酸杂交的技术、聚合酶链式反应、质谱法、基于纳米孔的检测、分支DNA分析、以上的组合等。蛋白分析技术包括但不限于免疫检测、质谱法、以上的组合等。

[0058] 本文分别还以SEQ ID NO:1-2584和4595-7278提供了甲基杆菌分离株NLS0017中存在的蛋白和基因序列。根据出于专利程序目的的国际承认微生物保藏的布达佩斯条约的条款,甲基杆菌分离株NLS0017已在美国农业部农业研究局国家农业利用研究中心的农业研究培养物保藏中心(NRRL)(1815 North University Street,Peoria,Illinois 61604 U.S.A.)保藏为NRRL B-50931。SEQ ID NO:1-9188的鉴定描述于共同转让的国际专利申请PCT/US2014/068611中,将其通过引用整体并入本文。

[0059] 表1中公开了本文提供的多种甲基杆菌属物种分离株。

[0060] 表1. 甲基杆菌属物种分离株

NLS	禾谷镰刀菌的抑制	来源	USDA ARS NRRL No. ¹
[0061] NLS0017	- ²	获自美国密苏里州圣路易斯市 (Saint Louis County, Missouri, USA) 生长的胡椒薄荷植物	NRRL B-50931
NLS0020	-	获自美国密苏里州圣路易斯市生长的卡罗来纳茄 (horse nettle) 植物	NRRL B-50930
NLS0037	-	获自美国密苏里州圣路易斯市生长的	NRRL B-50941
NLS	禾谷镰刀菌的抑制	来源	USDA ARS NRRL No. ¹
		番茄植物 (“冠军 (Champion)” 品种)	
[0062] NLS0066	+	获自玉米杂种 “MC534” (Masters Choice 3010 State Route 146 East Anna, IL 62906)	NRRL B-50940
NLS0089	+	获自美国密苏里州圣路易斯市生长的西兰花	NRRL B-50933

[0063] ¹根据出于专利程序目的的国际承认微生物保藏的布达佩斯条约的条款,美国农业部农业研究局国家农业利用研究中心的农业研究菌种保藏中心 (NRRL) (1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604 U.S.A.) 保藏的菌株的保藏号。根据37 CFR §1.808 (b), 当授予来自该专利申请的任何专利专利权时, 赋予保藏者的关于保藏材料的公众可获得性的所有限制将不可撤回地撤销。

[0064] ²与单独的NLS0066相比, 在组合的NLS0066+NLS0017中可以增加NLS0066的活性。

[0065] 本文还提供了控制植物致病真菌的方法, 其包括向植物或植物部分施用一定量的以上提及的任何包含本文提供的甲基杆菌的组合物, 相对于未施用所述组合物的对照植物、植物部分或由其获得的植物, 所述量在所述植物、植物部分或由其获得的植物中提供植物致病真菌感染的抑制。在某些实施方案中, 相对于对照植物、植物部分或由其获得的植物的感染, 施用所述组合物在所述植物、植物部分或由其衍生的植物中提供植物致病真菌感染至少约40%、至少约50%、至少约75%、至少约85%、或至少约95%的抑制。在某些实施方案中, 所述植物部分选自叶、茎、花、根、块茎和种子。在某些实施方案中, 所述方法还包括下述步骤: 从所述植物或植物部分收获选自叶、茎、花、根、块茎或种子的至少一种植物部分。在以上提及的任何方法的某些实施方案中, 相对于获自对照植物、植物部分或由其获得的植物的植物部分, 所述植物部分中的真菌毒素水平降低至少50%、至少75%、至少85%或至少95%。在以上提及的任何方法的某些实施方案中, 所述方法还包括从所述植物或植物部分获得经加工的食品或饲料组合物。在以上提及的方法的某些实施方案中, 相对于获自对照植物、植物部分或由其获得的植物的经加工的食品或饲料组合物, 所述经加工的食品或

饲料组合物中的真菌毒素水平降低至少50%、至少75%、至少85%或至少95%。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,所述组合物包含含有至少一种在NLS0066中存在但在不抑制植物禾谷镰刀菌感染的一种或多种甲基杆菌分离株NLS0020和/或NLS0037中不存在的多态DNA元件、直向同源基因或基因的甲基杆菌。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,所述组合物包含甲基杆菌分离株NLS0066、NLS0089、NLS0066和NLS0017的组合、或者以上的衍生物。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,所述组合物还包含甲基杆菌菌株NLS0020或其衍生物。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,所述组合物包含甲基杆菌属物种,所述甲基杆菌属物种含有至少一种与选自SEQ ID NO:7279-9187和9188的至少一种基因直向同源或者与其具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性的基因。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,所述组合物包含甲基杆菌属物种,所述甲基杆菌属物种含有至少一种编码与选自SEQ ID NO:2585-4593和4594的至少一种蛋白直向同源或者与其具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性的蛋白的基因。

[0066] 还提供了制备可用于控制植物致病真菌的组合物的方法,其包括将抑制植物致病真菌生长的甲基杆菌与农业上可接受的赋形剂和/或与农业上可接受的佐剂组合。在所述方法的某些实施方案中,甲基杆菌属物种选自:噬胺甲基杆菌、扭脱甲基杆菌、藤泽氏甲基杆菌、嗜中温甲基杆菌、耐辐射甲基杆菌、罗得西亚甲基杆菌、结瘤甲基杆菌、*M. phyllosphaerae*、硫氰酸盐甲基杆菌以及稻甲基杆菌。在所述方法的某些实施方案中,甲基杆菌不是耐辐射甲基杆菌或稻甲基杆菌。在所述方法的某些实施方案中,甲基杆菌含有至少一种在NLS0066中存在但在不抑制植物禾谷镰刀菌感染的一种或多种甲基杆菌分离株NLS0020和/或NLS0037中不存在的多态DNA元件。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,所述组合物包含甲基杆菌属物种,所述甲基杆菌属物种含有至少一种与选自SEQ ID NO:7279-9187和9188的至少一种基因直向同源或者与其具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性的基因。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,所述组合物包含甲基杆菌属物种,所述甲基杆菌属物种含有至少一种编码与选自SEQ ID NO:2585-4593和4594的至少一种蛋白直向同源或者与其具有至少95%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列同一性的蛋白的基因。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,所述组合物包含甲基杆菌分离株NLS0066、NLS0089、NLS0066和NLS0017的组合、或者以上的衍生物。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,所述组合物还包含甲基杆菌菌株NLS0020或其衍生物。在所述方法的某些实施方案中,当暴露于植物致病真菌时,与缺乏抑制所述植物致病真菌的甲基杆菌的对照组合物相比,所述组合物提供植物致病真菌生长至少约25%、至少约50%或至少约75%的抑制。在所述方法的某些实施方案中,植物致病真菌选自:链格孢属物种、壳二孢属物种、曲霉菌属物种、双极霉属物种、葡萄孢属物种、盘霜霉属物种、尾孢属物种、旋孢腔菌属物种、刺盘孢属物种、色二孢属物种、白粉菌属物种、突脐蠕孢属物种、镰刀菌属物种、禾顶囊壳物种、壳球孢属物种、稻瘟病菌物种、丛赤壳属物种、霜霉属物种、层锈菌属物种、瓶霉属物种、茎点霉属物种、瘤梗孢属物种、疫霉属物种、单轴霉属物种、柄锈菌属物种、叉丝单囊壳属物种、核腔菌属物种、梨孢属物种、腐霉属物种、丝核菌属物种、小核菌属物种、核盘菌属物种、壳针孢属物种、壳多孢属物种、根串珠霉属物种、钩丝壳属物种、黑粉菌属物种、黑星菌属物种以及轮枝孢属物种。在所述方法的某些实施方案中,镰刀

菌属物种选自禾谷镰刀菌、轮枝镰刀菌、尖孢镰刀菌和茄病镰刀菌。在所述方法的某些实施方案中,甲基杆菌附着于固体物质上。在所述方法的某些实施方案中,将附着于固体物质上的甲基杆菌与液体组合以形成胶体。在所述方法的某些实施方案中,胶体是凝胶。在所述方法的某些实施方案中,通过在存在固体物质的情况下培养甲基杆菌来提供附着于固体物质上的甲基杆菌。在所述方法的某些实施方案中,所述组合物包含乳状液。在所述方法的某些实施方案中,通过在乳状液中培养甲基杆菌来提供甲基杆菌。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,植物致病真菌是镰刀菌属物种和/或植物是谷类植物。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,植物致病真菌是镰刀菌属物种,并且植物是选自下述植物的谷类植物:水稻、小麦、玉米、大麦、粟、高粱、燕麦和黑麦。在以上提及的任何方法的某些实施方案中,植物致病真菌是禾谷镰刀菌,并且植物是选自下述植物的谷类植物:水稻、小麦、玉米、大麦、粟、高粱、燕麦和黑麦。在以上提及的任何实施方案中,被抑制的植物致病真菌可以为其无性形式、为其有性形式或者为其无性形式和有性形式这两种形式。

[0067] 已经发现,相对于在单独的液体培养基中培养甲基杆菌的方法,在包含液相和固体物质的双相培养基中培养甲基杆菌的方法显著增加所得到的甲基杆菌产量。在某些实施方案中,所述方法可以包括在提供甲基杆菌生长的条件下,使甲基杆菌在含有可以通过搅拌悬浮于液体中的颗粒状固体物质的液体培养基中生长。在使用颗粒状固体物质的某些实施方案中,至少基本上所有固相均可通过搅拌而悬浮于液相中。此类颗粒状固体物质可以包含长度或直径为约1毫米或更小的材料。在某些实施方案中,搅拌的程度足以提供颗粒状固体物质在液相中的均匀分布和/或培养通气的最优水平。但是,在本文提供的其它实施方案中,至少基本上所有固相未悬浮于液相中,或者部分固相悬浮于液相中且部分固相未悬浮于液相中。在固相未悬浮于液相中的某些双相培养基中,可以使用非颗粒状固体物质。此类非颗粒状固体物质包括但不限于长度或直径大于约1毫米的材料。此类颗粒状和非颗粒状固体物质还包括但不限于多孔材料、纤维材料或者为甲基杆菌附着生长提供增加的表面积以其它方式构造的材料。部分固相悬浮于液相中并且部分固相未悬浮于液相中的双相培养基可以包含颗粒状和非颗粒状固体物质的混合物。用于以上提及的任何双相培养基的此类颗粒状和非颗粒状固体物质包括但不限于多孔材料、纤维材料或者为甲基杆菌附着生长提供增加的表面积以其它方式构造的材料。在某些实施方案中,培养基包含由固相和液相形成的胶体。包含固体和液体的胶体可以预先形成并添加至液体培养基中,或者可以在包含固体和液体的培养基中形成。包含固体和液体的胶体可以通过使某些固体物质经过化学和/或热量改变而形成。在某些实施方案中,胶体是凝胶。在某些实施方案中,培养基中的液相是乳状液。在某些实施方案中,乳状液包含水性液体和在水性液体中不可混溶或仅部分可混溶的液体。在水中不可混溶或仅部分可混溶的液体包括但不限于下述任何液体:(1) 25℃时,在水中的混溶性等于或小于戊醇、己醇或庚醇的混溶性的液体;(2) 包含醇、醛、酮、脂肪酸、磷脂或以上的任何组合的液体;(3) 选自含有至少5个碳的脂肪醇和甾醇的醇类;(4) 动物油、微生物油、合成油、植物油或者以上的组合;和/或(5) 选自下述的植物油:玉米、大豆、棉花、花生、向日葵、橄榄、亚麻、椰子、棕榈、油菜籽、芝麻籽、红花以及以上的组合。在某些实施方案中,不可混溶或部分不可混溶的液体可以包含以质量计至少约0.02%至约20%的液相。在某些实施方案中,所述方法可以包括获得包含液体、固体和甲基杆菌的双相培养基,并在提供甲基杆菌生长的条件下孵育所述培养物。可以通过多种方法获得包

含液体、固体和甲基杆菌的双相培养基,所述方法包括但不限于下述任何方法:(a)在包含液体和固体物质的双相培养基中接种甲基杆菌;(b)在固体物质上接种甲基杆菌,然后将包含甲基杆菌的固体物质引入液体培养基中;(c)在固体物质上接种甲基杆菌,在所述固体物质上孵育甲基杆菌,然后将包含甲基杆菌的固体物质引入液体培养基中;或者(d) (a)、(b)或(c)的任何组合。共同转让的于2013年5月31日提交的美国专利申请第13/907,161号(将其通过引用整体并入本文)和共同转让的于2013年5月31日提交的国际专利申请PCT/US13/43722(将其通过引用整体并入本文)中公开了在包含液体和固体的双相培养基中培养甲基杆菌的方法和组合物。

[0068] 已经发现,相对于在单独的液体培养基中培养甲基杆菌的方法,在包含乳状液的培养基中培养甲基杆菌的方法显著增加所得到的甲基杆菌产量。在某些实施方案中,制备本文提供的组合物的方法可以包括在提供甲基杆菌生长的条件下使甲基杆菌在乳状液中生长。可以通过多种方法获得包含乳状液和甲基杆菌的培养基,所述方法包括但不限于下述任何方法:(a)在包含乳状液的培养基中接种甲基杆菌;(b)在水性液体中接种甲基杆菌,引入非水性液体并混合以形成乳状液;(c)在水性液体中接种甲基杆菌,引入非水性液体并混合以形成乳状液;或者(d) (a)、(b)或(c)的任何组合。在某些实施方案中,乳状液包含水性液体和在水性液体中不混溶或仅部分混溶的液体。在水中不混溶或仅部分混溶的液体包括但不限于下述任何液体:(1) 25°C时,在水中的混溶性等于或小于正戊醇、正己醇或正庚醇的混溶性的液体;(2) 包含醇、醛、酮、脂肪酸、磷脂或者以上的组合的液体;(3) 选自含有至少5、6或7个碳的脂肪醇和甾醇的醇类;(4) 动物油、微生物油、合成油、植物油或以上的组合;和/或(5) 选自下述的植物油:玉米、大豆、棉花、花生、向日葵、橄榄、亚麻、椰子、棕榈、油菜籽、芝麻籽、红花以及以上的组合。在某些实施方案中,不可混溶的或部分不可混溶的非水性液体可以包含以质量计至少约0.02%至约20%的乳状液。在某些实施方案中,不可混溶的或部分不可混溶的非水性液体可以包含以重量计至少约下述任何量的乳状液:约0.05%、0.1%、0.5%或1%至约3%、5%、10%或20%。共同转让的于2013年5月31日提交的美国临时专利申请第No. 61/829,987号和共同转让的于2014年5月30日提交的PCT申请第PCT/US14/40218号中公开了在包含乳状液的培养基中培养甲基杆菌的方法和组合物,将所述两个专利申请通过引用整体并入本文。

[0069] 在某些实施方案中,除了甲基杆菌之外,包含抑制植物致病真菌的甲基杆菌的发酵液、发酵液产品或组合物还可以包含预先确定身份的一种或多种引入的微生物。可以添加的其它微生物包括但不限于生物杀虫性微生物或当施用于植物或植物部分时提供一些其它益处的微生物。因此,生物杀虫性微生物或具有其它益处的微生物包括但不限于多种芽孢杆菌属(*Bacillus*)物种、假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种、盾壳霉属(*Coniothyrium*)物种、泛菌属(*Pantoea*)物种、链霉菌属(*Streptomyces*)物种和木霉属(*Trichoderma*)物种。微生物生物杀虫剂可以是细菌、真菌、病毒或原生动物。具体地,可用的生物杀虫性微生物包括多种枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilis*)、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、绿木霉(*Trichoderma virens*)、以及利迪链霉菌(*Streptomyces lydicus*)菌株。添加的其它微生物可以被基因改造或者可以是可作为纯培养物获得的分离株。在某些实施方案中,预期可以以孢子的形式在发酵液、发酵液产品或组

合物中提供所述细菌或真菌微生物。

[0070] 在某些实施方案中,由价廉且容易获得的组分制备液体培养基,所述组分包括但不限于:无机盐,如磷酸钾、硫酸镁等;碳源,如甘油、甲醇、谷氨酸、天冬氨酸、琥珀酸等;以及氨基酸混合物,如蛋白胨、胰蛋白胨等。可以使用的液体培养基的实例包括但不限于:铵矿物盐(AMS)培养基(Whittenbury等人,1970)、Vogel-Bonner(VB)基础培养基(Vogel和Bonner,1956)和LB培养基(“Luria-Bertani培养基”)。

[0071] 一般而言,所述方法和组合物中使用的为甲基杆菌提供有效生长的固体物质可以是在水或水溶液中不可溶或仅部分可溶的任何合适的固体物质。当在液体培养基中提供固体物质时,相对于抑制植物致病真菌的甲基杆菌,此类合适的固体物质还是非杀菌性的或非抑菌性的。在某些实施方案中,此类合适的固体物质也是容易以无菌形式获得或使其无菌的固体物质。可以通过提供去除污染性微生物的任何方法对本文使用的固体物质进行灭菌,因此所述方法包括但不限于诸如高压灭菌、辐射、化学处理以及以上的组合的方法。这些固体物质包括动物、植物、微生物、真菌或矿物来源的物质,人造物质或者以上的组合。在某些实施方案中,固体物质是无生命的固体物质。动物、植物、微生物或真菌来源的无生命的固体物质可以获自不能生存(即不再存活)或已成为不能生存的动物、植物、微生物或真菌。因此当已经去除之前相关的硅藻或以其它方式使其不再存活时,硅藻壳是无生命的固体物质。由于硅藻壳是无生命的固体物质,因此其不被视为是光合生物体或光合微生物。在某些实施方案中,固体物质包括但不限于:砂、淤泥、土壤、粘土、灰、炭、硅藻土以及其它类似的矿物质、毛玻璃或玻璃球、磨砂陶瓷材料、陶瓷球、膨润土、高岭土、滑石、珍珠岩、云母、蛭石、硅酸盐、石英粉、蒙脱石、以及以上的组合。在某些实施方案中,固体物质可以是聚合物或聚合物球。可以用作固体物质的聚合物包括但不限于各种多糖,如在水或水溶液中不可溶或仅部分可溶的纤维素聚合物和几丁质聚合物、琼脂(即半乳聚糖)、及其组合。在某些实施方案中,固体物质可以是不可溶或仅部分可溶的盐晶体。可以使用的盐晶体包括但不限于不可溶或仅部分可溶的碳酸盐、铬酸盐、亚硫酸盐、磷酸盐、氢氧化物、氧化物和硫化物。在某些实施方案中,固体物质可以是微生物细胞、真菌细胞、微生物孢子或真菌孢子。在某些实施方案中,固体物质可以是微生物细胞或微生物孢子,其中所述微生物细胞或微生物孢子不是光合微生物。在某些实施方案中,微生物细胞或微生物孢子不是光合微生物,其中光合微生物选自:藻类、蓝细菌、硅藻、布朗葡萄藻(*Botryococcus braunii*)、小球藻(*Chlorella*)、杜氏盐藻(*Dunaliella tertiolecta*)、江蓠(*Gracilaria*)、颗石藻(*Pleurochrysis carterae*)、马尾藻(*Sargassum*)以及石莼(*Ulva*)。在其它实施方案中,固体物质可以是非活性(即不再存活)的微生物细胞、真菌细胞、微生物孢子或真菌孢子。在其它实施方案中,固体物质可以是休眠(即存活但不积极分裂)的微生物细胞、真菌细胞、微生物孢子或真菌孢子。在其它实施方案中,固体物质可以是微生物来源的细胞碎片。在其它实施方案中,固体物质可以是来自植物任何部分的颗粒状物质。可以用于获得固体物质的植物部分包括但不限于:穗轴(cob)、秕、外壳、叶、根、花、茎、树皮、种子、以及以上的组合。还可以使用获自经加工的植物部分的产品,其包括但不限于:甘蔗渣、麦麸、大豆渣、碎籽饼、秸秆等。可将此类植物部分、经加工的植物和/或经加工的植物部分磨碎,以获得可以使用的颗粒形式的固体材料。在某些实施方案中,可以使用木材或木制品,其包括但不限于木浆、锯屑、刨花等。在某些实施方案中,固体物质可以是来自动物的颗粒状物质,其包括但不

限于：骨粉、明胶、研磨的或粉状的壳、毛发、浸离的兽皮等。

[0072] 在某些实施方案中，以颗粒形式提供固体物质，以实现固体物质在培养基中的分布。在某些实施方案中，固体物质由平均长度或平均直径为约2微米至约1000微米的颗粒组成。在某些实施方案中，固体物质由平均长度或平均直径为约1微米至约1000微米的颗粒组成。在某些实施方案中，固体物质是平均长度或平均直径为约1、2、4、10、20或40微米至约100、200、500、750或1000微米的任何数值的颗粒。用于本文提供的方法和组合物中的颗粒的期望特征包括合适的可湿性，以使颗粒可以通过搅拌悬浮于整个培养基中。

[0073] 在某些实施方案中，培养基中的固体物质作为胶体提供，其中连续相是液体并且分散相是固体。可以用于形成用于抑制植物致病真菌的甲基杆菌生长的液体培养基中的胶体的合适的固体包括但不限于被称为亲水胶体 (hydrocolloid) 的多种固体。用于本文提供的培养基、方法和组合物的此类亲水胶体可以是植物、动物、微生物或合成来源的亲水聚合物。用于所述方法的亲水胶体聚合物可以包含多个羟基和/或可以是聚合电解质。用于本文提供的组合物和方法的亲水胶体聚合物包括但不限于：琼脂、海藻酸盐、阿拉伯木聚糖、角叉菜胶、羧甲基纤维素、纤维素、卡德兰胶、明胶、胶凝糖、 β -葡聚糖、瓜尔胶、阿拉伯树胶、槐豆胶、果胶、淀粉、黄原胶、以及以上的混合物。在某些实施方案中，本文提供的培养基、方法和组合物中使用的胶体可以包含亲水胶体聚合物和一种或多种蛋白。

[0074] 在某些实施方案中，固体物质可以是提供抑制植物致病真菌的甲基杆菌在固体物质上附着生长的固体物质。附着于固体物质上的抑制植物致病真菌的甲基杆菌通过简单地用生长培养基洗涤含有附着的抑制植物致病真菌的甲基杆菌的固体物质不能基本上除去，而非附着的甲基杆菌可以通过用液体生长培养基洗涤基本上除去。在该背景下，“基本上除去”意为当用三倍体积的液体生长培养基洗涤时固体物质时，至少约30%、40%、50%、60%、70%或80%存在的甲基杆菌被除去。此类洗涤可以通过多种方法实现，所述方法包括但不限于从洗涤的固相倾析液体或者使液体通过过滤器上的固相，以允许液体中的细菌流动穿过。在某些实施方案中，与固体结合的附着的抑制植物致病真菌的甲基杆菌可以包括与固体直接相连的甲基杆菌和/或与固体物质间接相连的甲基杆菌。与固体物质间接相连的甲基杆菌包括但不限于：与另一甲基杆菌相连或者与连接至固体物质的另一微生物相连的甲基杆菌、通过连接至与固体物质相连的另一物质上而连接至固体物质的甲基杆菌等。在某些实施方案中，发酵液、发酵液产品或组合物中至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的甲基杆菌是附着于固体物质上的甲基杆菌。在某些实施方案中，附着的抑制植物致病真菌的甲基杆菌可以以下述密度存在于发酵液、发酵液产品或组合物中的固体物质的表面：至少约1个甲基杆菌/20平方微米、至少约1个甲基杆菌/10平方微米、至少约3个甲基杆菌/10平方微米、至少约1个甲基杆菌/5平方微米、至少约1个甲基杆菌/2平方微米或者至少约1个甲基杆菌/平方微米。在某些实施方案中，附着的抑制植物致病真菌的甲基杆菌可以以下述密度存在于发酵液、发酵液产品或组合物中的固体物质的表面：至少约1个甲基杆菌/20平方微米至约1个甲基杆菌/平方微米、至少约1个甲基杆菌/10平方微米至约1个甲基杆菌/平方微米、至少约1个甲基杆菌/10平方微米至约1个甲基杆菌/平方微米、至少约1个甲基杆菌/5平方微米至约1个甲基杆菌/平方微米或者至少约1个甲基杆菌/2平方微米至约1个甲基杆菌/平方微米。在某些实施方案中，附着的抑制植物致病真菌的甲基杆菌可以以下述密度存在于发酵液、发酵液产品或

组合物中的固体物质的表面：至少约1个甲基杆菌/20平方微米至约1个甲基杆菌/2平方微米、至少约1个甲基杆菌/10平方微米至约1个甲基杆菌/2平方微米、至少约1个甲基杆菌/10平方微米至约1个甲基杆菌/2平方微米或者至少约1个甲基杆菌/5平方微米至约1个甲基杆菌/2平方微米。本文提供的双相发酵液可以包含含有非附着的甲基杆菌的液相。在某些实施方案中，液相中非附着的甲基杆菌的滴度可以小于约100,000、10,000或1,000CFU/ml。

[0075] 本文提供的发酵产品和组合物，其包含下述抑制植物致病真菌的甲基杆菌的单培养物或共培养物：滴度大于约 5×10^7 个克隆形成单位/毫升、滴度大于约 1×10^8 个克隆形成单位/毫升、滴度大于约 5×10^8 个克隆形成单位/毫升、滴度大于约 1×10^9 个克隆形成单位/毫升、滴度大于约 1×10^{10} 个克隆形成单位/毫升、滴度为至少约 3×10^{10} 个克隆形成单位/毫升。在某些实施方案中，本文提供的发酵产品和组合物可以包含下述抑制植物致病真菌的甲基杆菌：滴度为至少约 5×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 个克隆形成单位/毫升至至少约 3×10^{10} 个克隆形成单位/毫升，至少约 5×10^8 个克隆形成单位/毫升至至少约 4×10^{10} 个克隆形成单位/毫升或者至少约 5×10^8 个克隆形成单位/毫升至至少约 6×10^{10} 个克隆形成单位/毫升。在某些实施方案中，本文提供的发酵产品和组合物可以包含下述抑制植物致病真菌的甲基杆菌：滴度为至少约 1×10^9 个克隆形成单位/毫升至至少约 3×10^{10} 个克隆形成单位/毫升、至少约 1×10^9 个克隆形成单位/毫升至至少约 4×10^{10} 个克隆形成单位/毫升或者至少约 1×10^9 个克隆形成单位/毫升至至少约 6×10^{10} 个克隆形成单位/毫升。在某些实施方案中，本文提供的发酵产品和组合物将包含下述抑制植物致病真菌的甲基杆菌：滴度为至少约 1×10^{10} 个克隆形成单位/毫升至至少约 3×10^{10} 个克隆形成单位/毫升、至少约 1×10^{10} 个克隆形成单位/毫升至至少约 4×10^{10} 个克隆形成单位/毫升或者至少约 1×10^{10} 个克隆形成单位/毫升至至少约 6×10^{10} 个克隆形成单位/毫升。在某些实施方案中，本文提供的发酵产品和组合物将包含下述抑制植物致病真菌的甲基杆菌：滴度为至少约 3×10^{10} 个克隆形成单位/毫升至至少约 4×10^{10} 个克隆形成单位/毫升或者至少约 3×10^{10} 个克隆形成单位/毫升至至少约 6×10^{10} 个克隆形成单位/毫升。在以上提及的任何发酵产品或组合物中，指示的浓度可以是真菌抑制浓度。在以上提及的任何发酵产品或组合物中，发酵产品或组合物可以基本不含污染性微生物，可以包含附着于材料的甲基杆菌和/或与材料相结合的甲基杆菌，而在自然状态下甲基杆菌并不附着于该材料和/或与该材料相结合，或者它们的组合。

[0076] 本文提供的发酵产品和组合物，其包含下述抑制植物致病真菌的甲基杆菌：滴度大于约 5×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 个克隆形成单位/克，滴度大于约 1×10^9 个克隆形成单位/克，滴度大于约 1×10^{10} 个克隆形成单位/克，滴度为至少约 3×10^{10} 个克隆形成单位/克。在某些实施方案中，本文提供的发酵产品和组合物可以包含下述抑制植物致病真菌的甲基杆菌：滴度为至少约 5×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 个克隆形成单位/克至至少约 3×10^{10} 个克隆形成单位/克，至少约 5×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 个克隆形成单位/克至至少约 4×10^{10} 个克隆形成单位/克或者至少约 5×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 个克隆形成单位/克至至少约 6×10^{10} 个克隆形成单位/克。在某些实施方案中，本文提供的发酵产品和组合物可以包含下述抑制植物致病真菌的甲基杆菌：滴度为至少约 1×10^9 个克隆形成单位/克至至少约 3×10^{10} 个克隆形成单位/克、至少约 1×10^9 个克隆形成单位/克至至少约 4×10^{10} 个克隆形成单位/克或者至少约 1×10^9 个克隆形成单位/克至至少约 6×10^{10} 个克隆形成单位/克。在某些实施方案中，本文提供的发酵产品和组合物将包含下述抑制植物致病真菌的甲基杆菌：滴度为至少约 1×10^{10} 个克隆形成单位/克至至少约

3×10^{10} 个克隆形成单位/克、至少约 1×10^{10} 个克隆形成单位/克至至少约 4×10^{10} 个克隆形成单位/克或者至少约 1×10^{10} 个克隆形成单位/克至至少约 6×10^{10} 个克隆形成单位/克。在某些实施方案中,本文提供的发酵产品和组合物将包含下述抑制植物致病真菌的甲基杆菌滴度为至少约 3×10^{10} 个克隆形成单位/克至至少约 4×10^{10} 个克隆形成单位/克或者至少约 3×10^{10} 个克隆形成单位/克至至少约 6×10^{10} 、 1×10^{13} 或 5×10^{13} 个克隆形成单位/克。在以上提及的任何发酵产品或组合物中,所述发酵物或组合物可以包含附着于固体物质上的甲基杆菌的单培养物或共培养物。在以上提及的任何发酵产品或组合物中,指示的浓度可以是真菌抑制浓度。在以上提及的任何发酵产品或组合物中,指示的浓度可以是真菌抑制浓度。在以上提及的任何发酵产品或组合物中,发酵产品或组合物可以基本不含污染性微生物,可以包含附着于物质的甲基杆菌和/或与物质相结合的甲基杆菌,而在自然状态下甲基杆菌并不附着于该物质和/或与该物质相结合,或者它们的组合。

[0077] 具有附着的抑制植物致病真菌的甲基杆菌的固体物质可以作为发酵产品获得,其可以用于制备用于处理植物或植物部分以抑制植物致病真菌感染的多种组合物。可选地,本文提供的包含具有抑制植物致病真菌的甲基杆菌或附着抑制植物致病真菌的甲基杆菌的固体物质的组合物可以用于处理植物或植物部分。因此,提供了植物、植物部分,特别是植物种子,其至少部分已涂有含有抑制植物致病真菌的甲基杆菌的发酵液产品或组合物。还提供了经加工的植物产品,其包含具有抑制植物致病真菌的甲基杆菌或附着抑制植物致病真菌的甲基杆菌的发酵液产品或组合物。具有附着的抑制植物致病真菌的甲基杆菌的固体物质可以用于制备在处理植物种子中特别有用的多种组合物。因此,提供了至少部分已涂有发酵液产品或组合物的种子。还提供了经加工的种子产品,其包括但不限于包含本文提供的发酵液产品或组合物的膳食、面粉、饲料和片状物(flake)。在某些实施方案中,经加工的植物产品将是不可再生的(即将不能发育为植物)。在某些实施方案中,在发酵产品或组合物中使用的固体物质包含固体物质以及相结合的或附着的抑制植物致病真菌的甲基杆菌,所述甲基杆菌可以通过对比经处理的和未处理的植物、植物部分、植物种子或以上的经加工的产品而容易地鉴别,所述发酵产物或组合物至少部分地涂布植物、植物部分或植物种子或者被包含于经加工的植物、植物部分或种子产品中。可用于处理植物或植物部分的组合物(包含抑制植物致病真菌的甲基杆菌或具有附着的抑制植物致病真菌的甲基杆菌的固体物质、含有抑制植物致病真菌的甲基杆菌的乳状液或者以上的组合)还可以包含农业上可接受的佐剂或农业上可接受的赋形剂。农业上可接受的佐剂或农业上可接受的赋形剂通常是,当暴露于植物或植物部分时,不会造成不适当的植物毒性或其它不良作用的成分。在某些实施方案中,固体物质自身可以是农业上可接受的佐剂或农业上可接受的赋形剂,只要它对于甲基杆菌不是杀菌性的或抑菌性的。在其它实施方案中,组合物还包含至少一种农业上可接受的佐剂或农业上可接受的赋形剂。以上提及的任一种组合物还可以进一步包含杀虫剂。用于所述组合物的杀虫剂包括但不限于杀昆虫剂、杀真菌剂、杀线虫剂和杀细菌剂。在某些实施方案中,用于所述组合物的杀虫剂是基本上不会抑制甲基杆菌生长的杀虫剂。由于甲基杆菌是革兰氏阴性菌,因此用于所述组合物中的合适的杀细菌剂可以包括但不限于对革兰氏阳性菌显示活性,而对革兰氏阴性菌未显示活性的杀细菌剂。本文提供的组合物还可以包含基本上不会抑制甲基杆菌生长的抑菌剂。适用于本文提供的组合物的抑菌剂包括但不限于对革兰氏阳性菌显示活性,而对革兰氏阴性菌未显示活性的那些抑菌

剂。以上提及的任何组合物还可以是基本上干燥的产品(即含有约5%或更低的含水量)、所述组合物与乳状液或者悬浮液的混合物。

[0078] 用于包含抑制植物致病真菌的甲基杆菌的组合物、包含抑制植物致病真菌的甲基杆菌的乳状液或者以上的组合的农业上可接受的佐剂包括但不限于增强产品效力的组分和/或增强产品施用容易度的产品。增强产品效力的佐剂可以包括:促进组合物在植物部分附着和扩散的各种润湿剂/铺展剂(spreader)、促进附着于植物部分的粘着剂、渗透剂、增量剂以及增加喷洒的组合物密度和干燥时间的保湿剂。用于所述组合物的润湿剂/铺展剂可以包括但不限于:非离子型表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂、有机硅酸盐表面活性剂和/或酸化的表面活性剂。用于所述组合物的粘着剂可以包括但不限于基于乳胶的物质、萜烯(terpene)/松脂二烯(pinolene)和基于吡咯烷酮的物质。渗透剂可以包含矿物油、植物油、酯化的植物油、有机硅酸盐表面活性剂以及酸化的表面活性剂。用于所述组合物的增量剂可以包括但不限于硫酸铵或基于薄荷烯的物质。用于所述组合物的保湿剂可以包括但不限于甘油、丙二醇和二乙二醇。改善产品施用容易度的佐剂包括但不限于:酸化剂/缓冲剂、防泡剂/消泡剂、相容性试剂(compatibility agent)、漂移减少剂(drift-reducing agent)、染料以及水调节剂(water conditioner)。用于所述组合物的防泡剂/消泡剂可以包括但不限于聚二甲基硅氧烷。用于所述组合物的相容性试剂可以包括但不限于硫酸铵。用于所述组合物的漂移减少剂可以包括但不限于聚丙烯酰胺和多糖。用于所述组合物的水调节剂可以包括但不限于硫酸铵。

[0079] 本文还提供了用包含抑制植物致病真菌的甲基杆菌的发酵液、发酵液产品和组合物或者以上的组合处理植物和/或植物部分的方法。经处理的植物和由其获得的经处理的植物部分包括但不限于:玉米、芸苔属(*Brassica*)物种(例如甘蓝型油菜(*B. napus*)、白菜型油菜(*B. rapa*)、芥菜型油菜(*B. juncea*))、苜蓿、水稻、黑麦、高粱、粟(例如珍珠粟(*Pennisetum glaucum*))、黍(*Panicum miliaceum*)、谷子(*Setaria italica*)、龙爪稷(*Eleusine coracana*)、向日葵、红花、大豆、烟草、马铃薯、花生、棉花、番薯(*Ipomoea batatas*)、木薯、咖啡、椰子、菠萝、柑橘树、可可、茶、香蕉、鳄梨、无花果、番石榴、芒果、橄榄、木瓜、腰果、夏威夷果、扁桃、甜菜、甘蔗、燕麦、大麦、番茄、莴苣、绿豆、利马豆、豌豆、葫芦(如黄瓜、哈密瓜和甜瓜)、观赏植物以及针叶树。处理的植物部分包括但不限于:叶、茎、花、根、种子、果实、块茎、胚芽鞘等。可以处理的观赏植物和植物部分包括但不限于:杜鹃、绣球花、木槿、玫瑰、郁金香、水仙、矮牵牛、香石竹、一品红以及菊花。可以处理的松类植物和植物部分包括但不限于:松树,如火炬松、湿地松、西黄松、黑松和辐射松;花旗松;西部铁杉;西加(*Sitka*)云杉;红杉;冷杉(true fir),如银冷杉和香脂冷杉;以及雪松,如西部红雪松和阿拉斯加黄雪松。可以处理的草坪用草植物和植物部分包括但不限于:一年生蓝草、一年生黑麦草、加拿大蓝草、羊茅草、剪股颖、冰草、肯塔基蓝草、野茅、黑麦草、小糠草、百慕大草、奥古斯丁草以及结缕草。在某些实施方案中,处理的植物或植物部分是选自下述植物或植物部分的谷类植物或植物部分:水稻、小麦、玉米、大麦、粟、高粱、燕麦和黑麦。可以用本文提供的发酵液、发酵液产品、发酵产品和/或组合物处理以上提及的任何植物的种子或其它繁殖体。

[0080] 在某些实施方案中,通过施用作为喷雾剂的包含抑制植物致病真菌的甲基杆菌的发酵液、发酵液产品、发酵产品和组合物或者以上的组合来处理植物和/或植物部分。此类

喷雾施用包括但不限于处理单一植物部分或植物部分的任何组合。可以用将发酵液、发酵液产品、发酵产品和组合物分布至植物和/或植物部分的任何装置来实现喷洒。可用的喷雾装置包括喷杆式喷雾器、手动喷雾器或背包式喷雾器、作物喷粉器(crop duster)(即飞机喷雾)等。也可以使用提供发酵液、发酵液产品、发酵产品和组合物在近轴表面和/或远轴表面中的一项或两项施用的喷洒装置和或方法。本文还提供了至少部分地涂有任何包含其上附着抑制植物致病真菌的甲基杆菌的固体物质的双相发酵液、发酵液产品、发酵产品或组合物的植物和/或植物部分。本文还提供了包含其上附着抑制植物致病真菌的甲基杆菌的固体物质的经加工的植物产品。

[0081] 在某些实施方案中,通过将种子暴露于包含抑制植物致病真菌的甲基杆菌的发酵液、发酵液产品、发酵产品和组合物或者以上的组合而对种子进行处理。可以通过包括但不限于浸渗、涂布、喷洒等的方法用本文提供的发酵液、发酵液产品和组合物对种子进行处理。种子处理可以通过连续式种子处理器和/或分批式种子处理器来实现。在某些实施方案中,可以通过下述制备涂布的种子:用包含发酵液、发酵液产品或组合物的涂布组合物使种子浆化,并将得到的产品风干,所述发酵液、发酵液产品或组合物包含具有抑制植物致病真菌的甲基杆菌的固体物质。风干可以在对种子或甲基杆菌无害的任何温度下完成,但其通常不高于30℃。包含固体物质和抑制植物致病真菌的甲基杆菌的涂层的比例包括但不限于下述范围:以种子的重量计,0.1至25%;以种子的重量计,0.5至5%;以及以种子的重量计,0.5至2.5%。在某些实施方案中,用于种子涂布或处理的固体物质具有附着于其上的抑制植物致病真菌的甲基杆菌。在某些实施方案中,用于种子涂布或处理的固体物质将与抑制植物致病真菌的甲基杆菌相结合,并且是通过本文提供的方法获得的发酵液、发酵液产品或组合物。将美国专利第5,106,648号,第5,512,069号和第8,181,388号中公开的用于种子处理的多种种子处理组合物和方法通过引用整体并入本文,并且其可适用于本文提供的发酵产品或组合物。在某些实施方案中,用于处理种子的组合物可以包含农业上可接受的赋形剂,其包括但不限于:木粉、粘土、活性炭、硅藻土、细颗粒无机固体、碳酸钙等。可以用于本文提供的发酵液、发酵液产品或组合物的粘土和无机固体包括但不限于:钙膨润土、高岭土、陶土、滑石、珍珠岩、云母、蛭石、硅石、石英粉、蒙脱石、以及以上的混合物。可以使用的促进粘附于种子上的农业上可接受的佐剂包括但不限于:聚乙酸乙烯酯、聚乙酸乙烯酯共聚物、水解的聚乙酸乙烯酯、聚乙烯吡咯烷酮-乙酸乙烯酯共聚物、聚乙烯醇、聚乙烯醇共聚物、聚乙烯甲醚、聚乙烯甲醚-顺丁烯二酸酐共聚物、蜡类、乳胶聚合物、纤维素包括乙基纤维素和甲基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟甲基丙基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、海藻酸盐、糊精、麦芽糊精、多糖、脂肪、油、蛋白、刺梧桐树胶、瓜尔胶(juguar gum)、黄耆胶、多糖树胶、粘液、阿拉伯树胶、虫胶、偏二氯乙烯聚合物和共聚物、基于大豆的蛋白聚合物和共聚物、木素磺酸盐、丙烯酸共聚物、淀粉、聚乙烯丙烯酸酯、玉米醇溶蛋白、明胶、羧甲基纤维素、壳聚糖、聚氧化乙烯、丙烯酰胺聚合物和共聚物、聚丙烯酸羟乙酯、甲基丙烯酰胺单体、海藻酸盐、乙基纤维素、聚氯丁烯以及糖浆、或者以上的混合物。可以促进涂布的其它可用的农业上可接受的佐剂包括但不限于:乙酸乙烯酯的聚合物和共聚物、聚乙烯吡咯烷酮-乙酸乙烯酯共聚物和水溶性的蜡类。本文以及美国专利第8,181,388号中公开的各种表面活性剂、分散剂、防结块剂、泡沫控制剂和染料可以适用于本文提供的发酵产品或组合物。

[0082] 本文提供了组合物,其包含抑制植物致病真菌的甲基杆菌,并且相对于未暴露于

所述组合物的未处理的植物、植物部分和由其获得的植物,在所述植物、植物部分和由其获得的植物提供植物致病真菌感染的控制。在某些实施方案中,可以用本文提供的组合物处理包括但不限于种子、叶、果实、茎、根、块茎或胚芽鞘的植物部分,以控制真菌病害。处理或施用可以包括但不限于用本文提供的组合物喷雾、涂布、部分涂布、浸渍和/或浸渗植物或植物部分。在某些实施方案中,可以用本文提供的液体、半液体、乳状液或浆体浸渍和/或浸渗种子、叶、果实、茎、根、块茎或胚芽鞘。与未处理的植物或植物部分相比,此类种子浸渍或浸渗可以足以提供植物或植物部分中真菌病害的抑制。相对于未处理的植物,此类真菌病害的抑制包括但不限于真菌生长和/或真菌生长的不良作用的降低。在某些实施方案中,可将植物种子浸泡和/或吸胀至少1、2、3、4、5或6个小时。在某些实施方案中,此类浸渍和/或浸渗可在对植物种子或甲基杆菌无害的温度下进行。在某些实施方案中,可在约15°C至约30°C或者在约20°C至约25°C下处理种子。在某些实施方案中,可以通过温和地搅拌进行种子浸渍和/或浸渗。

[0083] 因此,足以提供植物或植物部分真菌感染的抑制的包含抑制植物致病真菌的甲基杆菌的组合物的量可以通过测量相对于未处理的植物或植物部分,处理的植物或植物部分中的任何或全部真菌生长和/或真菌生长的不良作用来确定。可以测量的植物中真菌生长的不良作用包括任何类型的植物组织损伤或坏死、任何类型的植物产量降低、作物植物产品价值的任何降低和/或非期望的真菌代谢物或真菌生长副产物(包括但不限于真菌毒素)的产生。真菌毒素包含由真菌物种产生的各种毒性分子,其包括但不限于:聚酮(包括黄曲霉素、去甲基柄曲霉素(demethylsterigmatocystin)、0-甲基柄曲霉素等)、伏马菌素、阿普瑞辛(alperisin)(例如A₁、A₂、B₁、B₂)、鞘氨醇抗菌素(sphingofungin)(A、B、C和D)、单端孢霉烯、烟曲杀霉素(fumifungin)等。广泛记录了定量真菌毒素水平的方法。此外,也可获得用于测量诸如黄曲霉素、烟曲霉素、脱氧萎镰菌醇和玉米赤霉烯酮的真菌毒素的市售试剂盒(VICAM, Watertown, MA, USA)。

[0084] 因此,本文提供的包含抑制植物致病真菌的甲基杆菌的组合物预期可用于抑制真菌生长和/或多种植物致病真菌感染,所述植物致病真菌包括但不限于下述属和物种的那些植物致病真菌的无性阶段和/或有性阶段:链格孢属(链格孢菌(*Alternaria alternata*));甘蓝链格孢菌(*Alternaria brassicicola*);茄链格孢菌(*Alternaria solani*));壳二孢属(豌豆壳二孢(*Ascochyta pisi*));双极霉属(玉蜀黍双极蠕孢(*Bipolaris maydis*));葡萄孢属(灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*));盘霜霉属(卵苣盘霜霉(*Bremia lactucae*));尾孢属(菊池尾孢;玉蜀黍尾孢菌);旋孢腔菌属(玉蜀黍旋孢腔菌(*Colchliobolus maydis*));异旋孢腔菌(*Cochliobolus heterostrophus*);炭色孢腔菌(*Cochliobolus carbonum*));炭疽菌属(菜豆炭疽菌(*Colletotrichum lindemuthianum*));禾生炭疽菌(*Colletotrichum cereale*));色二孢属(玉蜀黍色二孢菌(*Diplodia maydis*));白粉菌属(小麦白粉菌(*Erysiphe graminis* f.sp.*graminis*));大麦白粉菌(*Erysiphe graminis* f.sp.*hordei*));突脐蠕孢属(大斑病突脐蠕孢(*Exserohilum turcicum*));镰刀菌属(雪腐镰刀菌(*Fusarium nivale*));尖孢镰刀菌;禾谷镰刀菌;黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*));茄病镰刀菌;串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*);*Fusarium virguliforme*;禾顶囊壳(小麦禾顶囊壳(*Gaeumanomyces graminis* f.sp.*tritici*));壳孢属(菜豆壳孢菌(*Macrophomina phaseolina*));稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*; *Magnaporthe*

grisea);丛赤壳属(红球丛赤壳菌(*Nectria haematococca*));霜霉属(东北霜霉菌(*Peronospora manshurica*));烟草霜霉病菌(*Peronospora tabacina*));层锈菌属(豆薯层锈菌(*Phakopsora pachyrhizi*));瓶霉属(*Phialophora gregata*);茎点霉属(甜菜茎点霉(*Phoma betae*));瘤梗孢属(多主瘤梗单孢霉(*Phymatotrichum omnivorum*));疫霉属(樟疫霉(*Phytophthora cinnamomi*));恶疫霉(*Phytophthora cactorum*);菜豆疫霉(*Phytophthora phaseoli*);寄生疫霉(*Phytophthora parasitica*);柑桔褐腐疫霉(*Phytophthora citrophthora*);大豆疫霉(*Phytophthora megasperma* f.sp.*sojae*);致病疫霉(*Phytophthora infestans*));单轴霉属(葡萄霜霉菌(*Plasmopara viticola*));叉丝单囊壳属(白叉丝单囊壳(*Podosphaera leucotricha*));柄锈菌属(玉米柄锈菌(*Puccinia sorghi*));条形柄锈菌(*Puccinia striiformis*);禾柄锈菌小麦专化型(*Puccinia graminis* f.sp.*tritici*);天冬柄锈菌(*Puccinia asparagi*);隐匿柄锈菌(*Puccinia recondite*);花生柄锈菌(*Puccinia arachidis*);禾冠柄锈菌(*Puccinia coronate*));腐霉属(瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*));终极腐霉(*Pythium ultimum*));核腔菌属(偃麦草核腔菌);丝核菌属(立枯丝核菌;禾谷丝核菌);小核菌属(齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*));核盘菌属(核盘菌;币斑病菌);壳针孢属(茄壳针孢菌(*Septoria lycopersici*));大豆褐纹壳针孢(*Septoria glycines*));颖枯壳针孢(*Septoria nodorum*);小麦壳针孢);毛球腔菌属(*Setosphaeria*) (玉米毛球腔菌(*Setosphaeria turcica*));壳多孢属(颖枯壳多孢);根串珠霉属(根串珠霉(*Thielaviopsis basicola*));钩丝壳属(葡萄钩丝壳菌(*Uncinula necator*));黑粉菌属(玉蜀黍黑粉菌(*Ustilago maydis*));黑星菌属(苹果黑星菌(*Venturia inaequalis*));轮枝孢属(大丽花轮枝孢(*Verticillium dahlia*));黑白轮枝孢(*Verticillium albo-atrum*))。本文提供的包含抑制植物致病真菌的甲基杆菌的组合物还预期用于抑制真菌生长和/或禾谷镰刀菌、轮枝镰刀菌和/或层生镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)感染。本文提供的包含抑制真菌生长和/或禾谷镰刀菌、轮枝镰刀菌和/或层生镰刀菌感染的甲基杆菌的组合物可以用于控制感染这些真菌的谷类植物的感染。可以通过本文提供的组合物控制选自下述植物的谷类植物的镰刀菌属物种感染:水稻、小麦、玉米、大麦、粟、高粱、燕麦和黑麦。在以上提及的任何实施方案中,被抑制的植物致病真菌可以为其无性形式、为其有性形式或者为其无性形式和有性形式这两种形式。如表2中所公开的,某些甲基杆菌分离株或分离株的组合也可以用于抑制某些作物中的某些植物致病真菌。在使用分离株的组合的某些实施方案中(例如NLS0066和NLS0017或者NLS0089和NLS0020),所述分离株可以同时施用或者顺序施用。在使用分离株的组合的某些实施方案中(例如NLS0066和NLS0017或者NLS0089和NLS0020),所述分离株可以以相同的方式应用(例如经种子处理、叶面施肥或犁沟内施用)或者通过不同的方式应用。

[0085] 表2. 用于控制某些作物中的某些植物致病真菌的甲基杆菌分离株以及分离株的组合

[0086]

NLS 分离株	作物	病原体	病害常用名	应用模式
NLS066	小麦	禾谷镰刀菌	赤霉病	种子处理; 叶面施肥
	玉米	玉蜀黍尾孢菌 禾生炭疽菌	灰色叶斑病 炭疽病叶枯和茎秆腐烂	犁沟内施用; 叶面施肥
NLS0066+ NLS0017	小麦	禾谷镰刀菌	赤霉病	种子处理; 叶面施肥
	玉米	玉蜀黍尾孢菌	灰色叶斑病	犁沟内施用; 叶面施肥

[0087]

		禾生炭疽菌	炭疽病叶枯和茎秆腐烂		
NLS0089	小麦	禾谷镰刀菌	赤霉病	种子处理; 叶面施肥	
		小麦壳针孢 颖壳壳多孢	壳针孢属/壳多孢属斑点		
		腐霉属物种	腐霉根腐病		
		立枯丝核菌	丝核菌根腐病		
		镰刀菌属物种	镰刀菌属根腐病(root rot)、冠腐病和根腐病(foot rot)		
		水稻稻瘟病菌	穗稻瘟病(Head blast)		
		偃麦草核腔菌	褐斑病		
		微座孢属斑病菌	雪霉病		
	大豆	核盘菌			种子处理; 叶面施肥
		大豆尾孢菌	核盘菌属白霉病/茎腐病;		
		菊池尾孢	大豆灰斑病;		
		镰刀菌属物种	尾孢菌属叶枯病和紫斑病		
		立枯丝核菌	镰刀菌属种子腐烂、枯萎病/萎蔫病、根腐病以及荚腐病和裙腐病		
		<i>Fusarium virguliforme</i>			
		腐霉属物种	丝核菌属猝倒病根腐病	犁沟内施用; 叶面施肥	
		立枯丝核菌	猝死综合征		
		镰刀菌属物种	腐霉根腐病		
	玉米	禾生炭疽菌	丝核菌属冠腐病和根腐病 镰刀菌属根腐病;		

[0088]

		玉蜀黍尾孢菌 玉米赤霉 镰刀菌属物种 腐霉属物种	炭疽病叶枯和茎秆腐烂 灰色叶斑病 赤霉菌茎腐病; 镰刀菌属茎腐病; 腐霉属茎腐病
NLS0089+ NLS0020	小麦	禾谷镰刀菌 小麦壳针孢 颖枯壳多孢 腐霉属物种 立枯丝核菌 镰刀菌属物种 水稻稻瘟病菌 偃麦草核腔菌 微座孢属斑病菌	赤霉病 壳针孢属/壳多孢属斑点 腐霉根腐病 丝核菌属根腐病 镰刀菌属根腐病(root rot)、冠腐病和根腐病(foot rot) 冠枯萎 褐斑病 雪霉病
	大豆	核盘菌 大豆尾孢菌 菊池尾孢 镰刀菌属物种 立枯丝核菌 <i>Fusarium virguliforme</i> 腐霉属物种	核盘菌属白霉病/茎腐病; 大豆灰斑病; 尾孢菌属叶枯病和紫斑病 镰刀菌属种子腐烂、叶枯病/萎蔫病、根腐病以及荚腐病和裙腐病 丝核菌属猝倒病和根腐病 猝死综合征

[0089]	玉米	立枯丝核菌	腐霉根腐病
		镰刀菌属物种	丝核菌属冠腐病和根腐病
		禾生炭疽菌	镰刀菌属根腐病;
		玉蜀黍尾孢菌	炭疽病叶枯和茎秆腐烂
		玉米赤霉	灰色叶斑病
		镰刀菌属物种	赤霉菌茎腐病;
	腐霉属物种	镰刀菌属茎腐病;	腐霉属茎腐病

[0090] 在某些实施方案中,本文提供的足以提供植物或植物部分真菌感染的抑制的一些组合物是含有下述抑制植物致病真菌的甲基杆菌的组合物:滴度为至少约 5×10^8 个克隆形成单位/毫升、至少约 1×10^9 个克隆形成单位/毫升、至少约 1×10^{10} 个克隆形成单位/毫升或者至少约 3×10^{10} 个克隆形成单位/毫升。在某些实施方案中,本文提供的足以提供植物或植物部分真菌病害的抑制的一些组合物可以是含有滴度为约 5×10^8 个克隆形成单位/毫升至至少约 6×10^{10} 个克隆形成单位/毫升的抑制植物致病真菌的甲基杆菌的组合物。在某些实施方案中,本文提供的足以提供植物或植物部分真菌病害的抑制的一些组合物可以是发酵液产品,其中该产品固相中抑制植物致病真菌的甲基杆菌的滴度为每克固相至少约 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 个克隆形成单位至至少约 6×10^{10} 、 1×10^{13} 或 5×10^{13} 个克隆形成单位的甲基杆菌,其中所述固相上附着抑制植物致病真菌的甲基杆菌的单培养物或共培养物。在某些实施方案中,本文提供的足以提供植物或植物部分真菌病害的抑制的一些组合物可以是这样的组合物,其中甲基杆菌滴度为为包含颗粒的组合物中每克颗粒至少约 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 个克隆形成单位至至少约 6×10^{10} 、 1×10^{13} 或 5×10^{13} 个克隆形成单位的甲基杆菌,所述颗粒包含其上附着抑制植物致病真菌的甲基杆菌的单培养物或共培养物的固体物质。在以上提及的任何组合物中,指示的浓度可以是真菌抑制浓度。

实施例

[0091] 包括下述实施例,以展示多个实施方案。本领域技术人员将会理解,下述实施例中公开的技术代表申请人发现的功能良好的技术。但是,根据本公开,本领域技术人员理解,在不脱离本公开的范围的情况下,可以在公开的具体实施方案中做出多种改变,而仍获得相似的或类似的结果。

[0092] 实施例1.PPFM对禾谷镰刀菌的阻抑

[0093] 用于种子处理的PPFM培养物生长于用0.2%w/v硅藻土改良的AMS-GP培养基中(于2013年5月31日提交的国际专利申请PCT/US13/43722)。通过离心收获细胞,并将其在水中重悬至大约 1.3×10^8 CFU/ml的终浓度。在塑料发芽盒中,通过在用30ml PPFM悬浮液饱和的两片育苗纸之间孵育过夜而对近交系Bd21-3的二穗短柄草种子进行处理。在种子处理期间,将发芽盒置于4℃黑暗中。除了育苗纸上施用水之外,对对照组的种子进行类似处理。

[0094] 将处理的种子种植在无土栽培培养基中,并使其在受控的环境生长室(24℃,50%相对湿度,200 μ mol/m²/s光强度)中生长,其中昼长为20h,以促进开花。在种植之后42 \pm 2天,将繁殖成熟的二穗短柄草植株移至温室(21-24℃,40%相对湿度)。为了使植物时间适应温室环境,在转移至温室之后2天进行接种。

[0095] 在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)上培养禾谷镰刀菌。在预期的接种日期之前一周,将来自大约一周龄的禾谷镰刀菌克隆前缘的3个8x8mm的琼脂块转移至置于250ml烧瓶中的75ml CMC培养基(Cappellini和Peterson, Mycologia 57:962-966,1965)中。将烧瓶用锡纸包起来,并在室温摇动(175rpm)孵育六天。在6天之后,通过经双层无菌纱布过滤,随后离心来收获分生孢子。然后将沉淀的分生孢子在无菌去离子(DI)水中重悬,并利用血细胞计数器测定分生孢子的浓度。在用0.01%吐温(v/v)改良的无菌DI水中制备终浓度为 1×10^5 个分生孢子/ml用于接种。

[0096] 通过将分生孢子悬浮液直接喷洒至小穗上直至液滴溢流来接种植物。对照植物接受用0.01%吐温20改良的无菌DI水模拟接种处理。在接种之后立即将各植物套袋,以保持高湿度并防止交叉污染。然后以随机完全区组设计设置所有植物,其中有6个重复。在前5天,在各平台上放置湿度圆顶,以保持接近100%的相对湿度。在接种之后7天,评估各植物的病害发病率和严重性。将发病率评估为受影响的有症状的小穗的数目除以每株植物的小穗总数目。使用每株植物显示病害症状的小穗的总面积来评估严重性,并在0-5的范围打分,其中0指示无小穗症状,1=1-20%、2=21-40%、3=41-60%、4=61-80%以及5=81-100%有症状的小穗面积/植物。

[0097] 在测试的4种NLS菌株(PPFM菌株NLS0017、NLS0020、NLS0037和NLS0066)接种处理中,相对于DI水处理的对照,仅来自用PPFM菌株NLS0066处理的种子的植物显示出FHB症状发病率(表3)和严重性(表4)的显著降低(95-99%置信区间)。这两种病害指标降低为50%或接近50%。相对于对照植物,用PPFM菌株NLS0017进行的处理降低了症状严重性和发病率大约27%;但是,该差异在95%的置信界限下不显著。PPFM菌株NLS0020和NLS0037不影响小穗发病率或症状严重性。

[0098] 表3. 小穗发病率

处理	接种	平均值	SE	与对照的差异%	显著性
水	禾谷镰刀菌	27.78	3.68	0.00	NS
NLS0017	禾谷镰刀菌	20.27	7.15	-27.03	NS
NLS0020	禾谷镰刀菌	30.27	5.25	+8.96	NS
NLS0037	禾谷镰刀菌	33.44	3.34	+20.27	NS
NLS0066	禾谷镰刀菌	14.67	6.21	-47.20	>95%

[0100] 表4. 症状严重性

	处理	接种	平均值	SE	与对照的差异%	显著性
[0101]	水	禾谷镰刀菌	2.12	0.33	0.00	NS
	NLS0017	禾谷镰刀菌	1.56	0.26	-26.50	NS
	NLS0020	禾谷镰刀菌	1.78	0.31	-16.04	NS
	NLS0037	禾谷镰刀菌	2.17	0.26	+2.36	NS
[0102]	NLS0066	禾谷镰刀菌	1.06	0.21	-50.00	>99%

[0103] 实施例2. 在生长室和田间测试中赋予小麦FHB抗性的PPFM菌株的鉴定

[0104] 将赤霉病 (FHB) 易感小麦品种Bobwhite或另一FHB易感品种用于生长室研究。对于待测试的各PPFM分离株,将在未进行任何PPFM处理的情况下种植种子,并使其在生长室中生长。将15株植物的穗喷洒 10^6 或 10^8 cfu/ml的各PPFM菌株悬浮液。通过在开花的穗中间的各种穗注射10 μ l禾谷镰刀菌PH-1或另一毒性禾谷镰刀菌分离株 (10^5 个孢子/ml) 的分生孢子悬浮液或水对照 (模拟) (在0.01% Triton 60或吐温20溶液中), 定点接种来自各植物的两个穗 (Goswami和Kistler, 2005)。接种之后,将植物置于生长室中,16 $^{\circ}$ C持续8h (夜晚) 并且18 $^{\circ}$ C持续16h (白天)。为了确保本身病害严重性,将穗用塑料袋覆盖48h,以增加湿度。在接种之后7天进行第一次病害评估。对各接种穗中显示症状的小穗的数目进行计数,并记录。在接种之后14天重复评估。对于各评估日期,将病害严重性计算为各穗中患病小穗的百分比 (病害严重性评价)。为了测试整体处理效果,计算各植物的病害进展曲线下面积 (AUDPC)。我们预期,用少量PPFM菌株处理的植物将比对照植物具有低得多的病害打分 (AUDPC)。我们预期,在这些生长室测试中,以花器喷雾法施用的一些PPFM菌株将提供针对FHB的抗性。

[0105] 将在生长室测试中已经确定提供FHB抗性的PPFM分离株推进至田间测试其提供FHB抗性的能力。田间测试将在两个或更多个位置进行。利用随机完全区组设计进行田间实验,其中每个处理四行和六个重复。在每个位置播种50粒每个重复PPFM处理的种子。围绕实验位置有四个边缘行,并且其不用PPFM进行处理。在预期开花之前约2周,将均匀定殖单一侵袭性禾谷镰刀菌分离株的黄色白齿型风干玉米粒 (yellow dent air-dried corn kernel) 以 ~ 25 粒/ m^2 均匀散布在测试区域。子囊壳将在数天内出现在粒上,并且在小麦最易感该病原体时 (开花时) 开始释放子囊孢子。如所述 (Schisler等人, 2002), 在开花高峰时,利用CO₂背包式喷雾器施用 1×10^8 cfu/ml的各菌株PPFM悬浮液 (在含有0.04%吐温80或类似表面活性剂的水中)。对照处理为喷洒含有0.04%吐温80或类似表面活性剂但无PPFM的水。在开花期间,利用小的高架洒水设备 (overhead sprinkler) 保持穗湿润,从早晨到傍晚,每小时3min。

[0106] 如所述 (Stack和McMullen, 1995), 当田间的植物到达乳熟后期发育阶段时,通过每个重复评估60个穗来对FHB发病率和严重性进行评价。手工收获小麦穗,打谷并对100粒的重量进行评估。利用VeratoxTM 5/5定量DON测试试剂盒 (Neogen Corp., Lansing, MI, USA) 分析各重复10g至20g样本的脱氧萎镰菌醇 (DON) 含量。

[0107] 用SAS的PROC GLIMMIX (SAS Institute, Research Triangle Park, NC) 或R中的 'lme' 和相关包 (<http://www.R-project.org>) 进行病害发病率和严重性以及DON数据的统计学分析。当P值 < 0.05 时,认为数据显著不同。利用计算皮尔逊相关系数的SAS的PROC REG (SAS Institute, Research Triangle Park, NC) 对FHB严重性和DON平均值进行相关分析。

[0108] (1) Cappellini RA, Peterson JL (1965) Macroconidium formation in

submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57:962-966.

[0109] (2) Spelbrink RG, Dilmac N, Allen A, Smith TJ, Shah DM, et al. (2004) Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiol* 135:2055-2067.

[0110] (3) Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Vanderleyden J (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters* 69: 55-60.

[0111] (4) Holland, M.A., Polacco, J.C. (1994) PPFMs and other covent contaminants: Is there more to plant physiology than just plant. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* 45:197-208.

[0112] (5) Jacobson, B.J. (2006) Biological control of plant diseases by phyllosphere applied biological control agents. In MJ Bailey, AK Lilley, TM Timms-Wison, PTN Spencer-Phillips, eds, *Microbial ecology of aerial strains in a controlled model system*. CAB International, United Kingdom, Wallingford, pp 133-147.

[0113] 实施例3. 温室生长的小麦的赤霉病的阻抑

[0114] 在用于种子处理之前, 立即将冷冻的PPFM浓缩物 (1×10^8 CFU/mL) 解冻至室温。然后将PPFM浓缩物涡旋10秒, 并将75 μ L各处理物用移液器吸至含有100粒春小麦种子的15mL圆锥管 (*Triticum aestivum* L., cv. 'Bobwhite)。为了模拟标准工业种子处理, 向各处理管中添加66.8 μ L农业聚合物溶液, 该溶液通过将6.1mL聚合物与40mL去离子水组合制备 (Flo Rite 1706 Plantability Polymer, BASF, North Carolina, USA)。将管加盖, 并涡旋大约90秒, 以充分涂布种子。使用前使先处理的种子在实验台上的Kimwipe™下风干, 并保持室温。在处理一周内使用所有种子。通过下述检查多余的种子的PPFM浓度和活力: 将10粒种子置于无菌蒸馏水中, 涡旋10秒, 并将100 μ L得到的种子洗液接种于PPFM选择培养基上。用PPFM生长培养基和聚合物溶液的溶液处理对照种子。

[0115] 将处理的种子种植在无土栽培培养基/田间土壤的50/50混合物中, 并使其在有空调的温室 (70°F夜晚/68°F白天, 40-90%RH, 16h昼长) 生长直至开花。植物每天浇水, 并且每周浇两次营养液。

[0116] 在马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 上培养禾谷镰刀菌。在预期接种日期之前一周, 将来自大约一周龄的禾谷镰刀菌克隆前缘的3个8x8mm琼脂块转移至250mL烧瓶中的75mL CMC培养基 (Cappellini和Peterson, 1965) 中。将烧瓶室温摇动 (175rpm) 孵育6天。在第6天之后, 通过经双层无菌纱布过滤, 随后离心来收获分生孢子。然后将沉淀的分生孢子在无菌去离子 (DI) 水中重悬, 并利用血细胞计数器测定分生孢子的浓度。在用0.01%吐温 (v/v) 改良的无菌DI水中制备的终浓度为 $1.0-2.0 \times 10^5$ 个分生孢子/ml 用于接种。

[0117] 通过用校准至20psi的喷枪将分生孢子悬浮液直接喷洒至小穗上来接种植物。将10mL分生孢子悬浮液均匀施用于每平台的18个盆。对照植物接受用0.01%吐温改良的无菌DI水模拟接种处理。就在接种之前, 以随机完全区组设计设置各处理的盆, 其中每个处理具有18个重复。在接种之后将植物置于90%相对湿度的雾室中72h, 然后移至温室操作台。在

接种之后10天,对各植物的病害严重性进行评价。在0-100%的范围评估各穗具有可见病害症状的总面积,并在最终的分析中取盆内穗的单个严重性数值的平均值。

[0118] 相对于对照 (GlyC) 植物,NLS0089通过阻抑六个实验中的四个的病害而展示出一致的病害阻抑(表5)。

[0119] 表5.用于赤霉病控制的温室测试

[0120]

处理	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5
GlyC	79.5	41.9	86.7	NA	NA
NLS0089	<u>76.8</u>	40.0	90.1	NA	NA
GlyC	19.7	46.6	43.4	13.3	NA
NLS0020	20.8	54.2	49.6	10.8	NA
NLS0037	11.4	52.9	57.8	12.2	NA
NLS0066	24.4	52.1	50	10.3	NA
NLS0089	19.1	56.5	47.9	6.8	NA
GlyC	20.4	5.2	10.7	NA	NA
NLS0017	26.3	3.6	16.2	NA	NA
NLS0017+21	38.6	11.6	15.3	NA	NA
NLS0021	30.5	12.7	12.6	NA	NA

[0121] 实施例4.田间PPFM种子处理对FHB的阻抑

[0122] 于2015年春天,在南达科他州的布鲁金斯(Brookings, South Dakota)进行田间试验来估计PPFM种子处理对于赤霉病(FHB)的阻抑。使用春小麦品种‘Select’进行试验,并在7月第1周播种种子,在9月下旬收获。由于该试验播种日期较晚,产量数据不可用。

[0123] 将试验安排为具有10个重复的随机完全区组设计(RBCD)。各区组由4个10英尺的行组成,其中每区254粒种子。行内播种间距为相隔~8.5”,具有每线性英寸2.11粒种子。在重复内的区之间留2个空白行间距,并在重复之间留1个空白区间距,以提供处理之间的分隔。仅从区内的两个中间行收集病害评价数据。在整个试验中,利用标准农学实践维持区块,除了对于病害对照不施用叶片杀真菌剂。

[0124] 利用标准工业处理实践将PPFM施用于小麦种子,并在种子处理24h内种植。基础处理由下述组成:控制幼苗病害的**Rancona®**Summit杀真菌剂(8.33fl oz/cwt)、**Gaucho®**480杀昆虫剂(3.0fl oz/cwt)和工业标准种子处理聚合物(1.0fl oz/cwt;Flo Rite 1706 Plantability Polymer,BASF Corporation,North Carolina,USA)。浓缩的PPFM处理物在干冰中冷冻供应,并在用于种子处理之前将其立即解冻。施用PPFM溶液,以实现 1.0×10^6 CFU PPFM细菌/种子的目标。处理列于表6中。

[0125] 表6.

处理编号	处理	产品
1	基础	Rancona® Summit Gaucho® 480 聚合物(FR 1706)
2	基础+ NLS0017	Rancona® Summit Gaucho® 480 聚合物(FR 1706) NLS0017
3	基础+ NLS0020	Rancona® Summit Gaucho 480 聚合物(FR 1706) NLS0020
[0126] 4	基础+ NLS0066	Rancona Summit Gaucho® 480 聚合物(FR 1706) NLS0066
5	基础+ NLS0089	Rancona Summit Gaucho® 480 聚合物(FR 1706) NLS0089
6	基础+ NLS0017 NLS0066	Rancona Summit Gaucho® 480 聚合物(FR 1706) NLS0017 NLS0066

[0127] 普通环境条件对病害高度有利,导致强的自然FHB压力。在试验中,向一半重复施用本地来源的禾谷镰刀菌分生孢子形式的人工接种。施用的接种物浓度为 1×10^4 个分生孢子/mL,并且每区施用25mL。接种区和天然感染区的病害数据没有显著差异;因此,将数据点混合用于最终分析。在接种后大约1个月进行病害评价。收集的度量是通过肉眼观察在区水平确定的FHB发病率百分比,以及通过对收集自田间的20个单个的分离穗的样本进行评价所确定的病害严重性。利用下式计算各区的病害指数:〔(发病率X严重性)/100〕。

[0128] 利用SAS的JMP (version.11) 统计发现软件包 (SAS Institute, Research Triangle Park, North Carolina) 分析病害数据。利用混合模型分析数据,其中将‘处理’和‘接种’指定为固定效果,并将‘区组’指定为随机效果。在确定‘接种’对病害结果无显著影响之后,从模型中去除该因子。表7提供了结果总结。

[0129] 表7.

处理	FHB 发病率(%)	FHB 严重性(%)	病害指数
对照(基础)	94.2	55.42	52.15
NLS0017	84.3*** ^a	52.97	44.54
[0130] NLS0020	85.8***	59.58	51.26
NLS0066	84.3***	57.77	48.73
NLS0089	84.7***	46.60*	39.43**
NLS0017+ NLS0066	84.1***	51.02	42.90

[0131] 星号指示相对于对照处理(无PPFM的基础种子处理)的如下统计学显著性:*P<0.10,**P<0.05,***P<0.01。

[0132] NLS0089显著降低了病害的所有度量,病害指数相对于对照降低了24%。NLS0017和NLS0066的组合降低了病害的所有度量,其在降低FHB病害发病率方面表现最好,并且比单独施用任一菌株表现更好。单独的NLS0017也降低了病害的所有度量。包含在受控的环境试验中未显示出FHB阻抑的NLS0020,其作为阴性对照,并且表现如预期。

[0133] 实施例5. 丝核菌属-猝倒病的阻抑

[0134] 对PPFM阻抑丝核菌属-猝倒病的能力进行测试。对于这些分析,将PPFM菌株、未处理对照和阳性对照(荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*))设置于96孔板上的三个区组,使其在30°C下生长24h,伴随着250rpm下的摇动,然后在-80°C下保存。视需要,将冷冻的贮存板用于启动新的培养物。对于丝核菌属猝倒病分析,使于-80°C贮存物启动的培养物在1mL孔体积的96孔板中的铵矿物盐(AMS)培养基中生长5天,所述培养基包含作为碳源的蛋白胨、谷氨酸盐以及用于促进甲基杆菌生长的合适的固体基质(于2013年5月31日提交的国际专利申请PCT/US13/4372)。

[0135] 生长条件是30°C,伴随着在平台摇床上以250rpm摇动。将500uL PPFM培养物从96孔板的各孔用移液器吸至对应标记的2mL微量离心管中,并且在各管中放置三粒豌豆种子(*Pisum sativum* L., cv. Sugar snap; Johnny's Seeds, Maine, USA)。在将豌豆置于管中之后,将管加盖并摇动,以用细菌溶液涂布种子。在1个小时之后,将种子种植在感染病原体的盆栽培养基中。

[0136] 通过下述制备立枯丝核菌接种物:将研磨的黄色玉米膳食与沙子的混合物高压灭菌两次,然后接种从小于一周龄的真菌培养物前缘切下的琼脂块。将接种的玉米膳食-沙子混合物在实验台上孵育大约2周,并且每隔几天进行摇动,从而均匀分散接种物。2周之后,将接种物在无菌生物安全食品中干燥过夜,使用前于4°C保存。在收获时将来自各批接种物的小样本平板接种于马铃薯葡萄糖琼脂上,以检查定殖,并确保接种物中不存在污染物。就在以0.73g接种物/杯的最终比率接种之前,将接种物掺入盆栽培养基中,并向盆栽培养基中添加最终比率为6.25mL/杯的去离子水。将感染病原体的盆栽培养基置于96杯中,96孔细菌培养板中的每个孔标记1个,并将3粒来自对应孔种子处理管的种子种植在各杯中。然后将杯用盖子覆盖,以形成高湿度的环境,并将其置于具有14小时昼长和27°C恒温的生长室中。在本实验中使用迪克西冰淇淋杯,因为:1) 封闭的杯子防止处理物之间交叉污染的风险,和2) 杯子有盖,这可以用于增加湿度而避免实验期间对浇水的需求。

[0137] 在种植/接种之后1周,对植物的病害严重性进行评价。评价包括出苗前猝倒病、出苗后猝倒病和植物健康。通过计数每个盆中未发芽的种子的总数来对出苗前猝倒病进行评价;通过计数每个盆中发芽之后不久就被杀死的种子的数目来对出苗后猝倒病进行评价;在0-5的范围对植物健康进行如下评级:0=死亡植物;1=严重生长迟缓/坏死的植物;2=中度至严重的生长迟缓和坏死;3=中度生长迟缓和/或坏死;4=具有小的病变部位或轻微生长延迟的大体上健康的植物;5=健康植物。将每个处理的3个重复中每盆患有猝倒病的幼苗总数和平均植物健康数值取平均值用于数据分析。将这些数值与对照进行比较。[菌株平均值-平均值的一个标准误]未与[未处理的对照的平均值+平均值的一个标准误]重叠的菌株视为提供了病害阻抑。表8中总结了病害评价数据,表9中总结了植物健康数据。

[0138] 表8. 丝核菌属平均植物健康评级

[0139]	处理	平均植物健康评级±SEM
--------	----	--------------

未处理的对照	0.89±0.59
荧光假单胞菌	0.56±0.29
NLS0017	2.67±0.33
NLS0020	1.00±0.58
NLS0037	1.67±0.38
NLS0038	1.44±0.78
NLS0089	2.67±0.69

[0140] ^a将来自每个处理的三个重复的植物健康打分进行组合来计算平均值,其中每盆含有三棵幼苗。对于三个重复盆,利用n=3来计算SEM。

[0141] 表9. 丝核菌属猝倒幼苗的平均数目

处理	平均植物健康评级±SEM
未处理的对照	2.33±0.67
荧光假单胞菌	2.33±0.33
NLS0017	0.67±0.33
NLS0020	2.00±0.58
NLS0037	1.33±0.33
NLS0038	1.67±0.67
NLS0089	0.67±0.33

[0143] ^a将来自每个处理的三个重复的幼苗计数进行组合来计算平均值,其中每盆含有三棵幼苗。对于三个重复盆,利用n=3来计算SEM。

[0144] 分别测量和分析累积的幼苗猝倒病和植物健康。菌株NLS0017和NLS0089阻抑全部幼苗的猝倒病,并增强整体植物健康。这些甲基杆菌属物种菌株具有用作种子或犁沟内处理物以保护不患丝核菌属相关病害的潜力。

[0145] 实施例6.PPFM对大豆白霉病(核盘菌属)的阻抑

[0146] 在种子处理之前,将2mL浓度为大约 1×10^8 CFU/mL的冷冻PPFM贮存液立即解冻至室温。将解冻的PPFM贮存通过离心沉淀,用无菌蒸馏水洗涤一次,然后在终体积为20mL的无菌蒸馏水中重悬。将20mL溶液置于50mL圆锥管中,并将40粒大豆种子置于所述含有PPFM溶液的管中。将管放置在其一侧,并且每10分钟搅动一次,总共持续30分钟。在30分钟的处理时间之后,倾析过量的液体,并立即种植处理的种子。

[0147] 根据具体的试验,将种子种植在盆栽培养基、田间土壤或者盆栽培养基和田间土壤50/50的混合物中。在所有实验中,使用各自含有18个盆的平台,并在种植时或就在接种之前,将包含各处理物的盆分为随机完全区组。在种植之后,立即将盆移至温室(75-80°F; RH 40-90%;16h昼长),并使其在此生长一个月。植物每天浇水,并且每周接受两次补充营养液。

[0148] 用在黑暗中生长于马铃薯葡萄糖琼脂PDA上的5-7天龄的核盘菌属培养物接种1月龄的植物。使用改进版本的叶柄剪切接种技术(Hoffman等人,2002.Plant Dis.86:971-980)。简言之,在离茎大约1英寸处,用剪刀剪切第3个三叶的叶柄。使用1000uL移液管的宽端从核盘菌属培养物的外缘切下琼脂片。然后将尖端置于剪切的叶柄上,以使移液管尖端的宽端与茎和叶柄基部接触,并且叶柄剪切端与琼脂块的菌丝体一侧接触。在尖端和茎周

围包一小片石蜡膜,以防止尖端脱落。在评价之前,将接种的植物在温室繁育7-10天,以允许病害发展。

[0149] 收集病变部位长度和枯萎严重性作为病害指标。利用直尺测量褐色或脱色的病变部位的长度。在0-5的范围评价枯萎严重性,其中0指示完全健康的植物,以及5指示死亡的植物。实验以随机完全区组设计来进行,其中每个实验重复含有9个区组,并且每个实验重复3次,各处理组的样本大小为27个实验单元。利用JMP v11.2 (SAS Institute; Cary, NC) 中的混合模型分析来分析数据。分别分析枯萎和病变部位长度数据。在各情况中,包含重复作为随机效果,并且包含处理作为固定效果。模型拟合标准确定重复内的区组贡献不显著,并从最终分析中去除该因子。

[0150] 在实验的所有3个重复中,相对于未处理的对照组,用NLS0089进行的处理显著减少了枯萎(图2)和病变部位长度(图3)(双样本独立t-检验; $P < 0.01$)。其它处理对病害严重性度量无显著影响。与对照组相比,NLS0089降低枯萎严重性 $> 30\%$,并且相对于对照组,降低病变部位长度 $> 40\%$ 。

[0151] 在本实验测试的五种菌株中,相对于对照组,仅NLS0089显著降低了白霉病严重性的两个指标。该菌株具有在农业环境下提供病害阻抑的潜力,并且能够为当前的白霉病病害治理实践提供有价值的补充。

[0152] 实施例7. PPFM对大豆猝死综合症的阻抑

[0153] 在种子处理之前,将浓度为大约 1×10^8 CFU/mL的冷冻PPFM贮存液立即解冻至室温。在实验室级种子处理器中,用1 μ L/种子的PPFM浓缩物和0.89 μ L/种子的稀释聚合物溶液(FR1706, Becker Underwood; 6.1mL聚合物稀释于40mL去离子水中)处理多批200粒种子。处理之后,使种子干燥过夜,并在处理1周内使用种子。为了估计PPFM的定殖和活力,将10粒种子的等份试样在10mL无菌0.9%盐水溶液中涡旋10秒,并将得到的100 μ L洗液平板接种于PPFM特异性琼脂板上。用PPFM生长培养基/聚合物溶液的贮存液处理对照种子。在各次处理之间用70%乙醇充分清洁处理器,以防止交叉污染。

[0154] *Fusarium virguliforme*分离株获自USDA-ARS NRRL菌种保藏中心。在PDA和澄清的V8汁琼脂上于室温培养培养物。分离株还在 -80°C 下保存于甘油中,并且每隔几个月就从植物中重新分离,以确保连续侵袭性。通过下述制备接种物:将高粱谷粒在置于具有通风盖的500mL锥形瓶内的自来水中浸泡过夜,第二天排干水,并以1小时液体循环连续2天高压灭菌。在完成高压灭菌的当天,用从2-4周龄*Fusarium virguliforme*培养物上切下的6个琼脂块接种无菌高粱谷粒。将接种瓶在实验台上繁育大约2周,并且每隔几天摇动一次以均匀分散接种物。2周之后,将定殖的谷粒平板接种于PDA上,以检查污染,并在使用前将接种物移至 4°C 。在保藏一个月之后,丢弃接种物,并且其不再用于筛选分析。

[0155] 在种植时进行接种。使盆半充满50:50的非无菌田间土壤:沙子混合物,并将处理安排为随机完全区组,其中各PPFM处理的接种盆和未接种盆在一个区组内。接种盆接种5g高粱谷粒接种物,其在添加种子之前掺入土壤混合物中。在各盆中种植两粒种子,然后用大约2厘米的沙子:土壤混合物覆盖。在种植之后前2周,实验在 20°C 的生长室中进行,并且每天浇水以提供有益于SDS的条件。2周之后,将实验转移至大约 $23-27^\circ\text{C}$ 的温室,并再培育2周,以允许地上SDS症状的发展。

[0156] 在种植和接种之后1个月,进行SDS病害严重性评价和植物生物量测量。在0-5的范

围评价地上病害严重性测量结果,其中0指示完全健康的植物,以及5指示死亡的植物。在评价之后,收获植物,并在干燥之前洗涤根以去除附着的土壤。分别测量干燥的根和茎干(shoot)的生物量,以对各植物部分进行处理之间的比较。用Excel和11.2版JMP(SAS Institute,Cary,NC)对原始数据和效应量、各处理中接种和未接种的植物之间的差异的数据进行分析。

[0157] 在模拟处理对照旁边的组中对PPFM菌株进行测试,所述对照包含于全部测试组内。由于实验之间的差异,将不同测试组的数据分开显示。在一个测试组中,NLS0066大大降低了SDS相关病害指标的效应量,特别是根生物量,这指示这些菌株限制了病害症状的发展,并且保护植物不发生由SDS感染引起的生长减少(表10-12)。将效应量计算为给定处理中接种和未接种的植物之间的差异。在病原体压力不存在的情况下,NLS0066对植物生长无影响。

[0158] 表10.PPFM处理对SDS严重性^a的效应量

处理	对照的严重性±SEM	接种的严重性±SEM	效应量 ^b
GlyC对照	0.88±0.07	2.32±0.04	-1.44
NLS0038	0.92±0.07	2.24±0.04	-1.32
NLS0046	0.5±0.07	2.46±0.04	-1.96
NLS0066	1.29±0.07	2.32±0.03	-1.03

[0160] ^a在0-5的范围评价严重性,其中0指示完全健康的植物,以及5指示死亡的植物。每个处理的样本大小为n=54。

[0161] ^b较小负值的效应量指示在接种病原体的情况下,症状严重性的小幅增加

[0162] 表11.PPFM处理对SDS接种植物根重^a的效应量

处理	对照的根重±SEM	接种的根重±SEM	效应量 ^b
GlyC 对照	960.37 ± 16.57	545.99 ± 7.59	414.38
NLS0038	845.25 ± 14.29	540.52 ± 7.67	304.73
NLS0046	822.73 ± 18.92	459.93 ± 7.04	362.80
NLS0066	737.63 ± 8.84	619.58 ± 9.98	118.05

[0165] ^a根重以mg为单位给出。每个处理的样本大小为n=54。

[0166] ^b较小效应量指示病原体接种的降低的影响。

[0167] 表12.PPFM处理对于SDS接种植物茎干重量^a的效应量

处理	对照的根重±SEM	接种的根重±SEM	效应量 ^b
GlyC对照	685.82±11.63	455.99±5.19	229.83
NLS0038	525.57±10.25	429.13±3.76	96.44
NLS0046	497.85±11.25	440.84±4.73	57.01
NLS0066	411.43±7.96	448.97±4.23	-37.54

[0169] ^a茎干重量以mg为单位给出。每个处理的样本大小为n=54。

[0170] ^b较小效应量指示病原体接种的降低的影响。

[0171] 在温室环境下,用NLS PPFM菌株NLS0066对大豆进行的种子处理导致对SDS病原体*F.virguliforme*引起的病害发展的强烈影响。这些菌株提供了作为生物控制剂的潜力,其可以单独使用或者与其它菌株和/或病害缓解策略组合使用,以提供SDS的有效且可持续的

管理。

[0172] 实施例8. 2015年夏季玉米和大豆的田间测试

[0173] 在2015年夏季,在密苏里州伯特利(Bethel, Missouri)和俄亥俄州特洛伊(Troy, Ohio)两处独立的位置进行田间试验以评估PPFM对玉米和大豆中的病害的阻抑。这两处试验位置均由签订合同的研究组织管理。新叶共生(NewLeaf Symbiotics)人员在每处至少参观两次,以确保适当的试验实施。在这两处位置对同样的菌株和施用量进行测试。将试验安排为RCBD(随机完全区组设计)内的分区,其中伯特利位置处有6个重复,并且特洛伊位置处有4个重复。表13中描述了对玉米的处理,以及表14中描述了对大豆的处理。以1,250mL 10X PPFM浓缩物/英亩的量施用犁沟内处理,以及以5,000mL 10X PPFM浓缩物/英亩的量施用叶片处理。分区设计允许对犁沟内处理、叶片处理、对连续PPFM处理的反应以及不同PPFM之间的相互作用进行评估。

[0174] 表13. 2015年病理学玉米田间测试处理

处理编号	全区处理	子区处理
1	模拟	模拟
2	NLS0020	模拟
3	模拟	NLS0020
4	NLS0020	NLS0020
5	模拟	NLS0066
6	NLS0020	NLS0066

[0176] 表14. 2015年病理学大豆田间测试处理

处理编号	全区处理	子区处理
1	模拟	模拟
2	NLS0089	模拟
3	模拟	NLS0020
4	NLS0089	NLS0020
5	模拟	NLS0066
6	NLS0089	NLS0066

[0178] 在各位置处,使用常规行间距,并随后进行标准农业实践。向各位置提供具有类似的遗传学但适用于特定试验位置的玉米和大豆杂种。子区大小不小于四个20'行。在子区之间留出五英尺的边界,以减小邻近效应。此外,仅从各区的中间两行进行观察。全区由四个子区加上区之间的5英尺边界组成。在具有天然病害压力的区域选择试验位置,并且不进行人工接种。因此,在各位置处,不对相同的病害进行评估。在玉米中评价的病害是炭疽病(禾生炭疽菌)、灰色叶斑病(玉蜀黍尾孢菌)和常见的锈病(玉米柄锈菌)。在大豆中评价的病害是褐斑病(大豆褐纹壳孢)和其它叶片病害。对于出现的各病害,收集发病率和/或严重性评价并进行分析,以确定处理效果。

[0179] 表3-5中报道了病害评价和统计学分析。由于各位置处的病害评价和重复数不同,分别分析来自两处试验位置的数据。利用SAS JMP软件v11.2(SAS Institute, Cary, NC)分析数据。根据JMP对‘拟合模型’功能中的分区分析指导进行数据分析,对于混合模型,其使用REML技术。应用学生T检验和Tukey's HSD事后检验来确定处理组之间的差异($\alpha=0.05$)。使用对照进行特定目标组之间的比较。

[0180] 表15.大豆叶片病害-密苏里州伯特利

全区(犁沟内)处理	子区(叶片)处理	早期褐斑病严重性(%)	晚期褐斑病严重性(%)	早期叶斑病严重性(%)	晚期叶斑病严重性(%)
模拟	模拟	3.00	8.33	1.67	5.50
[0181] 模拟	NLS0020	1.33 ^T	4.17 ^{T,H}	0.17 ^{T,H}	2.00 ^{T,H}
模拟	NLS0066	1.67 ^T	4.83 ^T	0.67 ^T	4.17
NLS0089	模拟	1.17 ^T	5.00 ^T	0.17 ^{T,H}	2.50 ^{T,H}
NLS0089	NLS0020	1.17 ^T	5.17 ^T	0.33 ^{T,H}	2.50 ^{T,H}
NLS0089	NLS0066	1.67	5.17 ^T	0.33 ^{T,H}	4.33

[0182] ^T通过学生T-检验,处理与对照(模拟,模拟)显著不同($\alpha=0.05$)[0183] ^H通过ukey's HSD,处理与对照(模拟,模拟)显著不同($\alpha=0.05$)

[0184] 表16.玉米叶片病害-密苏里州伯特利

全区(犁沟内)处理	子区(叶片)处理	炭疽病严重性(%)	早期灰色叶斑病严重性(%)	晚期灰色叶斑病严重性(%)	常见锈病严重性(%)
模拟	模拟	21.17	3.17	13.00	12.17
[0185] 模拟	NLS0020	18.83	2.00 ^{T,H}	11.33	11.67
模拟	NLS0066	9.50 ^{T,H}	1.83 ^{T,H}	10.83 ^T	10.50
NLS0020	模拟	18.67	2.17 ^T	11.83	10.67
NLS0020	NLS0020	17.83	2.00 ^T	11.50	11.33
NLS0020	NLS0066	9.17 ^T	1.00 ^{T,H}	9.50 ^{T,H}	9.67 ^T

[0186] ^T通过学生T-检验,处理与对照显著不同($\alpha=0.05$)[0187] ^H通过Tukey's HSD,处理与对照显著不同($\alpha=0.05$)

[0188] 表17.玉米叶片病害-俄亥俄州特洛伊

全区(犁沟内)处理	子区(叶片)处理	灰色叶斑病严重性(%)	顶梢枯死严重性(%)	顶梢枯死发病率(%)	茎腐病严重性(%)
模拟	模拟	67.50	11.00 ⁱ	0.17 ⁱ	1.55
[0189] 模拟	NLS0020	67.50	8.25	0.14	1.60
模拟	NLS0066	62.50	12.50	0.18	1.45
NLS0020	模拟	65.00	7.50*	0.12*	1.85
NLS0020	NLS0020	67.50	10.00	0.16	1.55
NLS0020	NLS0066	60.00	9.00	0.14	1.45

[0190] ⁱ通过比较,所有模拟犁沟内处理的平均值与所有NLS0020犁沟内处理的平均值显著不同($\alpha=0.05$)[0191] *通过比较,处理与对照(模拟,模拟)显著不同($\alpha=0.10$)

[0192] 施用于大豆的所有处理证实了对褐斑病(大豆褐纹壳针孢)和其它叶片叶斑病害的阻抑。叶片施用NLS0020但不进行犁沟内处理,得到对所有病害的最低评价,因此,其是相对于对照,对病害进行阻抑的最有效的处理。叶片施用NLS0020随后进行NLS0089犁沟内处理,在所有处理中也证实了对病害的阻抑。单独用NLS0089进行犁沟内处理,显著降低了所有病害,并且对叶片叶斑病具有特别强烈的影响。

[0193] 在密苏里州伯特利位置处的玉米,在所有实例中,犁沟内施用NLS0020增强了由叶片施用NLS0066所提供的病害阻抑。这证实了多重施用这些特定PPFM菌株的增强的效力。未施用NLS0020,包括犁沟内施用,随后叶面施用,提供了多于一种病害的阻抑。

[0194] 在俄亥俄州特洛伊位置处,单独犁沟内施用NLS0020阻抑了顶梢枯死的严重性和发病率,这可以指示对病害和非生物胁迫物的作用。此外,相对于组合的所有模拟犁沟内处理,组合的所有犁沟内NLS0020施用阻抑了顶梢枯死度量,这指示NLS0020犁沟内处理的整体积极作用。

[0195] 实施例9.抑制植物致病真菌的甲基杆菌中存在的核酸多态性的鉴定

[0196] 利用Illumina TRUSEQ™或NEXTERA™ DNA样本制备试剂盒,利用制造商描述的方法(描述于互联网网址res.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_truseq_dna_sample_prep_kits.pdf和res.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_nextera_dna_sample_prep.pdf),创建用于Illumina™高通量测序平台的表1中提供的甲基杆菌属物种分离株的全基因组测序文库。然后对得到的文库进行焦磷酸测序(Siqueira JF等人,J Oral Microbiol.2012;4:10.3402/jom.v4i0.10743)。

[0197] 对原始焦磷酸测序产生的基因组序列数据进行基于接头和基于质量的修整,以便质量控制。通过利用重新组装程序Velvet (2) 组装质量合格的数据来实现全基因组鸟枪法序列组装(1)。对于基因寻找和注释,利用来自TIGRFAM (9)、Pfam、COG (10) 和UniRef100 (11) 的参考训练数据。用RNAmmer (5) 鉴定rRNA,用Glimmer (3) 或Maker (6) 鉴定蛋白编码基因,以及用tRNAscan-SE (4) 鉴定tRNA。用blastx (7)、blastp (7)、HMMER (8) 以及针对以上描述的综合蛋白数据库(参考数据)的InterProScan指定基因功能。

[0198] 用BWA (12) 和Samtools suite (在互联网网址samtools.sourceforge.net/处) 进行表1中甲基杆菌属物种分离株的多态性(SNP或由于插入、缺失和置换(Indels)而产生的其它DNA变体)的检测,用BreakDancer (互联网网址breakdancer.sourceforge.net/) 和CoGe (互联网网址genomevolution.org/CoGe/) 鉴定结构变体。通过对在抑制植物致病真菌的甲基杆菌分离株NLS0066中存在但在不抑制植物禾谷镰刀菌感染的一种或多种甲基杆菌分离株NLS0020和/或NLS0037中不存在的序列进行比对来鉴定抑制植物致病真菌的甲基杆菌的多态性诊断。然后将在抑制植物致病真菌的甲基杆菌分离株NLS0066中存在但在不抑制禾谷镰刀菌的甲基杆菌分离株NLS0020和/或NLS0037中不存在的多态性用于鉴定抑制植物致病真菌的其它甲基杆菌分离株。

[0199] 实施例9的参考文献

[0200] 1.Miller JR,Koren S,Sutton G (2010) Assembly algorithms for next-generation sequencing data.Genomics 95:315-327.

[0201] 2.Zerbino DR,Birney E (2008) Velvet:algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs.Genome Res 18:821-829.

[0202] 3.Delcher AL,Bratke KA,Powers EC,Salzberg SL (2007) Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer.Bioinformatics 23:673-679.

[0203] 4.Lowe TM,Eddy SR (1997) tRNAscan-SE:a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence.Nucleic Acids Res 25:955-964.

[0204] 5.Lagesen K,Hallin P,Rodland EA,Staerfeldt HH,Rognes T,et al. (2007) RNAmmer:consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes.Nucleic Acids Res 35:3100-3108.

[0205] 6.Cantarel B,Korf I,Robb S,et al. (2008) MAKER:An easy-to-use

annotation pipeline designed for emerging model organism genomes. *Genome Research* 18:188-196.

[0206] 7. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.

[0207] 8. Eddy SR (2009) A new generation of homology search tools based on probabilistic inference. *Genome Inform* 23:205-211.

[0208] 9. Haft DH, Selengut JD, White O (2003) The TIGRFAMs database of protein families. *Nucleic Acids Res* 31:371-373.

[0209] 10. Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, et al. (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 4:41.

[0210] 11. Suzek BE, Huang H, McGarvey P, Mazumder R, Wu CH (2007) UniRef: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters. *Bioinformatics* 23:1282-1288.

[0211] 12. Li H. and Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*, 25:1754-60.

[0212] 实施例10. 可以抑制植物致病真菌的甲基杆菌属物种中存在的直向同源基因的鉴定

[0213] 基本如共同转让的美国专利申请公开第US20130324407号(将其通过引用整体并入本文)中所述,使表1中列出的PPFM菌株(NLS066、NLS0020、NLS0037)和/或抑制或不抑制植物致病真菌的其它PPFM菌株于30℃下,在包含铵矿物盐(AMS)和甘油以及蛋白胨的固体琼脂培养基上生长5天。可以利用MO-BIO(Carlsbad,CA) Ultra Clean™ Microbial DNA分离试剂盒提取基因组DNA,并且可将1μg高质量的DNA用于Illumina Nextera™ XT文库构建,随后用于HiSeq2000™系统上的Illumina 2x100配对末端测序。可对原始Illumina基因组序列数据进行基于接头和基于质量的修整,以便质量控制。可以通过利用重新组装程序SPADES(33)组装质量合格的数据来实现全基因组鸟枪法测序组装。对于基因寻找和注释,可以利用来自TIGRFAM(9)、Pfam、COG(10)和UniRef100(11)的参考训练数据。可以用RNAmmer(5)鉴定rRNA,可以用Glimmer(3)和Maker(6)鉴定蛋白编码基因,以及可以用tRNAscan-SE(4)鉴定tRNA。可以用blastx(7)、blastp(7)、HMMER(8)以及针对以上描述的综合蛋白数据库(参考数据)的InterProScan指定基因功能。可以用BWA(12)和Samtools套装(互联网网址 samtools.sourceforge.net/)和基因组分析工具箱(GATK,互联网网址 broadinstitute.org/gatk/)进行甲基杆菌属物种分离株中的多态性(SNP或由于插入、缺失和置换(Indels)而产生的其它DNA变体)的检测,可以用BreakDancer(互联网网址 breakdancer.sourceforge.net/)和CoGE(互联网网址 genomeevolution.org/CoGe/)鉴定结构变体。用于分析增加番茄产量的甲基杆菌属物种分离株的基因组的此类方法公开于国际专利申请PCT/US2014/068611中,将其通过引用整体并入本文。

[0214] 可以从基本如以上所述组装的NLS0020、NLS0037和NLS066的全基因组序列预测编码开放阅读框的基因。在基因组内和基因组之间,可以利用OrthoMCL(可获自万维网网址

“orthomcl.org/orthomcl/”) 对直向同源基因进行聚簇。可以利用针对UniProt数据库(可获自万维网网址“uniprot.org/”)的BLASTP(可获自互联网网址“blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi”)指定基因产物的推定功能注释。可以利用定制软件,在OrthoMCL簇中鉴定在NLS0066(如实施例1中所示)或者可以抑制植物致病真菌的其它分离株的各基因组中存在但在NLS0037和/或NLS0020(如实施例1中所示)或者不抑制植物致病真菌的其它分离株的基因组中不存在的基因。

[0215] 实施例10的参考文献

[0216] 1. Miller JR, Koren S, Sutton G (2010) Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics* 95:315-327.

[0217] 2. Zerbino DR, Birney E (2008) Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* 18:821-829.

[0218] 3. Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, Salzberg SL (2007) Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics* 23:673-679.

[0219] 4. Lowe TM, Eddy SR (1997) tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res* 25:955-964.

[0220] 5. Lagesen K, Hallin P, Rodland EA, Staerfeldt HH, Rognes T, et al. (2007) RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* 35:3100-3108.

[0221] 6. Cantarel B, Korf I, Robb S, et al. (2008) MAKER: An easy-to-use annotation pipeline designed for emerging model organism genomes. *Genome Research* 18:188-196.

[0222] 7. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.

[0223] 8. Eddy SR (2009) A new generation of homology search tools based on probabilistic inference. *Genome Inform* 23:205-211.

[0224] 9. Haft DH, Selengut JD, White O (2003) The TIGRFAMs database of protein families. *Nucleic Acids Res* 31:371-373.

[0225] 10. Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, et al. (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 4:41.

[0226] 11. Suzek BE, Huang H, McGarvey P, Mazumder R, Wu CH (2007) UniRef: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters. *Bioinformatics* 23:1282-1288.

[0227] 12. Li H. and Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*, 25:1754-60.

[0228] 参考文献

[0229] Abanda-Nkpwatt, D., M. Musch, J. Tschiersch, M. Boettner, and W. Schwab. 2006. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and

seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J. Exp. Bot.* 57:4025-4032.

[0230] Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Vanderleyden J (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters* 69: 55-60

[0231] Cappellini RA, Peterson JL (1965) Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57:962-966.

[0232] Cao, Y-R, Wang, Q., Jin, R-X., Tang, S-K., He, W-X., Lai, H-X, Xu, L-H., and C-L Jiang. 2011. *Methylobacterium soli* sp. nov. a methanol-utilizing bacterium isolated from the forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek* (2011) 99:629-634.

[0233] Cappellini RA, Peterson JL (1965) Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57:962-966

[0234] Corpe, W.A., and D.V. Basile. 1982. Methanol-utilizing bacteria associated with green plants. *Devel. Industr. Microbiol.* 23:483-493.

[0235] Corpe, W.A., and S. Rheem. 1989. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62:243-250.

[0236] Correll JC, Klittich CJR, Leslie JF (1987) Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium graminearum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77:1640-1646.

[0237] Green, P.N. 2005. *Methylobacterium*. In Brenner, D. J., N. R. Krieg, and J. T. Staley (eds.). "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume two, The Proteobacteria. Part C, The alpha-, beta-, delta-, and epsilonproteobacteria." Second edition. Springer, New York. Pages 567-571.

[0238] Green, P.N. 2006. *Methylobacterium*. In Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.). "The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Volume 5. Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses." Third edition. Springer, New York. Pages 257-265.

[0239] Holland, M.A. 1997. *Methylobacterium* and plants. *Recent. Res. Devel. in Plant Physiol.* 1:207-213.

[0240] Holland, M.A., and J.C. Polacco. 1994. PPFMs and other covert contaminants: Is there more to plant physiology than just plant? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:197-209.

[0241] Kutschera, U. 2007. Plant-associated methylobacteria as co-evolved phytosymbionts. A hypothesis. *Plant Signal Behav.* 2:74-78.

[0242] Lidstrom, M.E. 2006. Aerobic methylotrophic prokaryotes. In Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.). "The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Volume 2. Ecophysiology and biochemistry." Third edition. Springer, New York. Pages 618-634.

[0243] Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, H. S. Lee, K. Hari, S. P. Sundaram, and

T.M.Sa.2005.Pink-pigmented facultative methylophilic bacteria accelerate germination,growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.)*Biol.Fertil.Soils* 41:350-358.

[0244] Madhaiyan,M.,S.Poonguzhali,M.Senthilkumar,S.Seshadri,H.Chung,J.Yang,S.Sundaram,and T.Sa.2004.Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar CO-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp.*Bot.Bull.Acad.Sin.*45:315-324.

[0245] Madhaiyan,M.,S.Poonguzhali,and T.Sa.2007.Influence of plant species and environmental conditions on epiphytic and endophytic pink-pigmented facultative methylophilic bacterial populations associated with field-grown rice cultivars.*J Microbiol Biotechnol.*2007Oct;17(10):1645-54.

[0246] Ringler,G.A.1995.Reaction of soybean to inoculation with *Fuusarium solani*.MS thesis.Univ.of Illinois,Urbana-Champaign.

[0247] Roy,K.W.,J.C.Rupe,D.E.Hershman,and T.S.Abney.19997.Sudden death syndrome of soybean,*Plant Dis.*81:1100-1111.

[0248] Rupe,J.C,E.E.Gbur,and D.M.Marx.1991.Cultivar responses to sudden death syndrome of soybean.*Plant Dis.*75:47-50.

[0249] Spelbrink RG,Dilmac N,Allen A,Smith TJ,Shah DM,et al.(2004) Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins.*Plant Physiol* 135:2055-2067.

[0250] Stanier,R.Y.,N.J.Palleroni,and M.Doudoroff.1966.The aerobic pseudomonads:A taxonomic study.*J.Gen.Microbiol.*43:159-271.

[0251] Sy,A.,Giraud,E.,Jourand,P.,Garcia,N.,Willems,A.,De Lajudie,P.,Prin,Y.,Neyra,M.,Gillis,M.,Boivin-Masson,C.,and Dreyfus,B.2001.Methylophilic *Methylobacterium* Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes.*Jour.Bacteriol.*183(1):214-220,

[0252] Sy,A.,A.C.J.Timmers,C.Knief,and J.A.Vorholt.2005.Methylophilic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions.*Appl.Environ.Microbiol.*71:7245-7252.

[0253] Vogel,H.J.,and D.M.Bonner.1956.Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial purification and some properties.*J.Biol.Chem.*218:97-106.

[0254] Vogel,H.J.1956.A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N) .*Microbial Genet Bull* 13:42-43

[0255] Whittenbury,R.,S.L.Davies,and J.F.Wilkinson.1970.Enrichment,isolation and some properties of methane-utilizing bacteria.*J.Gen.Microbiol.*61:205-218.

[0256] Wrather,J.A.2010.Soybean disease loss estimates for the United States 1996-2010.Missouri Agric.Res.Sta.,Delta Research Center.<http://aes.missouri.edu/delta/research/soyloss.htm>

[0257] 本文包含的各参考文献不被解释为申请人承认所述参考文献构成现有技术。申请人明确保留他们根据本文包含的参考文献质疑本文公开的非专利性发明的任何主张的权利。

[0258] 在已经阐明和描述了本公开的原理的情况下,可在不脱离此类原理的情况下对安排和细节进行改进,这对本领域技术人员而言应该是显而易见的。

[0259] 尽管根据各实施方案和示例性实施例描述了本公开的材料和方法,但是可在不脱离本公开的概念、精神和范围的情况下,对本文描述的材料和方法进行变化,这对本领域技术人员而言将是显而易见的。对本领域技术人员而言显而易见的所有此类置换和改进被认为在通过所附权利要求或本文公开的其它内容限定的本公开的精神、范围和概念内。

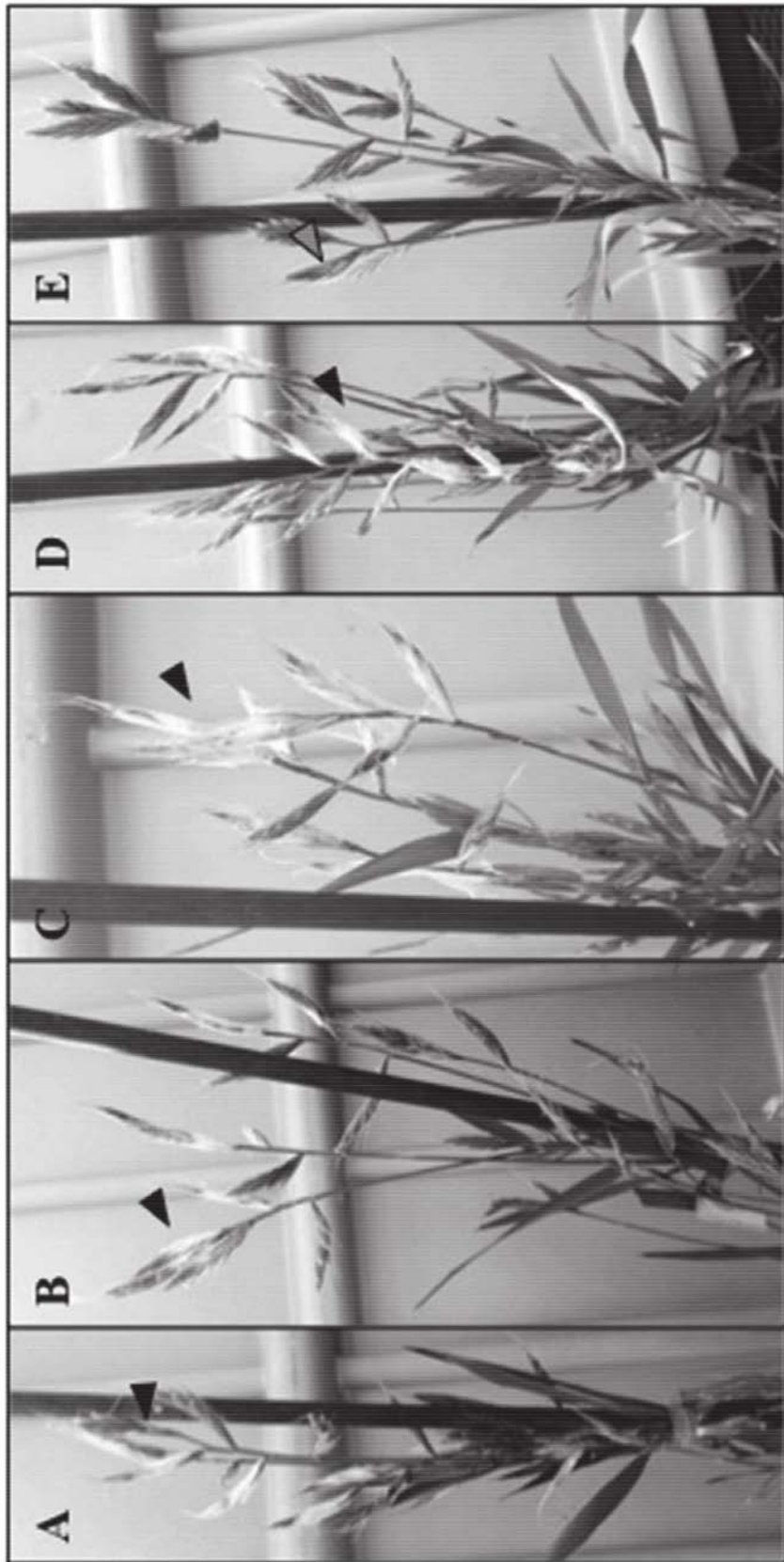


图1

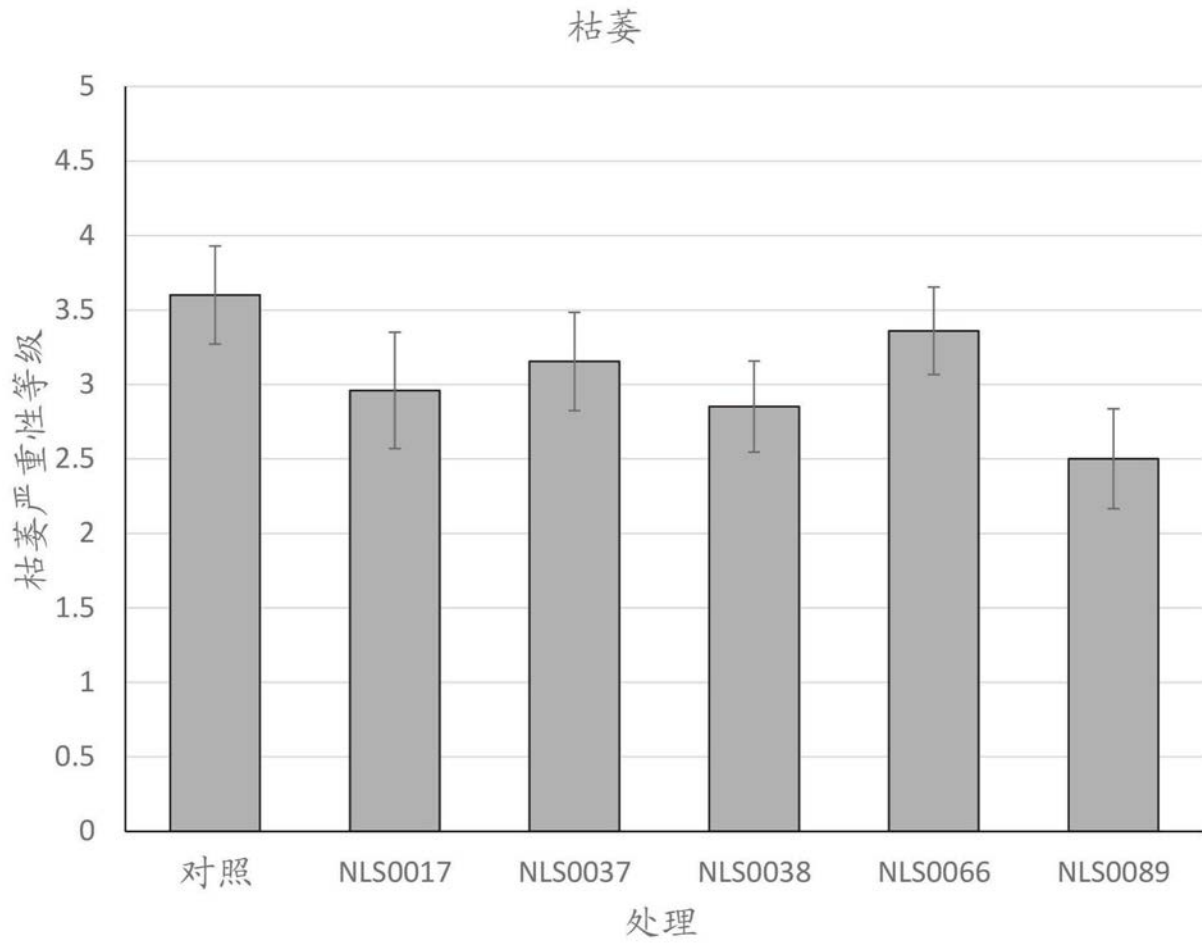


图2

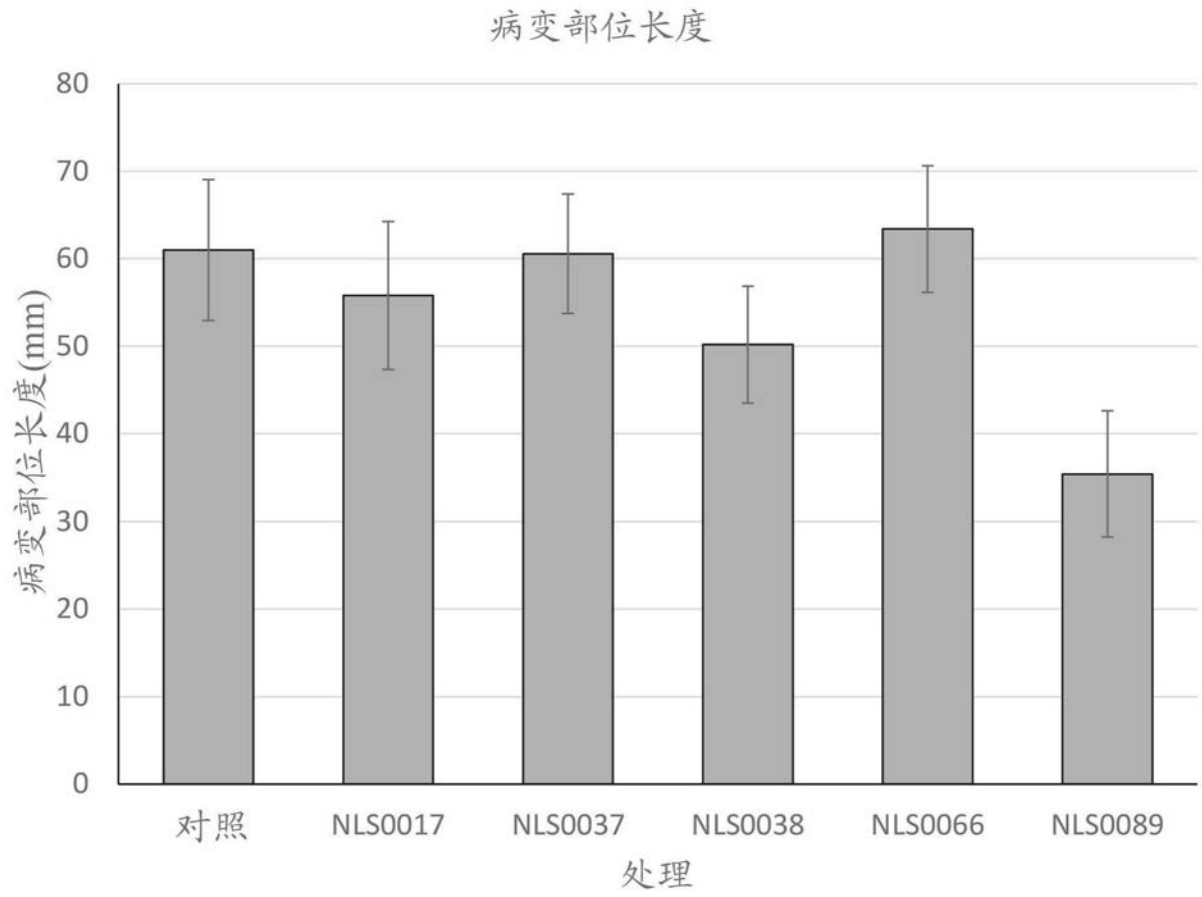


图3