



등록특허 10-2243202



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월22일
(11) 등록번호 10-2243202
(24) 등록일자 2021년04월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/14 (2018.01) *A01H 17/00* (2006.01)
A01N 63/30 (2020.01) *C12R 1/645* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 1/14 (2013.01)
A01H 17/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7009419
- (22) 출원일자(국제) 2014년09월11일
심사청구일자 2019년09월10일
- (85) 번역문제출일자 2016년04월08일
- (65) 공개번호 10-2016-0057420
- (43) 공개일자 2016년05월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/CA2014/000683
- (87) 국제공개번호 WO 2015/035504
국제공개일자 2015년03월19일
- (30) 우선권주장
61/876,469 2013년09월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
NASGA NEWS, Bee Vectoring of Biocontrol Agents., 3-5면 (2012.09.) 1부.*
US20120021906 A1
WO2007107000 A1
JP2005073586 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 생물학적 방제제로 이용하기 위한 CLONOSTACHYS ROSEA 분리 균주

(57) 요 약

본원에 기술된 진균 *Colonostachys rosea*의 분리 균주인 일명 BVT Cr-7은 식물 치료를 위한 생물학적 방제제로서 유용하다. 상기 분리 균주, 상기 균주 및/또는 상기 균주로부터 유래된 포자를 포함하는 제제는 식물 수화 개선과 식물 생장 개선을 위하여, 또는 식물내 질병 또는 병원균의 치료 또는 예방을 위하여 식물 또는 식물 재료에 적용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A01N 63/30 (2020.01)

C12R 1/645 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

*Clonostachys rosea f. rosea*의 분리 배양균으로서, 상기 분리 배양균은 *Clonostachys rosea f. rosea* 균주 IDAC 040913-01인 분리 배양균.

청구항 2

제1항의 *Clonostachys rosea f. rosea*의 분리 배양균에서 획득된 진균 포자.

청구항 3

제1항의 분리 배양균, 및

담체 또는 희석제를 포함하는 제제.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 제제가 액체 형태 또는 고체 형태인 제제.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 제제는 제제 1g 당 1×10^8 내지 4×10^8 포자, 또는 제제 1g 당 2×10^8 내지 4×10^8 포자를 포함하는 제제.

청구항 6

제2항의 진균 포자, 및

담체 또는 희석제를 포함하는 제제.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 제제가 액체 형태 또는 고체 형태인 제제.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 제제는 제제 1g 당 1×10^8 내지 4×10^8 포자, 또는 제제 1g 당 2×10^8 내지 4×10^8 포자를 포함하는 제제.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 분리 배양균, 진균 포자 또는 제제를 식물에 접촉시키는 것을 포함하는 생물학적 방제제로 식물을 치료하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 방법이

- a) 식물의 건강, 생장 및 수확 중 하나 이상을 개선하기 위한 것;
- b) 식물내 질병 및 병원균 중 하나 이상을 예방 또는 치료하기 위한 것;
- c) 식물에서 곰팡이가 성장하는 것을 방제하기 위한 것; 또는
- d) 식물 종자의 발아를 개선시키기 위한 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 병원균이 *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* spp., *Alternaria*,

Monilia, *Monilinia*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Rhizoctonia*, *Streptomyces*, *Didymella* 및 *Fusarium* 중 하나 이상이거나 또는,

상기 질병이 잣빛곰팡이병, 흰색곰팡이병, 갈색부패병, 뿌리 부패 및 포모시스 중 하나 이상인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 식물이 해바라기, 카놀라, 블루베리, 딸기, 포도, 고추, 오이, 토마토, 잔디 풀, 고추, 토마토, 브로콜리, 복숭아, 카놀라 모종, 및 억새에서 선택되는 하나 이상인 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 분리 배양균, 진균 포자 또는 제제를 식물에 접촉시키는 것이 식물에 스프레이, 미스트, 침지(dip), 또는 배양액을 적용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 분리 배양균, 진균 포자 또는 제제를 식물에 접촉시키는 것이 곤충 벡터링(vectoring)을 포함하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 분리 배양균, 진균 포자 또는 제제를 포함하는 생물학적 방제제.

청구항 16

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 분리 배양균, 진균 포자 또는 제제를 식물 재료에 접촉하는 것을 포함하고, 임의로 상기 식물 재료는 수확된 것인, 식물 재료의 부패를 감소시키는 방법.

청구항 17

생물학적 방제제를 생산하는 방법으로서, 상기 방법은

제1항의 분리 배양균으로 기질을 접종하는 것; 및

Clonostachys rosea f. *rosea* 균주 IDAC 040913-01을 생산하기 위하여 진균 생장에 적합한 조건하에서 상기 기질을 배양하는 것을 포함하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 기질이 멸균 기질, 임의로 보리 종자와 같은 멸균 종자인 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본원은 그 전체 내용이 본 명세서에 참고로 인용되는 2013년 9월 11일에 출원된 미국 분할특허출원 제 61/876,469호에 대하여 우선권을 주장한다.

[0002] 본 발명은 분리된 진균 균주 *Clonostachys rosea f. rosea*에 관한 것이고, 구체적으로는 식물 치료(treatment)를 위한 생물학적 방제제용 *Clonostachys rosea*의 분리 균주에 관한 것이다.

배경기술

[0003] *Clonostachys rosea f. rosea*는 다양한 야생식물의 조직내와 거의 모든 종의 작물 식물에서 발견되는 유익한 극미-진균(micro-fungus)이다. 진균은 세계 곳곳의 농장과 농가(nurseries), 과수원, 포도원, 목초지와 정원에 쌓인 건강한 뿌리, 잎, 줄기, 꽃과 식물의 열매에 흔히 존재한다. 진균은 북극에 가까운(sub-arctic), 시원하고 따뜻한 온대 지역, 사막과 습한 열대 구역과 같은 다양한 지역에 있는 식물과 토양에 있다고 알려져 왔다. *C. rosea*가 대량 서식하는 식물은 그 식물이 자연적으로 노화되고 죽을 때까지 진균이 존재하는 어떤 시각적 징후를 나타내지 않는다. 그즈음 진균은 포자를 형성할 수도 있으며 약간 하얗게 자라 확대경을 통해 식물의 표면에 나타난 것이 관찰될 수도 있다. 질병과 관련된 병원성 생물체와 달리, *Clonostachys*는 병변, 반점, 시들기(wilting) 또는 다른 식물내 증상을 유발하지 않는다. *Clonostachys rosea f. rosea*는 또한 식물을 치료하고 질병과 환경적인 스트레스로부터 보호하는, 식물의 생장과 생산성을 증진하는 유익한 생물학적 방제제로 알려져 있다.

[0004] Stewart 등(미국 특허 제8,101,551)은 *Clonostachys rosea* 균주 88-710에 대해 기술하고, 상기 균주는 식물 활력, 건강, 생장과 수확의 증진을 위한 이점을 가지고 있다고 언급한다.

[0005] 따라서, 식물 치료를 위한 생물학적 방제제로서 유용한 *Clonostachys rosea*의 새로운 균주에 대한 필요성이 남아있다.

발명의 내용**해결하려는 과제****과제의 해결 수단**

[0006] 본 발명자들은 진균 *Clonostachys rosea f. rosea*의 새로운 균주를 분리 및 특징지어왔다. 본원에 기술한 바와 같이 *Clonostachys rosea f. rosea*의 이러한 새로운 균주로 지정된 “BVT Cr-7”은 식물 치료를 위한 생물학적 방제제로 특히 유용하다. 본 발명의 한 측면으로, *Clonostachys rosea f. rosea* BVT Cr-7의 분리 배양균은

2013년 9월 4일, 캐나다 1015 알링턴 거리, 위니펙, 매니토바, R3E 3R2에 있는 보건 기관의 국립 미생물 연구소에 위치한 캐나다 국제 기탁 기관에 수탁번호 040913-01로 기탁되어 있다.

[0007] 실시예 1에 제시된 바와 같이, 일련의 *Clonostachys rosea f. rosea*의 다른 균주들이 생물학적 방제제로서 사용하기에 특히 이로운 특성을 갖는 균주를 확인하기 위하여 분리되고 특징지어져 왔다. *Clonostachys rosea f. rosea*의 다른 균주와 비교할 때, BVT Cr-7은 생물학적 방제제로 사용하기 위한 다수의 향상된 특성들 및/또는 바람직한 특성들의 조합을 보였다. 예를 들어, BVT Cr-7은 포자 생산의 생장과 풍요에 있어, 농작 식물의 뿌리 및 꽃을 포함하는 식물의 다양한 범위 내에서 내생 방식으로(endophytically) 수립할 수 있는 능력, 시험 식물의 잎을 식물 질병 및/또는 병원체의 넓은 스펙트럼에서 억제하거나 조절하는 능력을 향상시키거나 이에 바람직한 특성들을 나타내었다. 일 구체예에서, BVT Cr-7은 88-710 및 또는 EV1a와 같은 *Clonostachys rosea f. rosea*의 대조군 균주에 비하여 하나 이상의 개선된 특징들을 보였다.

[0008] 또한, 실시예 2-5에 제시된 바와 같이, 현장 시험 뿐만이 아니라 통제 조건에 있는 온실 식물에 BVT Cr-7의 적용은 BVT Cr-7이 다양한 조건과 매우 다양한 식물의 다수의 다른 질병에 대비하는 높은 성능을 가진 광범위한 생물학적 방제제임을 보여준다. 실시예 4에 도시 된 바와 같이, BVT Cr-7은 또한 수확 작물의 부패 또는 변색 수준을 감소시키는 것과 같이 식물 재료들의 부패를 감소시키는데 유용하다.

[0009] 그러므로, 본 발명의 일 측면은 본원에 기술된 바와 같은 *Clonostachys rosea f. rosea* 균주 BVT Cr-7의 분리 배양균을 제공하는 것이다. 일 구체예에서, 상기 균주는 2013년 9월 4일, 캐나다 1015 알링턴 거리, 위니펙, 매니토바, R3E 3R2에 있는 보건 기관의 국립 미생물 연구소에 위치한 캐나다 국제 기탁 기관에 수탁번호 040913-01로 기탁된 균주이다.

[0010] 또한, *Clonostachys rosea f. rosea* 균주 BVT Cr-7에서 발생된 포자는 물론, *Clonostachys rosea f. rosea* 균주 BVT Cr-7의 자손 및 BVT Cr-7의 분리 배양균, 포자 및/또는 자손을 포함하는 제제가 제공된다. 또한, 무성 생식을 할 수 있는 *Clonostachys rosea f. rosea* 균주 BVT Cr-7의 분리 세포가 제공된다. 일 구체예에서, 포자 형성에 적합한 조건하에 있는 기질 상의 BVT Cr-7의 분리 배양균을 배양하여 얻은 포자가 제공된다. 일 구체예에서, 규산칼슘과 같은 안정화제에 결합하는 BVT Cr-7의 포자를 포함하는 제제가 제공된다.

[0011] 일 구체예에서, 본원에 기재된 BVT Cr-7의 분리 배양균은 내생균(endophyte) 식물에 군생한다. 일 구체예에서, 식물을 BVT Cr-7과 접촉시키면 식물의 잎, 꽃, 열매 및/또는 뿌리에 영향을 미치는 질병이나 병원균이 억제 또는 방제된다. 일 구체예에서, 상기 질병은 잣빛곰팡이병, 흰색곰팡이병, 갈색부패병, 뿌리 부패 및/또는 포모시스(phomopsis)이다. 일 구체예에서, 상기 질병은 *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* 및/또는 *Pythium spp.*, *Rhizoctonia*, 및/또는 *Fusarium* 종에 의해 발생된다.

[0012] 또한, 일 구체예에서, BVT Cr-7의 접종원(inoculum)이 군생하는 식물이나 식물 재료가 제공된다. 일 구체예에서, *Clonostachys rosea f. rosea* 균주 BVT Cr-7은 식물 치료를 위한 생물학적 방제제로서 유용한 균주이다. 일 구체예에서, 본원에 기재된 *Clonostachys rosea f. rosea* 균주 BVT Cr-7을 식물과 접촉시키는 것을 포함하는 식물 치료 방법이 제공된다.

[0013] 예를 들어, 일 구체예에서, BVT Cr-7은 BVT Cr-7로 치치되지 않은 대조 식물에 대하여 식물의 건강, 생장 및/또는 수확에 유용하다. 일 구체예에서, BVT Cr-7은 식물내 질병 및/또는 병원균의 예방 또는 치료를 위해 유용하다. 일 구체예에서, BVT Cr-7은 감염된 식물에서 온 병원성 균류를 포함하는 다른 균류의 차단을 촉진하는데 유용하다. 일 구체예에서, BVT Cr-7은 병원균 감염에 대한 반응과 같은, 식물내 질병과 스트레스에 자연 내성 트리거링(triggering)으로 유용하다. 또한 식물 재료를 BVT Cr-7과 접촉시키는 것을 포함하는 식물 재료의 부패 감소 방법이 제공된다.

[0014] 일 구체예에서, BVT Cr-7은 예방 또는 질병 치료 및/또는 식물의 건강, 생장 및/또는 수확에 영향을 미칠 수 있는 병원균에 대한 식물 치료에 유용하다. 일 구체예에서, 상기 병원균은 균류 또는 박테리아와 같은 미생물이다. BVT Cr-7에 의해 방제될 수 있는, 식물의 건강, 생장 및/또는 수확에 영향을 미칠 수 있는 병원균의 예로는 *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium spp.*, *Alternaria*, *Monilia*, *Monilinia*, *Colletotrichum*, *Cladosporium Rhizoctonia*, *Streptomyces*, *Didymella* 및/또는 *Fusarium*이 포함되나 이들에 제한되는 것은 아니다. BVT Cr-7 적용에 의해 방제될 수 있는, 식물의 건강, 생장 및/또는 수확에 영향을 미칠 수 있는 질병의 예로는 잣빛곰팡이병, 흰색곰팡이병, 갈색부패병 및/또는 뿌리부패병이 포함되나 이들에 제한되는 것은 아니다. 다른 예로는 블루베리 또는 포도에 발생하는 포모시스 및 창가병(potato scab)이 포함된다.

[0015] 일 구체예에서, 식물은 *Clonostachys rosea f. rosea* 균주 BVT Cr-7에 의해 내생 방식으로 군생할 수 있는 식

물 또는 그 일부이면 무관하다. 일 구체예에서, 식물은 현화식물(flowering plant), 곡류, 협과(legume) 또는 채소이다. 예를 들어, 일 구체예에서, 본원에 기술한 방법과 이용은 현화식물과 같은 식물 또는 채소, 과일, 곡류뿐만 아니라 종자 또는 이들의 모종과 같은 농작물의 치료를 위해서도 유용하다. 일 구체예에서, 본원에 기술한 방법과 용도는 식물치료와 침엽수림의 모종/이식에 유용하다. 일 구체예에서, 식물은 소나무, 가문비나무류(black spruce) 또는 소나무 묘와 같다. 일 구체예에서, 식물은 밀, 보리, 해바라기, 카놀라, 블루베리, 딸기, 라즈베리, 포도, 감자, 고추, 오이, 토마토, 잔디 풀(turf grasses), 고추, 토마토, 오이, 브로콜리, 콜리플라워, 복숭아, 사과, 카놀라 및 장미, 제라늄, 시클라멘, 금어초, 엑사쿰(Exacum), 베고니아 또는 백합과 같은 관상용꽃(flowering ornamentals)이다. 일 구체예에서, 식물은 야외에서 재배되는 식물이다. 일 구체예에서, 식물은 온실에서 재배되는 식물이다.

[0016] 일 구체예에서, 본원에 기술한 방법과 용도는 BVT Cr-7 배양균, 포자, 또는 이들의 제제와 같은 BVT Cr-7을 식물과 접촉시키는 것을 포함한다. 일 구체예에서, BVT Cr-7 배양균, 포자, 또는 이들의 제제는 접종원으로써 유용하다. 몇 가지 구체예에서, BVT Cr-7은 식물이나 식물의 일부에 스프레이, 미스트, 침지(dip), 분말, 또는 배양액 및/또는 곤충 벡터링(vectoring)을 통하여 적용되며, 곤충 벡터링은 PCT 출원번호 PCT/CA2013/050179에 기재된 별 벡터링과 같은 방법을 본원에 그 전체가 참조로 인용되었다.

[0017] 또한, 생물학적 방제제의 생산 방법이 제공되며, 상기 방법은 분리 배양균 BVT Cr-7로 기질을 접종하고, *Clonostachys rosea f. rosea* 균주 BVT Cr-7을 생산하기 위해 상기 기질을 BVT Cr-7 균주 생장에 적합한 조건 하에서 배양하는 것을 포함한다. 임의로, 상기 방법은 또한 기질을 포자 형성을 위한 적합한 조건하에서 배양하고 접종원 생산을 위해 기질로부터 포자를 제거하는 것을 포함한다.

[0018] 본 발명의 다른 특징들과 장점들은 다음의 상세한 설명을 통해 명백해질 것이다. 그러나 본원의 바람직한 구체예를 나타내는 상세한 설명과 구체적인 예시들은 단지 예시로 주어진 것으로만 이해하여야 하는데, 이는 본 발명의 취지 및 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이기 때문이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 정의

[0020] 본원에서 사용한 “*Clonostachys rosea f. rosea* 균주 BVT Cr-7” 또는 “BVT Cr-7”은 2013년 9월 4일, 캐나다 1015 알링턴 거리, 위니펙, 매니토바, R3E 3R2에 있는 보건 기관의 국립 미생물 연구소에 위치한 캐나다 국제 기탁 기관에 수탁번호 040913-01로 기탁된 진균 균주이다. 일명 “*Clonostachys rosea f. rosea* 균주 BVT Cr-7”, “BVT Cr-7” 또는 “*Clonostachys rosea f. rosea* 균주 IDAC 040913-01”은 또한 상기 균주 또는 어떤 세포, 배양균, 포자, 및 무성 생식과 같은 방법으로 상기 균주로부터 생산된 자손을 포함한다.

[0021] BVT Cr-7 배양 또는 균류 포자 제조 방법에 대하여 당업계에 알려진 다른 방법이 사용될 수 있으며, 본원과 Sutton 등, “*Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops.” *Plant Dis* 1997;81:316-28; Sutton 등, “Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes” *Biocontrol Sci Technol* 2002;12(4):413-25; 및 미국 특허 출원 번호 2012/0021906 “Fungal Inoculant Compositions” 의 참고 문헌에 기재된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않고 참고 문헌 모두를 본원에 참조로 인용하였다.

[0022] 본원에서 사용한, “식물(plant)”은 BVT Cr-7에 의해 내생 방식으로 군생될 수 있는 식물계의 모든 개체를 의미한다. 바람직한 구체예에서, 식물은 경작 식물이다. 일 구체예에서, “식물(plant)”은 또한 덩이줄기(tubers)와 식물을 생기게 하는 종자 및/또는 모종을 포함하고 임의로 식물 재료를 포함한다. 본원에서 사용한 “식물 재료(plant material)”는 식물로부터 수확되거나 분리되고 식품으로 사용하는 것을 목적으로 하거나 질병 및/또는 병원균에 의한 감염으로 인하여 부패에 민감한 다른 용도의 재료를 의미한다. 식물 재료의 예로는 수확된 곡물, 과일과 채소를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0023] 본원에서 사용한, “내생 방식으로 군생되는(colonized endophytically)”은 숙주 식물, 또는 그것의 부분 내에 균류의 포자가 침투하여 진균 콜로니(colonies)를 형성하되, 증상의 발생이나 다른 질병의 양상, 또는 그 외에는 숙주를 해롭게 하는 것을 동반하지 않는 과정을 의미한다.

[0024] 본원에서 사용한, “생물학적 방제제(biological control agent)”는 식물의 건강, 생장, 활력 및/또는 수확을 증진하는; 발아율과 종자의 품질을 향상시키는; 질병, 해충 및/또는 악천후 또는 토양 상태와 같은 환경적 스트레스에 대한 내성을 향상시키는; 질병 또는 병원균에 맞서는 통제력과 행동(acts) 또는 질병이나 병원균으로부

터 치료 또는 예방하는데 유용한; 또는 상처 및/또는 감염으로부터 식물을 회복을 촉진시키는 물질을 의미한다. 상기 예로 본원에서 기술한 생물학적 방제제는 *Clonostachys rosea* BVT Cr-7이다.

[0025] 본원에서 사용한, “병원균(pathogen)”은 숙주 식물을 침략하고 식민지화시킬 수 있으며 식물의 건강, 생장, 활력 및/또는 수확을 감소시키는 미생물을 의미한다. 병원균의 예로 *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, 및 *Pythium*, *Alternaria*, *Monilia*, *Monilinia*, *Colletotrichum*, *Cladosporium* *Rhizoctonia*, *Streptomyces*, *Didymella* 및/또는 *Fusarium*과 같은 박테리아 및 균류를 포함하되, 이에 한정되지는 않는다.

Clonostachys rosea 식물과 식물 질병 생물의 상호작용

[0027] 이론에 한정되지 않고, *Clonostachys rosea* BVT Cr-7은 질병과 스트레스에 자연 식물 내성 유발에 의한 것을 포함하는 다양한 메커니즘을 통하여, 그리고 다른 병원균의 경쟁적 배제를 통하여 식물을 보호하는 것으로 생각된다.

[0028] *Clonostachys*는 상당수의 미세한(5-7 μ m) 콩 모양 포자를 통해 번식한다. 식물에 적용할 때, 포자는 최적의 가지를 형성하여 작은 튜브를 생산하여 빨아하고 식물 조직 안으로 침투한다. 침투는 살아있는 꽃잎, 나뭇잎, 식물 상처, 뿌리, 괴경 및 식물의 다른 부분에서 일어날 수 있다. 조직 내부에 침투하면, 각각의 가지는 미세한 균류 콜로니를 형성한다. *Clonostachys* 콜로니가 있는 식물은 질병 유발 생물(병원균)에 의해 생기는 증상을 나타내지 않는다. 식물 조직 내에서 *Clonostachys*가 내생하여 구축되면 질병과 스트레스에 대한 자연 식물 내성을 유발하는 것과 같은 유익한 효과를 미칠 수 있다.

[0029] 미세 *Clonostachys* 콜로니와 식물 조직과의 관계는 식물의 잎이 처음으로 노랗게 변하기 시작할 때, 또는 질병이나 스트레스가 생겨나기 시작할 때와 같은 식물 조직이 노화되기 시작될 때 급격히 변화한다. 이 때, 작은 콜로니는 빠르게 성장하기 시작하고 주변 조직을 보통 완전히 차지한다. *Clonostachys*는 거의 모든 다른 균류가 자라서 식물이 노화되고 죽기 전에 이러한 성장을 시작한다. 그러므로 *Clonostachys*는 노화하는 식물 조직의 개척 콜로나이저(colonizer)이다. 실제로, 파괴적인 병원균인 *Botrytis*, *Sclerotinia* 및 *Monilinia*를 포함하는 앞에서 언급한 다른 생물체는 조직을 점령한다. 조직이 점령되면, 병원균을 포함한 다른 생물체는 점령 생물체를 쫓아낼 수 없다. *Clonostachys*는 조직을 간단히 선제(pre-emptive) 점령함으로써 병원균과 다른 균류를 차단하는 성장을 할 수 있다. 이러한 경쟁적 배제의 주요 수단은 식물내 질병 생물체와 질병의 성장을 *Clonostachys*가 억제하는 것이다. 실시예에 도시된 바와 같이, *Clonostachys* BVT Cr-7은 식물의 아주 다양한 질병 및 병원균을 방제하는데 특히 효과적이다.

[0030] *Clonostachys*는 식민지화된 조직이 점진적으로 노화되고 죽을 때 포자를 생성한다. 많은 경우에 이러한 포자는 근처의 살아있는 식물내에 새로운 내생 성장 사이클을 개시한다. *Clonostachys*는 살아있는 동안에 식민지화되어 죽은 식물 재료에서도 지속될 수 있다. 그러나, *Clonostachys*는 다른 균류와 박테리아에 의해 이미 점령된 죽은 식물 재료에서는 생장을 위한 적은 능력을 가진다.

[0031] 이러한 상황에서 *Clonostachys*는 식물 잔재와 토양의 미생물 세계에 적응된 *Penicillium* 및 *Aspergillus*와 같은 미생물에 대하여 잘 경쟁하지 않는다.

[0032] *Clonostachys*는 또한 다른 균류의 균사와 균사체(즉, mycoparasite)에서 생장할 수 있는 능력을 갖고 있다. *Clonostachys*는 일반적으로 균류의 균사, 균핵 또는 다른 부분에 매우 가까이 접촉한 후에만(즉, 확실한 접촉 또는 약 1-5 μ m의 거리에서) 다른 균류를 공격한다. 이렇게 함으로써 *Clonostachys* 균사는 때때로 균류 주변을 감아 기생하고 숙주 균류를 근본적으로 죽게 한다.

[0033] 이론에 한정되지 않고, *Clonostachys*가 식물내 병원균 및 질병을 억제하는 주된 방법은 다음과 같이 생각된다: A. 빠르게 진행되는 노화나 손상된 조직은 조직내 병원균의 성장을 방해한다; 및 B, 질병을 유발하는 생물체에 식물의 자연 내성 메커니즘을 자극시킨다. 또한, *Clonostachys*는 기생(즉, 숙주의 음식 소스를 통해 성장하는)을 통하여 균류(예컨대, 토양 내 또는 위의 다양한 종류의 포자)의 생존 구조를 비활성화시키거나 죽일 수 있다. BVT Cr-7은 식물 치료를 위한 생물학적 방제제로서 특히 효과적인 다수의 특징을 보이는 *Clonostachys*의 분리 균주이다.

균주 BVT Cr-7의 속성 및 특징

[0034] 일 구체예에서, *Clonostachys*의 분리 균주인, 일명 BVT Cr-7이 제공된다. 일 구체예에서, 상기 균주는 2013년 9월 4일, 캐나다 1015 알링턴 거리, 위니펙, 매티토바, R3E 3R2에 있는 보건 기관의 국립 미생물 연구소에 위치한 캐나다 국제 기탁 기관에 수탁번호 040913-01로 기탁된 균주이다. 일 실시예에서, “*Clonostachys rosea* f.

rosea 균주 BVT Cr-7” 또는 “BVT Cr-7”은 어떤 배양균, 포자, 세포 및 무성 생식과 같은 방법으로 상기 균주로부터 생산된 자손을 포함한다. 본원에 기술 한 바와 같이, BVT Cr-7은 *Clonostachys*의 많은 다른 균주들 이상으로 다수의 유리한 속성을 보인다.

[0036] 예를 들어, 일 구체예에서, BVT Cr-7은 표준한천배지(standard agar media) 및 멸균된 곡물 종자와 같은 식물의 종자에서 포자를 생산 할 수 있다. 일 구체예에서, BVT Cr-7은 *Clonostachys rosea f. rosea*의 다른 균주 88-710(다르게는 AFr-710, PG-710로 알려진)에 비하여 표준한천배지 및 멸균된 곡물 종자와 같은 식물의 종자에서 개선된 포자 생산 능력을 가진다. 균주 88-710에 대하여는 Sutton 등의 참고 문헌에 기술된 내용 그 전체를 본 원에 참조로 인용하였다(참고 문헌: Sutton et al., *Evaluation of the Fungal Endophyte Clonostachys rosea as an Inoculant to Enhance Growth, Fitness and Productivity of Crop Plants*. Proc. IVth IS on Seed, Transplant and Stand Establishment of Hort. Crops Ed.: D.I. Leskovar, Acta Hort. 782, ISHS 2008 pp. 279-286). 일 구체예에서, 곡물 종자는 밀 또는 보리 종자이다. 일 구체예에서, BVT Cr-7은 식물 치료에 이용하기 위한 접종원 제조에 유용하다.

[0037] 한 측면에서, BVT Cr-7은 식물내에서 내생 방식을 구축할 수 있다. 일 실시예에서, BVT Cr-7은 농작물의 뿌리와 같은 식물의 뿌리내에서 내생 방식을 구축할 수 있다. 일 실시예에서, BVT Cr-7은 *Clonostachys rosea f. rosea*의 다른 균주 88-710과 비교할 때, 식물의 뿌리내에서 내생 방식을 구축하는데 향상된 능력을 가진다. 예를 들어, 일 실시예에서 BVT Cr-7은 농작 식물 및/또는 작은 그레인드(grained) 시리얼, 잔디 풀, 원두콩, 카놀라, 대두, 고추, 토마토 및 오이와 같은 식물내에서 내생 방식을 구축하는데 개선된 능력을 가진다.

[0038] 일 구체예에서, BVT Cr-7은 식물의 잎 및/또는 꽃 내에 내생 방식을 구축할 수 있다. 일 구체예에서, BVT Cr-7은 *Clonostachys rosea f. rosea*의 다른 균주 88-710과 비교할 때, 식물의 잎 및/또는 꽃 내에 내생 방식을 구축하는데 향상된 능력을 가진다. 예를 들어, 일 구체예에서, BVT Cr-7은 미니 로즈의 잎 및/또는 꽃, 딸기, 해바라기 및 카놀라의 꽃 내에서 내생 방식을 구축하는데 개선된 능력을 가진다.

[0039] 한 측면에서, BVT Cr-7은 식물내 질병을 억제 및/또는 방제할 수 있다. 일 구체예에서, BVT Cr-7은 다른 균류 또는 미생물과 같은 병원균에 의해 발생되는 식물내 질병을 억제 및/또는 방제할 수 있다. 일 구체예에서, BVT Cr-7은 *Clonostachys rosea f. rosea*의 다른 균주 88-710과 비교할 때, 개선된 능력으로 식물내 질병을 억제 및/또는 방제할 수 있다. 예를 들어, 일 구체예에서, BVT Cr-7은 잎, 꽃, 열매 및/또는 뿌리에 영향을 미치는 질병을 개선된 능력으로 억제 및/또는 방제할 수 있다. 일 구체예에서, 질병은 *Botrytis cinerea*(잿빛곰팡이 병), *Sclerotinia sclerotiorum*(흰색곰팡이 병) 및/또는 *Pythium* spp., *Rhizoctonia*, 및/또는 *Fusarium*(뿌리부패 및 다른 질병들) 종에 의해 발생되는 질병이다.

[0040] 일 구체예에서, BVT Cr-7은 식물 재료의 부패를 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 일 구체예에서, BVT Cr-7을 스프레이에 의해 접촉시킨 수확된 식물 재료는 처치되지 않은 식물 재료보다 부패 발생이 감소한다.

식물 및/또는 식물 부분에 BVT Cr-7의 적용

[0042] 일 구체예에서, 본원에 기술한 방법과 이용은 BVT Cr-7을 식물 또는 식물 재료에 접촉하는 것을 포함한다. 일 구체예에서, BVT Cr-7은 식물 또는 식물 재료의 내생 군생화(endophytic colonization)를 부추기기 위해 식물 또는 식물 재료에 노출된다. BVT Cr-7은 스프레이, 미스트, 침지, 배양액, 및/또는 곤충 벡터링(vectoring) 적용에 의존하는 것을 포함한 알려진 모든 방법에 의해 식물의 잎, 꽃, 뿌리, 꽈경 및/또는 종자를 포함하는 식물의 어떤 부분에 적용될 수 있다.

[0043] 예를 들어, 이식을 위한 어린 식물을 토양 미디움(medium)을 흡뻑 적시거나 이식 시, 식물을 침지하는 것에 의해 치료 할 수 있다.

[0044] 또 다른 예로, 병원균에 감염되어 질병에 걸린 꽃은 스프레이 치료 또는 PCT 공개번호 WO2012/135940 및 PCT 출원번호 PCT/CA2013/050179(본 명세서에 그 전체가 참조로 인용됨)에 기술된 벌-벡터링 기술과 같은 곤충 벡터링에 의해 *Clonostachys rosea* BVT Cr-7을 꽃에 적용함으로써 질병을 종종 효과적으로 방제할 수 있다. 일 실시예에서, 벌 벡터링은 벌이 날마다 갓 피는 꽃에 *Clonostachys*를 나르기 때문에 꽃이 피는 농작물을 위한 치료에 허용된다(대조 예는, 매주 스프레이).

[0045] 다른 예시적인 적용은 잎 위와 줄기 상처 내에 존재하면서 디-리핑(de-leaving) 및 다른 가지를 치게 만드는 *Botrytis*와 같은 병원균을 방제하기 위해 매우 낮은 볼륨의 미스트 또는 종래의 스프레이에 의해 온실 농작물의 잎에 *Clonostachys*를 적용하는 것을 포함한다; *Clonostachys*를 통한 골프 코스에 있는 잔디의 스프레이 치료는

달러스폿(dollar spot)(*Sclerotinia*), 홍색설 부페병(snow molds)(*Typhula*, *Microdochium*) 및 다른 일 질병을 방제하기 위한 것이다; *Clonostachys*의 적용은 것 생긴 상처(48시간 이내)에 많은 상처를 감염시키는 질병 생물체에 맞서 방어할 수 있는 긴 시간을 접목, 절단, 및 상처난 식물에 자주 제공한다. 그리고 종자는 농작물의 능력을 향상시키기 위하여 *Clonostachys*로 치료될 수 있으며(뿌리 시스템내에 균류가 성장한 다음), 필드피(field peas)와 같은 농작물이 생산 활동에 의해 스트레스를 받을 때(특정 농약의 사용을 포함하여) 지속적인 생장을 할 수 있는 능력을 향상시킨다.

- [0046] 일 구체예에서, 본원에 기술된 BVT Cr-7은 카놀라, 해바라기, 라즈베리, 블루베리, 딸기, 사과, 배, 키위, 수박, 커피, 망고, 아보카도, 체리, 자두, 아몬드, 복숭아, 캐슈, 구아바, 알팔파(alalfa), 메밀, 클로버, 콩, 완두콩, 양파, 대두, 목화, 겨자, 블랙베리, 구스베리, 고추, 가지, 및 건포도를 포함한 다양한 농작물에서 *sclerotinia sclerotiorum*, *monilinia vaccinii-corymbosi*, 및/또는 *botrytis cinerea*와 같은 병원균을 방제하는데 유용할 수 있다.
- [0047] 일 실시예에서, BVT Cr-7은 식물에 단일투여노출(single dose exposure) 또는 다중투여(multiple doses) 또는 상이한 시간(exposures at different times)에 투여하는 방식으로 적용될 수 있다. 예를 들어, 일 구체예에서, 스프레이 또는 적절한 접종원 디스펜서(dispenser)가 장착된 벌집을 통한 곤충 벡터링에 의해 최소 2일, 4일, 1주, 2주, 1달 또는 1달 이상 떨어져 식물은 BVT Cr-7을 투여받거나 이에 노출된다.
- [0048] 일 구체예에서, 식물은 타겟 식물의 연간 성장 사이클 동안 BVT Cr-7에 한번 이상 접촉된다. 예를 들어, 일 구체예에서, BVT Cr-7은 식물에 생장 계절의 시작인 봄 및/또는 생장 계절 끝인 가을에 적용된다. 일 구체예에서, BVT Cr-7은 식물에 식물 재료의 수확하기 1주, 2주, 3주 전 또는 식물 재료의 수확하기 4주 전에 적용된다.
- [0049] 접종 식물을 위한 제제
- [0050] 한 측면에서, 제공되는 제제는 접종 식물 또는 식물 재료에 적합한 BVT Cr-7을 포함한다. 선택적으로, 제제는 분말 제제와 같은 고체일 수 있으며, 또는 수액(aqueous solution)과 같은 수용액일 수 있다. 일 구체예에서, 제제는 BVT Cr-7의 동결 건조된 포자를 포함한다. 일 구체예에서, 본원에 기술된 제제는 식물 치료를 위한 접종 제로서 유용하다.
- [0051] 일 구체예에서, 제제는 *Clonostachys rosea f. rosea* 균주 BVT Cr-7로부터 파생된 분리 배양균 또는 균류 포자와 함께 다양한 첨가제 조합을 포함할 수 있다.
- [0052] 당업자는 제제 내 세포 또는 포자의 농도가 제제가 사용되는 조건(예를 들어, 기후, 타겟 식물, 식물 또는 식물 재료에 제제를 적용하는 방법 등)에 따라 다양해질 수 있음을 알 것이다.
- [0053] 몇 가지 구체예에서, 제제는 고체 제제이고 제제 그램 당 약 1×10^8 에서 약 4×10^8 사이의 포자를 포함할 수 있으며, 선택적으로 제제 그램 당 약 2×10^8 에서 약 4×10^8 포자 사이이다.
- [0054] 몇 가지 구체예에서, 첨가제는 하나 이상의 안정화제(stabilizing agent), 수분 흡수제, 유인제(attracting agent), 희석제, 및/또는 고결방지제(anti-caking agent)를 포함한다. 몇 실시예에서, 첨가제는 두 개 이상의 안정화제, 수분 흡수제, 유인제, 희석제, 및/또는 고결방지제를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 제제는 본원에서 참조로 인용한 PCT/CA2013/050179에 기술된 곤충 벡터링에 적합하다.
- [0055] 일 구체예에서, 제제는 안정화제를 포함한다. 안정화제는 부페, 분해(breaking down), 또는 균류 포자가 식물 타겟에 우선하여 전달되는 것을 예방 또는 최소화 하는 역할을 한다. 안정화제의 예로는 미립자 규산칼슘을 포함한다. 예를 들어, 몇 가지 구체예에서, 제제는 균류 포자를 포함하고, 균류 포자는 적어도 규산칼슘 일부에 결합될 수 있다. 규산칼슘과 결합되어 있는 제제는 그램 당 약 1×10^9 에서 4×10^9 의 포자 밀도를 가질 수 있다. 일 구체예에서, 규산칼슘과 결합되어 있는 제제는 그램 당 약 2×10^9 의 포자를 가질 수 있다.
- [0056] 일 구체예에서, 제제는 수분 흡수제를 포함한다. 수분 흡수제는 제제가 상대적으로 건조하고 제제의 고결 또는 응집을 방지하기 위하여 제제로부터 습기를 흡수하는 역할을 한다. 수분 흡수제의 예로는 실리카겔 입자 또는 비즈(beads)와 같은 건조제(dessicants), 및 소듐 폴리아크릴레이트(sodium polyacrylate)와 같은 고 흡수성 중합체를 포함한다. 수분 흡수제의 또 다른 예로 대팻밥(wood shavings), 및 클레이볼(clay balls)을 포함한다.
- [0057] 일 구체예에서, 제제는 유인제를 포함한다. 유인제는 식물 및/또는 매개 곤충을 제제로 유인하는데 도움이 될 수 있다. 예를 들어, 유인제는 순수 양전하를 띠 수 있으므로, 순수 음전하를 띠는 식물 및/또는 매개 곤충을

정전기적으로(electrostatically) 제제로 유인된다. 몇 가지 구체예에서, 유인제는 미네랄, 또는 미네랄 혼합물을 포함할 수 있다. 일 특정 예에서, 유인제는 DYNA-MIN™ 이름으로 판매되는 Agric-Dynamics(Martins Creek, PA) 미네랄 혼합물을 포함할 수 있으며, 이 유인제에는 다음과 같은 미네랄이 포함되어 있다; 이산화규소, 산화알루미늄, 칼슘, 철, 마그네슘, 칼륨, 나트륨, 인, 티타늄, 망간, 스트론튬, 지르코늄, 리튬, 루비듐, 봉소, 아연, 바나듐, 크롬, 구리, 이트륨, 니켈, 코발트, 갈륨, 세슘, 스칸듐, 주석, 몰리브덴, 및 추가적인 미량 원소. 다른 예에서, 유인제는 칼슘 석회석을 포함할 수 있다.

[0058] 일 구체예에서, 제제는 희석제를 포함한다. 희석제는 적절한 스타치(starch) 또는 가루(fLOUR)가 될 수 있다. 예시의 상기 제제는 곤충 벡터링에 의해 전달이 될 수 있고, 희석제는 곤충을 자극하거나 곤충에게 해를 끼치지 않아 선택될 수 있는, 곤충에 의해 먹히지 않은 것이 선택될 수 있다. 희석제는 또한 수분의 상당량을 흡수하지 않고, 응집되지 않는 것이어야 한다. 희석제의 예로는 곤충 벡터링으로 적합한 옥수수 가루, 및 호밀, 밀, 쌀 가루와 같은 곡물 가루, 및 가축사료(spelt)의 가루가 될 수 있다. 대체적인 예로, 희석제는 카올린(kaolin)이 될 수 있다. 다른 예에서 희석제는 분유 또는 탈크를 포함할 수 있다. 예시에 제시한 이러한 희석제들은 제제가 곤충 벡터링, 스프레이에 의해 옮겨지는 방식 외에도 특히 유용할 수 있다.

[0059] 일 구체예에서, 제제는 적절한 고결방지제를 포함한다. 고결방지제의 일 특정 예로는 산화마그네슘이 있다. 당업자에게 알려진 다른 고결방지제는 본원에 기술된 제제가 또한 사용될 수 있다.

[0060] 일 구체예에서, 제제는 수액과 같은 액체 제제이다. 일 구체예에서, 제제는 약 1에서 6×10^5 spores/mL 및 선택적으로 약 2에서 5×10^5 spores/mL를 포함한다. 일 구체예에서, 제제는 액체 제제 및 하나 이상의 농업적으로 적합한 담체 또는 희석제이다. 일 구체예에서, 액체 제제는 하나 이상의 안정화제를 포함한다.

[0061] 또한 제공하는 것은 BVT Cr-7의 효과적인 양을 포함하는 접종제와 같은 본원에 기술한 생물학적 방제제의 생산방법이다.

[0062] 예를 들어, 일 구체예에서, BVT Cr-7의 분리 배양균을 제공하는 것을 포함하는 하나의 방법을 제공한다; 기질을 BVT Cr-7의 분리 배양균으로 접종하고 균류 생장에 적합한 조건에서 기질을 배양한다. 일 구체예에서, 접종된 기질은 상대 습도가 90% 또는 95%보다 높고, 섭씨 20-24 범위의 온도에서 배양한다.

[0063] 일 구체예에서, 상기 기질은 멸균 기질이다. 일 실시예에서, 방법은 또한 균류의 포자 형성에 적합한 조건에서 기질이 배양되는 것을 포함한다. *Clonostachys rosea*의 균류 포자 형성에 적합한 조건은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 일 구체예에서, 균류의 포자 형성을 위한 적합한 조건은 BVT Cr-7이 약 섭씨 20-24의 온도와 높은 수준 습도(약 95%보다 많은)의 멸균된 종자와 같은 기질에서 자라고, 균류가 생장하기 며칠까지 상대 습도를 약 50%, 선택적으로 약 20-50%, 35-45% 또는 약 20-25%보다 적게 감소시키고, 풍부한 포자 생산을 하도록 최소 10일, 최소 2주 또는 2주보다 오래 지내는 것을 포함한다. 발명자들은 상대 습도 수준을 최소 약 2주 동안 약 35-45%로 감소하는 것이 BVT Cr-7의 균류 포자 생산에 특히 효율적이라는 것을 밝혀왔다. 일 구체예에서, 멸균된 종자는 보리 종자이다. 일 구체예에서, 기질은 포자 생산을 통해 공기가 통하게 된다. 기질은 다른 미생물의 오염을 피하기 위하여 가급적이면 멸균된 조건에서 배양된다.

[0064] 일 구체예에서, 방법은 또한 상기 기질로부터 수액 안에서 부유하는 포자를 선택적으로 제거하는 방법을 포함한다. 일 구체예에서, 포자는 기질로부터 접종원을 생산하기 위해 제거된다. 임의로, 포자는 기질로부터 제거되고 동결 건조 또는 생물학적 방제제를 생산하기 위한 당업계에 알려진 과정대로 처리될 수 있다. 일 구체예에서, 방법은 접종원을 본원에 기술한 제제를 생산하기 위하여 하나 이상의 안정화제, 수분 흡수제, 유인제, 희석제, 및/또는 고결방지제와 같은 추가 제제와 혼합하는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 방법은 기질과 멸균한 물의 혼합물에 의해 기질로부터 포자를 제거하는 방법을 포함한다. 일 구체예에서, 방법은 혼합물을 흔들고, 덩어린 진 것 또는 코스(course) 물질들을 여과하며, 여과액을 부드럽게 원심분리하고 수액 생산을 위해 펠렛(pelleted) 물질을 재현탁(resuspending)한다.

추가적인 구체예

[0066] 일 구체예에서 본원에 기재된 바와 같이 식물 또는 식물 재료에 BVT Cr-7을 투여하는 것을 포함하는 식물 병원균 방제 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 BVT Cr-7 분리균, 포자 및 제제는 식물 또는 식물 재료내 특히 *Botrytis* 또는 *Sclerotinia*와 같은 병원성 균류에 의한 감염을 일으킬 가능성을 약화시키기 위한 예방제로 사용될 수 있다.

[0067] 또한 식물내 병원균 방제를 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 종자 무리를 배양균 또는 본원에 공개된 제제와

함께 처치하여 처치된 종자를 식물로 재배하는 것을 포함한다.

[0068] 또한 제공되는 제제는 본원에 기술된 담체 또는 희석제와 같은 BVT Cr-7을 포함하고, 선택적으로 또한 항진균제(antifungal agent) 또는 살충제와 같은 추가적인 생물학적 방제제를 포함한다. 제제는 종자 치료 제제, 식물 치료 제제, 또는 토양 치료 제제 일 수 있다. 일 구체예에서, 담체 또는 희석제는 제제의 안정성 및 성능을 보장하는 농업용으로 승인된 담체 또는 희석제이다. 일 구체예에서, 상기 담체 또는 희석제는 농업용으로 승인된 생물학적 방제제와 호환되고, 좋은 흡수력과 적합한 부피밀도를 가지며 입자의 확산과 부착이 쉽게 일어난다.

[0069] BVT Cr-7을 포함하는 본원에 기술한 제제는 예를 들어, 식물의 종자 또는 번식체, 성장 배지(예를 들어, 토양 또는 물), 식물의 뿌리 및/또는 식물의 잎, 식물의 꽃이나 암술 또는 이들의 어떤 임의의 조합에 적용될 수 있다. 본 제제로 치료될 수 있는 대표적 식물은 종자작물, 곡식작물, 섬유작물, 두류(pulse crops), 원예작물, 산림작물과 잔디 풀과 같은 농업용 농작물을 포함하되, 한정되지는 않는다.

[0070] 본원에 기술된 BVT CR -7을 포함하는 제제는 수성 스프레이와 당업계에서 확립된 일반적인 과립 및 먼지/분말 제제로 식물에 적용될 수 있다. 수성 스프레이는 일반적으로 수화제(wettable powder) 또는 BVT Cr-7의 분리 배양균이나 포자의 유화성(emulsifiable) 농축 제제와 상대적으로 많은 물을 혼합하여 분산액을 형성하여 제조된다.

[0071] 상기 개시는 일반적으로 본 발명을 기술한다. 더욱 완전한 이해는 다음의 구체적인 실시예를 참조하여 얻을 수 있다. 이러한 실시예는 예시의 목적으로만 설명하고 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 형태와 균등률의 치환은 현재 상황을 기반으로 하여 임시 방편을 대체하는 것으로 고려될 수 있다. 특정 용어들이 본원에 사용되었으나 이러한 용어들은 기술적 의미이고 목적의 제한이 아닌 것으로 의도된다.

[0072] 다음의 비 제한적인 실시예들은 본 발명의 실례이다:

실시예

실시예 1: *Clonostachys rosea f. rosea* 균주 BVT Cr-7의 분리

[0075] *Clonostachys roseum f. roseum*의 새로운 균주 소스로 가능한 여러 종류의 농작물(밀, 대두, 옥수수, 알팔파, 잔디)은 온타리오 웰프(Guelph) 근처의 농장에서 수확하였다. 본원에 기술된 BVT Cr-7 진균 균주는 온타리오 알케(Arkell) 근처의 농장에서 가져온 건강한 어린 밀 초목(초기 분열 단계)의 뿌리에서 분리하였다. 일련의 *Clonostachys rosea f. rosea*(BVT Cr-1에서 BVT Cr-14)의 다른 균주들 또한 아래에 명시한대로 분리하였다.

[0076] 밀 초목 및 다른 농작물의 뿌리로부터 *Clonostachys* 균주를 분리하기 위하여 사용된 절차는 다음과 같다. 무균(Aseptic) 기술이 전반에 걸쳐 사용되었다. 여러 식물 뿌리의 흙을 제거하기 위하여 수돗물로 세척하고, 페이퍼 타월에서 건조한 다음 1-2cm 길이의 조각으로 잘랐다. 이 조각들을 페이퍼 티슈로 건조하고 20-22°C에서 페트리디쉬 내 파라콰트-클로람페니콜(Paraquat-chloramphenicol) 한천 배지에서 배양하였다. 파라콰트는 뿌리의 노화를 가속화시킴으로써 뿌리의 표면 위에서 뿌리를 미리 점령하듯 *Clonostachys*가 상대적으로 빠르게(예를 들어, 6-8 일 내에) 포자를 형성할 수 있도록 한다. 포자 형성 구조(분생 포자 및 분생자가 낳은)는 균류를 기반으로 인식 및 식별된다. 분생자(즉, 포자)는 배양균에서 제거되고 발아할 수 있다.

[0077] 균류 분리를 위하여, 포자는 뿌리 상의 분생 포자에서 멸균된 니들(needle)을 통해 스트렙토마이신(박테리아를 억제하기 위한)으로 개선된 PDA (potato dextrose agar) 배지가 담긴 페트리디쉬로 옮겼다. 포자가 발아하여 한천 배지에서 콜로니를 형성한 후에, 균류는 페트리디쉬 내에 PDA-스트렙토마이신으로 계대 배양(subcultured)하였다. 계대 배양된 포자는 멸균 종류수에서 부유되고, 이 부유액은 순차적으로 희석되어 PDA에 퍼진다. 단일 포자에서 생장한 콜로니는 새로운 페트리디쉬 내 한천 배지로 옮겨지고 4°C에서 배양을 지속하며 생물학적 방제제로서 가능한 특성을 가질 때까지 연속적으로 분리하였다.

[0078] 다음으로 일련의 분리 균주는 검사 및 각각을 비교하여 88-710 및 EV-1a를 포함하는 *Clonostachys rosea f. rosea*의 균주로 확립하였다. 균주 88-710은 Sutton 등의 참고 문헌(Evaluation of the Fungal Endophyte *Clonostachys rosea* as an Inoculant to Enhance Growth, Fitness and Productivity of Crop Plants. Proc. IVth IS on Seed, Transplant and Stand Establishment of Hort. Crops Ed.: D.I. Leskovar, Acta Hort. 782, ISHS 2008 pp. 279-286)에 기술되어 있다(본원에 참고 문헌 전체가 참조로 인용).

[0079] 분리된 균주 BVT Cr-7 [Bee-Vectoring Technology *Clonostachys rosea* #7]은 실시예 2와 3에 명시한 실험을 통하여 우수한 분리체로 확인되었다. BVT Cr-7의 분리 배양균은 유지되어 2013년 9월 4일, 캐나다 1015 알링턴

거리, 위니펙, 매니토바, R3E 3R2에 있는 보건 기관의 국립 미생물 연구소에 위치한 캐나다 국제 기탁 기관에 수탁번호 040913-01로 기탁하였다.

[0080] 실시예 2: 다른 균주들에 대한 *Clonostachys rosea f. rosea*의 테스트 및 특성화

새롭게 분리된 균주 BVT Cr-7 및 두 개의 *Clonostachys rosea f. rosea*(88-710 및 EV-1a)의 추가적인 균주를 식물 치료를 위한 생물학적 방제제로서 이들의 특성을 평가하기 위해 고안된 일련의 실험들을 통하여 비교하였다. BVT Cr-7은 각각의 다음 기준에 근거하여 88-710 및/또는 EV-1a에 비하여 동등하거나 우수한 것으로 판찰되었다;

* 표준한천배지와 멸균된 시리얼 종자(밀 및 보리)와 같은 기질 상에서 생장 및 포자의 풍요는 상업용 접종원 생산을 위해 사용될 수 있다.

* 작은 그레인드 시리얼, 잔디 풀, 완두콩, 카놀라, 대두, 고추, 토마토, 및 오이를 포함한 다양한 종류의 농작 식물 뿌리 내(내생 방식으로)에서 풍부하게 구축할 수 있는 능력.

* 여러 테스트 식물(미니 로즈, 딸기, 해바라기, 카놀라)의 잎 및 꽃 내에서 내생 방식을 구축할 수 있는 능력

* 특히, *Botrytis cinerea*(잿빛곰팡이병), *Sclerotinia sclerotiorum*(흰색곰팡이병) 및 *Pythium spp.*, *Rhizoctonia*, 및 *Fusarium*(뿌리부패 및 다른 질병) 종에 의해 발생되어 잎, 꽃, 열매 및 뿌리에 영향을 주는 광범위한 파괴적인 질병을 억제 및 방제할 수 있는 능력.

그러므로 BVT Cr-7은 다양한 종류의 농작물 내에서 다양한 질병에 대항하는 훌륭한 성능 프로필(profile)을 나타내고, 일반적으로 88-710 및/또는 EV-1a에 비하여 생물학적 방제제로서 훌륭한 활성을 나타낸다.

[0087] 실시예 3: 식물내 질병 방제를 위한 BVT Cr-7의 성능

BVT Cr-7은 활성 평가를 위하여 현장 시험으로 일련의 식물들과 농작물에 적용되었다. 특히, BVT Cr-7은 특정 병원균에 의해 발생되는 질병을 방제하기 위하여 다음과 같은 식물들의 꽃에 적용되었다(별 매개체 또는 스프레이 치료를 통하여):

* 해바라기: *Sclerotinia*, *Botrytis*, 및 *Fusarium*

* 카놀라: *Sclerotinia*

* 블루베리: *Monilinia*, *Sclerotinia*, *Botrytis* 및 *Phomopsis*

* 딸기: *Botrytis*, *Phomopsis*, 및 *Rhizopus*

* 라즈베리: *Botrytis*

* 포도: *Botrytis*, *Phomopsis*

또한 BVT Cr-7은 온실 수경 농작물 뿌리에 적용되었고(배양액을 통하여), 고추, 오이 및 토마토에서 *Pythium* 및 *Fusarium*에 의해 발생되는 질병을 방제하는 것이 관찰되었다.

BVT Cr-7은 잔디 풀, 온실 고추 및 온실 토마토의 잎(스프레이를 통하여)에 적용되었다. BVT Cr-7은 *Sclerotinia*, *Typhula*, 및 *Microdochium*에 의해 잔디 풀에, *Fusarium*에 의해 온실 고추에, 그리고 *Botrytis*에 의해 온실 토마토에 발생하는 질병을 방제하는 것이 관찰되었다.

[0097] 딸기 치료를 위한 BVT Cr-7의 현장 시험

현장은 온타리오에 있는 네 개의 범블비(bumble bees) 콜로니가 위치한 4-에이커(acre)의 유기농 딸기 농장 가운데에서 수행되었다. 각 콜로니 박스(“벌집”)에는 벌들이 빠져나올 때 BVT Cr-7의 분말 제제를 벌에 묻히기 위한 디스펜서(dispenser)가 함께 설치되었다. BVT Cr-7은 농장을 가로질러 딸기 꽃의 80% 이상에서 발견되었다. BVT Cr-7 벌 매개 농장 내 열매 부패 수준은 근처의 처치되지 않은 유기농 딸기 농장에 비하여 매우 낮았다. 이러한 시험에서 BVT Cr-7은 *Botrytis* 베리 부패를 >90%까지, 포모시스 베리 부패를 100%까지, 그리고 *Rhizopus* 부패(“리크(leak)”)를 93%까지 억제하였다.

[0099] 해바라기 치료를 위한 BVT Cr-7의 현장 시험

범블비에 의한 BVT Cr-7의 현장 백터링 테스트는 리플리 온타리오 근처에 있는 해바라기에 실시되었다. 이 지역에서 BVT Cr-7로 처치된 농장과 대조군 농장(벌 또는 BVT Cr-7이 없는)에서 수확된 종자는 실험실 분석을 통해

비교되었다. 별 매개 치료 종자의 발아는 대조군 종자(즉, 89.7%가 70.7%에 비하여)보다 27% 높았다. BVT Cr-7 치료 또한 종자의 여러 바람직하지 않은 곰팡이(*Fusarium*, *Botrytis*, 및 *Penicillium*)의 수준을 감소시켰다.

[0101] 범블비는 벌집에서 꽃까지 최소 360m를 강하게 매개하였다. BVT Cr-7은 해바라기 머리의 꽂 부분과 종자에 높은 비율의 내생 방식을 효과적으로 구축하였다. 파괴적인 병원균 *Sclerotinia*는 BVT Cr-7에 의해 점령당한 해바라기의 머리에서는 발견되지 않았으나, 벌을 매개로 하는 BVT Cr-7의 범위를 벗어난 머리의 20-25%에서는 존재하였다. 재배자들은 종자 수확이 20% 이상 증가(BVT Cr-7 수분 플러스의 영향)하고 더 나은 품질, 특히 종자의 크기가 보다 큰 것(따라서 더 많은 오일)과 수확된 종자의 곰팡이 감소를 보고하였다.

[0102] 블루베리 치료를 위한 BVT Cr-7의 현장 시험

[0103] 시험은 프린스 에드워드 아일랜드에서 실시되었으며, 범블비를 통한 BVT Cr-7을 분말 제제 또는 포자를 물에 부유한 스프레이 방식으로 로우부시블루베리(low bush blueberries)의 꽂, 열매(berries) 및 잎 내에 내생 방식을 구축할 수 있도록 적용하였다. 치료는 건강한 열매의 비율을 70-100%까지 증가시켰다. BVT Cr-7은 기상 조건이 질병에 매우 유리할 때를 포함하여 균류 *Monilinia vaccinii-corymbosae*에 의해 발생되는 주된 블루베리 질병으로 생기는 머미-베리(mummy-berry)의 발생 정도를 강하게 감소시켰다. BVT Cr-7은 또한 갈변(browning) 및 열매의 조기 낙하를 현저하게 감소시켰고, 우리는 지금까지 기술되지 않은 *Sclerotinia sclerotiorum*에 의해 발생되는 질병 때문이라는 것을 발견하였다. 시험 1년 동안, *Sclerotinia* 질병은 치료되지 않은 블루베리에서 최소한 머미-베리 만큼의 손상을 입혔다. 적절한 시기의 BVT Cr-7 스프레이 적용은 온타리오에 있는 로우부시블루베리 및 시험내 하이부시블루베리에서 *Phomopsis* 동고병(canker)을 예방하는데 효과적이었다. 그러므로 BVT Cr-7은 농장에 있는 블루베리에 영향을 미치는 주요 질병을 예방하는 광범위한 효능을 지닌 생물학적 방제 도구이다.

[0104] 그러므로 *Clonostachys rosea f. rosea* 균주 BVT Cr-7은 많은 농작물 종류의 주요 경제적 중요성과 관련된 광범위한 질병을 방제할 수 있다.

[0105] 실시예 4: 통제 조건 내 BVT Cr-7의 성능

[0106] BVT Cr-7은 생물학적 방제제로서 사용을 평가하기 위하여 다수의 특정 농작물에 테스트 되었다:

[0107] A. 카놀라 종자: BVT Cr-7로 치료된 종자는 멸균 토양내 *Rhizoctonia solani* 및 필드 토양내 *Pythium* 뿌리썩음병(root rot)의 매우 공격적인 균주를 매우 강하게 억제하였다.

[0108] B. 수확된 당근(뿌리): BVT Cr-7은 모의(simulated) 저장고에 있는 당근에 있는 병원균과 함께 배양될 때 균핵병(*Sclerotinia* rot)을 크게 억제하였다.

[0109] C. 브로콜리 머리: BVT Cr-7 스프레이 치료는 저장된 브로콜리 머리의 *Alternaria*, *Cladosporium* 및 조기 변색을 방제하였다.

[0110] D. 복숭아: 신선한 복숭아에 BVT Cr-7의 미스트 적용은 열매 내 갈색 부패병(*Monilia*)의 발생 빈도와 비율을 크게 억제하였다.

[0111] E. 억새(MISCANTHUS): BVT Cr-7의 포자 부유액내에 억새의 뿌리줄기(rhizomes) 침지를 우선하여 보관하는 것은 몇 개월의 냉장 보관 동안 *Pythium*, *Fusarium* 및 *Rhizoctonia*에 의해 일어나는 부패에 대한 보호를 제공한다.

[0112] 이러한 결과를 기반으로 BVT Cr-7은 *C. rosea f. rosea*의 다른 균주들보다 더 많은 농작물의 종류에 다양한 조건하에서 광대하게 입증된 고성능 병저항성(disease resistance)이 있음이 증명되었다.

[0113] 실시예 5: BVT Cr-7을 이용한 온실 토마토 치료

[0114] *Clonostachys rosea* BVT-Cr-7이 처치된 온실 토마토 꽂과 처치되지 않은 대조군 꽂은 *Clonostachys rosea*, *Botrytis cinerea* 및 보통의 곰팡이에 대해 평가되었다.

[0115] 평가는 캐나다의 노바 스코샤에 있는 시험지에서 상대적으로 작은 상업 온실에서 이루어졌으며, 토마토 꽂으로 접종원을 나르기 위한 접종원 디스펜서를 갖춘 콜로니 박스(범블비 벌집)에 의한 벌 벡터링을 이용하여 *C. rosea* BVT-Cr-7은 식물로 옮겨졌다.

[0116] 실험 절차

[0117] 토마토 꽂들의 샘플은 시험지로부터 최상의 상태에 있는 것을 받았다. 각각 샘플에는 하나의 작은 플라스틱 백 안에 네 개의 꽂이 포함되어 있다. 네 개의 꽂이 담긴 각각의 샘플은 2014년 6월 20일에 페트리디쉬 내 PCA 배지에 놓였다가 은은한 햇빛이 드는 21-25°C의 투명한 플라스틱 박스에서 7일 동안 배양되었다. 그 다음, 각각

의 꽃은 *Clonostachys rosea*, *Botrytis cinerea* 및 보통의 곰팡이에 대해 현미경으로 평가되었다. 파라콰트는 식물 조직의 자연적인 노화를 가속화시켜 *Clonostachys rosea*가 포자를 생산함으로써 식별될 수 있도록 한다. 다른 균류 또한 그들이 노화되고 죽는 동안 조직에서 생장하고 포자를 형성할 수 있다.

결과

[0118] 표 1에 나타난 바와 같이, 생물학적 방제제 *Clonostachys rosea* BVT Cr-7의 포자 형성은 처치된 꽃의 87.5%, 처치되지 않은 꽃의 0%에서 관찰되었다.

[0119] 처치된 꽃의 암술에 수술(stamens)이 더해진 클러스터 상의 *C. rosea*의 포자 형성은 거의 전체적으로 하얗게 보이는 클러스터들이 원추모양(cone-like)을 형성하듯 거의 모든 예에서 빽빽하고 아주 넓었다. 처치된 대부분의 꽃잎 상 포자 형성은 중간에서 많았다.

[0120] 병원균 *Botrytis cinerea*의 포자 형성은 처치되지 않은 꽃의 12%에서 발견(및 모든 예에서 경미하게)되었고 *C. rosea*로 처치된 꽃의 0%에서 발견되었다.

[0121] 보통의 온실 곰팡이들은 샘플 상에서 다양하게 관찰되었다. 주로 여기에 포함되는 종으로는 *Cladosporium(Fulvia fulvum)* 아닌, *Aspergillus*, 및 *Penicillium*, *Alternaria alternata* 및 *Acremonium*과 유사한 균류이다. 이러한 곰팡이에서 *C. rosea*의 영향에 관한 정량적인 정보 제공을 위해 각각의 꽃은 “곰팡이” (즉, *C. rosea* 또는 *Botrytis* 외에 다른 균류)에 대해 표 1에 제시된 1-5의 척도 즉, 곰팡이가 거의 없음(zero-trace)을 나타내는 1에서 곰팡이가 매우 많음을 나타내는 5의 척도로 평가되었다. *C. rosea*가 구축되어 포자를 형성한 꽃에서는 이러한 곰팡이들이 꽃에 포자를 형성한 면적이 매우 낮았으나(평균 평점 1.80/5.00), *C. rosea*가 없는 꽃(대조군의 모든 꽃을 포함하여)에서는 높게 나타났다(평균 평점 4.55/5.00). 따라서 생물학적 방제제 BVT Cr-7은 *Botrytis*뿐만 아니라 이러한 곰팡이들을 현저하게 억제하는 것으로 관찰된다. 본질적으로 *C. rosea* 처치로 도포(plated)된 꽃은 처치되지 않은 꽃에 비하여 매우 “깨끗”하게 보였다.

표 1

샘플 번호	BVT Cr-7로 처치된 꽃			처치되지 않은 대조군 꽃		
	BVT Cr-7+ 4점만점	곰팡이 등급*	총	곰팡이 등급*	총	<i>B. cinera</i>
1	4	1, 1, 1, 1	4	5, 5, 5, 5	20	
2	3	1, 1, 1, 3	6	3, 5, 5, 5	18	
3	4	1, 1, 1, 1	4	5, 5, 4, 4	18	++
4	4	3, 2, 1, 1	7	5, 5, 5, 4	19	
5	3	1, 1, 3, 2	7	5, 5, 5, 5	20	+
6	4	1, 1, 4, 1	7	5, 5, 5, 5	20	
7	2	4, 3, 1, 2	10	5, 4, 5, 4	18	
8	4	1, 2, 1, 4	8	3, 5, 5, 4	17	
9	4	1, 4, 2, 2	9	5, 5, 5, 5	20	
10	3	3, 1, 1, 2	7	2, 5, 5, 5	17	+
11	3	5, 1, 1, 1	8	5, 5, 5, 5	20	
12	4	2, 3, 2, 4	11	5, 3, 5, 5	18	+
13	3	1, 1, 4, 1	7	5, 5, 5, 5	20	+
14	4	1, 3, 1, 1	6	5, 5, 5, 5	20	+
49/56 = 87.5%		합계 101		합계 255		7
꽃 당 평균 평점 1.80				4.55		

[0122] 표 1: 온실 내 벌 벡터링을 이용하여 분산된 BVT Cr-7의 시험 결과. *하나 이상의 곰팡이로 덮인 도포 꽃의 면적 척도: 1= 거의 없음; 2, 약간; 3, 중간보다 적은; 4, 중간보다 많은; 5, 매우 많은.

[0123] 놀랍게도, PCA에서 일주일 동안 배양된 꽃에서 관찰된 놀라운 포자 생성 수준에 따라 판단할 때, BVT Cr-7 접종 원을 나르기 위한 벌 벡터링 사용은 꽃에서 생물학적 방제제의 내생 구축을 신속하고 빈틈없이 하도록 하였다.

[0124] “수술 플러스 스타일” 의 클러스터 내에서 *C. rosea*의 우수한 구축이 관찰되었고 특히 중요한 것은 이러한 것

들이 병원균 입장의 주요한 입구(portals)로 보여진다는 것이다.

[0127] *B. cinerea*의 명백히 완전한 억제 및 *C. rosea*에 의해 점령된 꽃 내에서 다양한 온실 곰팡이의 주요 억제는 광범위한 스펙트럼 능력과 다른 균류에 대항하는 BVT Cr-7의 활성(경쟁적 배제와 같은)을 나타내는 것으로 관찰되었다.

[0128] 본 발명은 현재 바람직한 실시예로 간주되는 것들을 참조하여 설명되었지만, 출원이 개시된 실시예에 한정되는 것이 아님을 이해하여야 한다. 반대로, 개시 내용은 취지 및 첨부된 청구항들의 범위 내에 포함된 다양한 변형과 등가의 방식을 다를 것이다.

[0129] 본원에 그 전체가 참조로 인용된 모든 간행물, 특히, 특히 출원 및 생물학적 기탁물(deposits)은 각각의 개별적인 간행물, 특히, 특히 출원 또는 생물학적 기탁물과 동일한 정도로 이는 그 전체가 참조로 인용되어 구체적이고 개별적으로 나타내었다.

캐나다국제기탁당국

캐나다보건기관 국립미생물연구소
1015 알링턴 스트리트
위니펙, 매니토바 캐나다 R3E 3R2

Tel: (204) 789-6030
Fax: (204) 789-2018

국제 양식 IDAC/BP/4

원기탁에 대한 수탁증

(부다페스트 조약 규정 7.1에 따라 발행됨)

원기탁증서 및 생존능력 기술서 사본 첨부

I. 기탁자	
성명: 비브이티. 인코퍼레이티드 주소:	
II. 기탁표시	
기탁자에 의한 식별표시: BVT Cr-7	국제기탁당국에 의한 수탁번호: 040913-01
III. 과학적 성질 및/또는 분류학상의 위치	
II 란의 미생물에는 다음의 사항을 기재한 문서가 첨부되어 있다: <input checked="" type="checkbox"/> 과학적 성질 <input checked="" type="checkbox"/> 분류학상의 위치 (해당되는 곳에 X로 표시)	
IV. 수령 및 수탁	
본 국제기탁당국은 2013년 9월 4일(원기탁일)에 수령한 II 란의 미생물을 수탁한다.	
V. 캐나다국제기탁당국	
캐나다국제기탁당국 대표자 서명:	서명일: 2013년 9월 9일

원기탁에 대한 수탁증 1/1

File #: 162(13)

[0130]

캐나다국제기탁당국
캐나다보건기관 국립미생물연구소
1015 알링턴 스트리트
위니펙, 매니토바 캐나다 R3E 3R2

Tel: (204) 789-6030
Fax: (204) 789-2018

국제 양식 IDAC/BP/9

생존능력 기술서

(부다페스트 조약 규정 10.2에 따라 발행됨)

I. 생존능력 기술서 발행자	
성명: 마이클 콜린슨 비브이티. 인코퍼레이티드	주소:
II. 기탁자	III. 기탁표시
성명: 비브이티. 인코퍼레이티드 주소:	IDAC 수탁번호: 040913-01 기탁일: 2013년 9월 4일
IV. 생존능력 기술	
상기 표시된 기탁물의 생존능력 시험일(가장 최근일): 2013년 9월 16일	
해당일의 기탁물 생존능력:	
<input checked="" type="checkbox"/> 생육 가능 <input type="checkbox"/> 더 이상 생육 불가	
V. 생존능력 시험이 수행된 조건	
VI. 캐나다국제기탁당국	
캐나다국제기탁당국 대표자 서명:	서명일:
	2013년 9월 16일

색종능력 기술서 1/1

File # 162(13)

[0131]