



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118856** (13) **C2**

(51) МПК (2019.01)

C12N 1/14 (2006.01)**C12N 3/00****A01H 17/00****A01N 63/04** (2006.01)**A01P 21/00****A01P 3/00****C12R 1/645** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2016 03750	(72) Винахідник(и): Сатон Джон (СА), Мейсон Тод Гордон (СА)
(22) Дата подання заявки: 11.09.2014	(73) Власник(и): БІ ВЕКТОРИНГ ТЕКНОЛОДЖІ ІНК., 4160 Sladeview Crescent #7, Mississauga, Ontario, L5L 0A1, Canada (CA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.03.2019	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції: 61/876,469	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2007/107000 A1, 27.09.2007 US 2012/021906 A1, 26.01.2012 RODRIGUEZ, ET AL. <i>Clonostachys rosea</i> BAFC3874 as <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY. 05.2011, vol. 110, P. 1177 - 1186
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції: 11.09.2013	
(33) Код держави-учасниці Парижської конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.11.2016, Бюл.№ 21	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.03.2019, Бюл.№ 6	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/CA2014/000683, 11.09.2014	

(54) ВИДІЛЕНИЙ ШТАМ CLONOSTACHYS ROSEA ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЯК АГЕНТА БІОЛОГІЧНОГО ЗАХИСТУ**(57) Реферат:**

Винахід стосується виділеної культури штаму *Clonostachys rosea f. rosea* IDAC 040913-01 для застосування як агента біологічного захисту рослин, його спор, композиції, яка їх містить, способу обробки рослини агентом біологічного захисту, застосування вказаних культури штаму, його спор або вказаної композиції як агента біологічного захисту рослин, способу зменшення псування рослинного матеріалу та способу одержання агента біологічного захисту рослин.

UA 118856 C2

СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

[0001] По даній заявці заявляється пріоритет тимчасової заявки на патент США з серійним номером 61/876469, поданої 11 вересня 2013 р., зміст якої включений в даний опис як посилання в повному об'ємі.

5 ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

[0002] Даний винахід стосується виділеного штаму гриба *Clonostachys rosea* і більш конкретно виділеного штаму *Clonostachys rosea*, придатного як агент біологічного захисту для обробки рослин.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

10 [0003] *Clonostachys rosea* f. *rosea* є корисним мікрогрибом, який знаходиться в тканинах різноманітних рослин в дикій природі, і майже у всіх видах культурних рослин. Гриб звичайно зустрічається в здоровому корінні, листі, стеблах, квітках і плодах рослин, зібраних на фермах і в розплідниках, на плантаціях, виноградниках, пасовищах і садах по всьому світу. Повідомлялося про його знаходження в рослинах і ґрунтах таких різноманітних регіонів, як
15 субарктичні, холодні і помірно теплі зони, пустелі і вологі тропіки. Рослини, колонізовані *C. rosea*, не виявляють ніяких видимих ознак того, що грибок присутній доти, поки тканини не старіють і вмирають в природних умовах. У цей час грибок може спорулювати, і білуватий ріст на поверхні рослин може ставати помітним, особливо за допомогою лупи. На відміну від патогенних організмів, пов'язаних із захворюванням, *Clonostachys* не викликає пошкоджень, плямистості, в'янення або інших симптомів у рослин. *Clonostachys rosea* f. *rosea*, як відомо, є
20 також корисним агентом біологічного захисту для обробки рослин і сприяє захисту рослин від хвороб і стресів навколишнього середовища, а також сприяє росту рослин і врожайності.

[0004] Stewart et al. (патент США No. 8101551) описують штам 88-710 *Clonostachys rosea* і відносять його до штаму, що має переваги в стимуляції потужності, життєздатності, росту і
25 врожайності рослин.

[0005] Залишається потреба в нових штаммах *Clonostachys rosea*, які є корисними як агенти біологічного захисту для обробки рослин.

СУТЬ ВІНАХОДУ

[0006] Автори даного винаходу виділили і охарактеризували новий штам гриба *Clonostachys rosea* f. *rosea*. Як описано в цьому документі, цей новий штам *Clonostachys rosea* f. *rosea*, позначений як «BVT Cr-7» особливо корисний як агент біологічного захисту для обробки рослин. У одному аспекті винаходу виділена культура штаму BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea* була
30 депонована під номером надходження 040913-01 до міжнародного депозитарного органу Канади, розташованого в національній мікробіологічній лабораторії, агентство суспільної охорони здоров'я Канади, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2, Canada, 4 вересня 2013 р.

[0007] Як показано в прикладі 1, ряд різних штамів *Clonostachys rosea* f. *rosea* був виділений і охарактеризований з метою виявлення штамів з особливо переважними властивостями для
40 використання як агента біологічного захисту. У порівнянні з іншими штамми BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea* продемонстрував ряд поліпшених властивостей і/або поєднання бажаних властивостей для використання як агента біологічного захисту. Наприклад, BVT Cr-7 продемонстрував поліпшені або бажані властивості відносно росту і великої кількості продукції спор, своєї здатності існувати як ендосит всередині різноманітних рослин, включаючи коріння і квітки культурних рослин і листя досліджуваних рослин, і своєї здатності придушувати або
45 контролювати широкий спектр захворювань рослин і/або патогенних мікроорганізмів. У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 виявляє одну або більше поліпшених властивостей в порівнянні з контрольним штамом *Clonostachys rosea* f. *rosea*, таким як 88-710 і/або EV1a.

[0008] Крім того, як указано в прикладах 2-5, застосування BVT Cr-7 для рослин при польових випробуваннях, а також в теплицях в контрольованих умовах показує, що BVT Cr-7
50 являє собою агент з широким спектром біологічного захисту з високою продуктивністю проти цілого ряду різних захворювань, в різноманітних умовах і для найрізноманітніших рослин. Як показано в прикладі 4, BVT Cr-7 також корисний для зниження псування рослинних матеріалів, наприклад, шляхом зниження рівнів гнилі або зміни кольору зібраних культур.

[0009] Відповідно, в одному аспекті пропонується виділена культура штаму BVT Cr-7
55 *Clonostachys rosea* f. *rosea*, як описано в цьому документі. У одному варіанті здійснення штам являє собою штам, який був депонований під номером надходження 040913-01 до міжнародного депозитарного органу Канади, розташованого в національній мікробіологічній лабораторії, агентство суспільної охорони здоров'я Канади, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2, Canada, 4 вересня 2013 р.

[0010] Пропонуються також спори, утворені штамом BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*, а також потомство штаму BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea* і склади, що містять виділені культури, спори і/або потомство BVT Cr-7. Пропонується також виділена клітина штаму BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*, яка здатна відтворюватися безстатевим шляхом. У одному варіанті здійснення пропонується спора, отримана шляхом інкубації виділеної культури BVT Cr-7 на субстраті в умовах, відповідних для споруляції. У одному варіанті здійснення пропонується склад, що включає спори BVT Cr-7, які пов'язані зі стабілізуючим агентом, таким як силікат кальцію.

[0011] У одному варіанті здійснення виділена культура BVT Cr-7, описана в цьому документі, колонізує рослини як ендосит. У одному варіанті здійснення контактування рослини з BVT Cr-7 придушує або контролює захворювання або патоген, які впливають на листя, квітки, плоди і/або коріння рослини. У одному варіанті здійснення захворювання являє собою захворювання сірою пліснявою, захворювання білою пліснявою, бурю гниль, кореневу гниль і/або фомопсис. У одному варіанті здійснення захворювання викликається *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* і/або штамми *Pythium* spp., *Rhizoctonia* і/або *Fusarium*.

[0012] У одному варіанті здійснення пропонується також рослина або рослинний матеріал, які колонізовані інокулятом BVT Cr-7.

[0013] У одному варіанті здійснення штам BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea* є корисним як агент біологічного захисту для обробки рослин. У одному варіанті здійснення пропонується спосіб обробки рослини, що включає контактування рослини зі штамом BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*, як описано в цьому документі. Наприклад, в одному варіанті здійснення BVT Cr-7 є корисним для поліпшення життєздатності, росту і/або врожайності рослин в порівнянні з контрольною рослиною, яка не була оброблена BVT Cr-7. У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 є корисним для профілактики або лікування захворювань і/або патогенів у рослини. У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 є корисним для стимуляції виключення колонізації рослини іншими грибами, включаючи патогенні гриби. У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 придатний для ініціації природної стійкості до захворювань і стресів у рослини, наприклад, у відповідь на інфікування патогеном. Пропонується також спосіб зниження псування рослинного матеріалу, що включає контактування рослинного матеріалу з BVT Cr-7.

[0014] У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 є корисним для обробки рослини з метою профілактики або лікування захворювань і/або патогенів, які можуть вплинути на життєздатність, ріст і/або врожайність рослин. У одному варіанті здійснення патогеном є мікроорганізм, такий як грибок або бактерії. Приклади патогенів, які можуть вплинути на життєздатність, ріст і/або врожайність рослини, які можуть контролюватися BVT Cr-7, включають, але не обмежуються цим, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* spp., *Alternaria*, *Monilia*, *Monilinia*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Rhizoctonia*, *Streptomyces*, *Didymella* і/або *Fusarium*. Приклади захворювань, які можуть вплинути на життєздатність, ріст і/або врожайність рослини, які можна регулювати за допомогою використання BVT Cr-7, включають, але не обмежуються захворюванням сірою пліснявою, захворюванням білою пліснявою, бурю гниллю і/або кореневою гниллю. Інші приклади включають захворювання фомопсисом, наприклад, у лохини або винограду і паршою картоплі.

[0015] У одному варіанті здійснення рослина являє собою будь-яку рослину або її частину, які можуть бути колонізовані штамом BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea* як ендоситом. У одному варіанті здійснення рослина являє собою квіткову рослину, зернову, бобову або овочеву рослину. Наприклад, в одному варіанті здійснення способи і варіанти застосування, описані в цьому документі, придатні для обробки таких рослин, як квіткові рослини або культури, такі як овочі, фрукти, злаки, а також їх насіння або розсада. У одному варіанті здійснення способи і варіанти застосування, описані в цьому документі, придатні для обробки саджанців/пересаджуваних рослин хвойних дерев. У одному варіанті здійснення рослина являє собою дерево, таке як сосна, чорна ялина або саджанці сосни. У одному варіанті здійснення рослина являє собою пшеницю, ячмінь, сояшник, канолу, голубику, полуницю, малину, виноград, картоплю, перець, огірки, помідори, газонні трави, перець, помідори, огірки, броколі, цвітну капусту, персики, яблука, квітучі декоративні рослини, такі як троянди, герані, цикламени, ротики, екзакум, бегонії або лілії. У одному варіанті здійснення рослина вирощується на відкритому повітрі. У одному варіанті здійснення рослину вирощують в теплиці.

[0016] У одному варіанті здійснення способи і варіанти застосування, описані в цьому документі, включають контактування рослини з BVT Cr-7, таким як культура BVT Cr-7, його спори або композиції. У одному варіанті здійснення культура BVT Cr-7, його спори або композиції придатні як матеріал для інокуляції. У деяких варіантах здійснення BVT Cr-7 наносять на рослину або її частину у вигляді спрею, дрібнокрапельного розпилення, занурення,

порошку або поживного розчину і/або шляхом векторизації комахами, наприклад, шляхом використання векторизації бджолами, як описано в заявці РСТ No. РСТ/CA2013/050179, включеної в цей документ як посилання в повному об'ємі.

[0017] Пропонуються також способи отримання агента біологічного захисту, причому спосіб включає інокуляцію субстрату виділеною культурою BVT Cr-7 і інкубацію субстрату в умовах, відповідних для зростання грибів для отримання штаму BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*. Необов'язково, спосіб додатково включає інкубацію субстрату в умовах, відповідних для споруляції грибка і видалення спор з субстрату для отримання матеріалу для інокуляції.

[0018] Інші ознаки і переваги даного винаходу стануть очевидними з подальшого докладного опису. Потрібно розуміти, однак, що докладний опис і конкретні приклади, що демонструє переважні варіанти здійснення винаходу, приведені тільки як ілюстрація, оскільки різні зміни і модифікації в межах суті і об'єму винаходу стануть очевидними для фахівців в даній галузі техніки з цього докладного опису.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

Визначення

[0019] У даному описі «штам BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*» або «BVT Cr-7» стосується штаму гриба, депонованому під номером надходження 040913-01 до міжнародного депозитарного органу Канади, розташованого в національній мікробіологічній лабораторії, агентство суспільної охорони здоров'я Канади, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2, Canada, 4 вересня 2013 р. Терміни «штам BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*», «BVT Cr-7» або «штам IDAC 040913-01 *Clonostachys rosea* f. *rosea*» також включають ізоляти вказаного штаму або будь-які клітини, культури, спори, і нащадки, отримані з вказаного штаму, наприклад, шляхом безстатевого розмноження.

[0020] Різні способи, відома в даній галузі техніка, можуть бути використані для культивування BVT Cr-7 або отримання спор грибка, включаючи, але, не обмежуючись способами, описаними в даному описі, і в статті Sutton et al. «*Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops.» Plant Dis 1997;81:316-28; Sutton et al. «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, і заявці на патент США No. 2012/0021906 «Fungal Inoculant Compositions», всі вони включені в даний опис як посилання в повному об'ємі.

[0021] У рамках винаходу термін «рослина» стосується будь-якого члена царства Plantae, який здатний колонізуватися BVT Cr-7 у вигляді ендوفіту. У переважному варіанті здійснення винаходу рослина являє собою рослину, яка культивується. У одному варіанті здійснення «рослина» включає також бульби, насіння і/або розсаду, які приводять до росту рослини і необов'язково включає рослинний матеріал. У рамках винаходу термін «рослинний матеріал» стосується будь-якого матеріалу, який збирається або відділяється від рослини і призначається для використання як харчового продукту або для інших цілей, який схильний до псування через захворювання і/або інфекцію, викликані патогенами. Приклади рослинного матеріалу включають, але не обмежуються цим, зернові, фрукти або овочі.

[0022] У рамках винаходу термін «колонізований як ендوفіт» стосується процесу, за допомогою якого спори гриба проникають і утворюють колонії грибів всередині рослини-хазяя, або її частини, не викликаючи симптомів або інших ознак захворювання, або не завдаючи іншої шкоди хазяю.

[0023] У рамках винаходу термін «агент біологічного захисту» стосується агента, який сприяє життєздатності, росту, потужності і/або врожайності рослин; підвищує ступінь проростання і/або якість насіння; підвищує стійкість до хвороб, шкідників і/або екологічних стресів, таких як несприятливі погодні або ґрунтові умови; контролює захворювання або діє проти них або проти патогенів, або придатний для лікування або профілактики захворювання або патогену; або сприяє відновленню рослин від пошкодження і/або інфекції. Переважним прикладом агента біологічного захисту є BVT Cr-7 *Clonostachys rosea*, як описано в цьому документі.

[0024] У даному описі «патоген» стосується мікроорганізму, який може проникати в рослину-хазяя і колонізувати її, і придушувати життєздатність, ріст, потужність і/або врожайність рослини. Приклади патогенів включають, але не обмежуються цим, бактерії і грибки, такі як *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* і штами *Pythium*, *Alternaria*, *Monilia*, *Monilinia*, *Colletotrichum*, *Cladosporium Rhizoctonia*, *Streptomyces*, *Didymella* і/або *Fusarium*.

Взаємодія *Clonostachys rosea* з рослинами і організмами, що викликають захворювання рослин

[0025] Не обмежуючись теорією, вважається, що BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* забезпечує захист рослин за допомогою різних механізмів, включаючи активацію природної стійкості рослин до хвороб і стресів, а також за рахунок конкурентного виключення інших патогенів.

[0026] *Clonostachys* відтворюється за допомогою великого числа мікроскопічних (5-7 мкм) бобоподібних спор. При нанесенні на рослини спори проростають з виникненням маленьких трубочок, з яких утворюються надзвичайно тонкі гілки, і вони проникають в тканини рослин. Проникнення може відбуватися в живі пелюстки, листя, рани рослини, коріння, бульби і інші частини рослин. Виявившись всередині тканин, кожна гілка утворює мікроскопічну грибову колонію. Рослини з колоніями *Clonostachys* не виявляють ніяких симптомів, таких як симптоми, що викликаються хвороботворними організмами (патогенами). Після впровадження як ендоефіта всередину рослинних тканин *Clonostachys* може надавати благотворний вплив, наприклад, індукцію природної стійкості рослин до хвороб і стресів.

[0027] Взаємовідношення мікроскопічних колоній *Clonostachys* з тканинами рослин різко змінюється, коли тканини рослин починають старіти, наприклад, коли листя уперше починає жовтіти або коли починає розвиватися захворювання або стрес. У цей час маленькі колонії починають швидко рости і часто повністю займають сусідні тканини. У *Clonostachys* цей ріст починається раніше, ніж майже у всіх інших грибків і бактерій, які ростуть на старіючих і вмираючих рослинах. Таким чином, *Clonostachys* є піонером в колонізації старіючих рослинних тканин. По суті справи він окупує тканини раніше за інші організми, включаючи деструктивні патогени, такі як *Botrytis*, *Sclerotinia* і *Monilinia*. Після того, як тканини окуповані, інші організми, включаючи патогени, не заміняють окуповуючий організм. *Clonostachys* здатний блокувати зростання патогенів і інших грибів просто за рахунок упереджувальної окупації тканин. Це конкурентне виключення є основним способом, за допомогою якого *Clonostachys* придушує хвороботворні організми і розвиток захворювання у рослин. Як показано в прикладах, BVT Cr-7 *Clonostachys* є особливо ефективним в контролюванні захворювань і патогенів у широкого кола різноманітних рослин.

[0028] *Clonostachys* продукує спори, коли колонізовані тканини поступово старіють і вмирають. У багатьох випадках такі спори ініціюють нові цикли ендоефітного росту у найближчих живих рослин. *Clonostachys* здатний зберігатися деякий час в мертвих рослинних матеріалах, які він колонізував, коли вони були живими. Проте, він має невелику здатність рости на мертвих рослинних матеріалах, вже окупованих іншими грибами і бактеріями. У такій ситуації *Clonostachys* не характеризується хорошою конкуренцією з мікробами, такими як *Penicillium* і *Aspergillus*, які адаптовані до мікробного світу рослинних залишків і ґрунту.

[0029] *Clonostachys* має також здатність рости на гіфах і міцеліях інших грибів (тобто є мікопаразитом). *Clonostachys* звичайно атакує інший гриб тільки після створення дуже тісного контакту з гіфами, склероціями або іншою частиною гриба (тобто абсолютного контакту або на відстані, приблизно 1-5 мкм). Роблячи це, гіфи *Clonostachys* іноді обвиваються навколо гриба, будучи паразитами, «гриб-хазяїн» в основному гине.

[0030] Не обмежуючись теорією, основні способи, за допомогою яких *Clonostachys* придушує патогени і захворювання у рослин, як вважають, являють собою: А. Швидку окупацію старіючих або пошкоджених тканин, так, щоб запобігти зростанню патогенів в тканинах; і В. Стимуляцію природних механізмів стійкості рослин до хвороботворних організмів. Крім того, *Clonostachys* здатний інактивувати або знищувати структури, що визначають виживання грибів (наприклад, склероції і різні види спор в ґрунті або на ньому), шляхом паразитизму (тобто зростання на них як джерелах живлення). BVT Cr-7 являє собою виділений штам *Clonostachys*, який має ряд характеристик, які роблять його особливо ефективним як агент біологічного захисту для обробки рослин.

Властивості і характеристики штаму BVT Cr-7

[0031] У одному варіанті здійснення пропонується виділений штам *Clonostachys*, який називається BVT Cr-7. У одному варіанті здійснення штам являє собою штам, депонований під номером надходження 040913-01 до міжнародного депозитарного органу Канади, розташованого в національній мікробіологічній лабораторії, агентство суспільної охорони здоров'я Канади, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2, Canada, 4 вересня 2013 р. У одному варіанті здійснення «штам BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*» або «BVT Cr-7» включає будь-які культури, спори, клітини і нащадки, отримані з вказаного штаму, наприклад, шляхом безстатевого розмноження. Як описано в цьому документі, BVT Cr-7 має ряд переважних властивостей в порівнянні з іншими штамми *Clonostachys*.

[0032] Наприклад, в одному варіанті здійснення BVT Cr-7 здатний продукувати спори на стандартних агарових середовищах і насінні рослин, такому як стерилізоване насіння зернових культур. У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 має поліпшену здатність до продукції спор на

стандартних агарових середовищах і насінні рослин, такому, як стерилізоване насіння зернових в порівнянні з іншими штамми *Clonostachys rosea* f. *rosea*, такими як 88-710 (по-іншому відомий як AFr-710, PG-710). Штам 88-710 описаний в статті 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 (включене в даний опис як посилання в повному об'ємі). У одному варіанті здійснення насіння зернових являють собою насіння пшениці і ячменю. У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 придатний для отримання інокуляту для використання при обробці рослин.

[0033] У одному аспекті BVT Cr-7 здатний існувати в рослинах як ендоефіт. У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 здатний існувати як ендоефіт в корінні рослин, такому як коріння культурних рослин. У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 характеризується поліпшеною здатністю існувати як ендоефіт в корінні рослин в порівнянні з іншими штамми *Clonostachys rosea* f. *rosea*, такими як 88-710. Наприклад, в одному варіанті здійснення BVT Cr-7 характеризується поліпшеною здатністю існувати як ендоефіт в культурних рослинах і/або в таких рослинах, як невеликі зернові злаки, газонні трави, горох, канولا, соя, перець, помідори і огірки.

[0034] У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 здатний існувати як ендоефіт в листі і/або квітах рослин. У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 характеризується поліпшеною здатністю існувати як ендоефіт в листі і квітах рослин в порівнянні з іншими штамми *Clonostachys rosea* f. *rosea*, такими як 88-710. Наприклад, в одному варіанті здійснення BVT Cr-7 характеризується поліпшеною здатністю існувати як ендоефіт в листі і/або квітах мінірозов, полуниці, соняшника і канולי.

[0035] У іншому аспекті BVT Cr-7 здатний придушувати і/або контролювати захворювання у рослин. У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 здатний придушувати і/або контролювати захворювання у рослин, викликаного патогенами, таких як інші гриби або мікроорганізми. У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 має поліпшену здатність придушувати або контролювати захворювання у інших рослин в порівнянні з іншими штамми *Clonostachys rosea* f. *rosea*, такими як 88-710. Наприклад, в одному варіанті здійснення BVT Cr-7 має поліпшену здатність придушувати або контролювати захворювання, які впливають на листя, квітки, плоди і/або коріння рослин. У одному варіанті здійснення захворювання викликане *Botrytis cinerea* (захворювання сірою пліснявою), *Sclerotinia sclerotiorum* (захворювання білою пліснявою) і/або штамми *Pythium* spp., *Rhizoctonia*, і/або *Fusarium* (кореневої гнилі і інші захворювання).

[0036] У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 здатний зменшувати псування рослинних матеріалів. Наприклад, в одному варіанті здійснення контактування зібраного рослинного матеріалу з BVT Cr-7, наприклад, шляхом обробки спреєм, знижує випадки захворювання гниллю в порівнянні з необробленим рослинним матеріалом.

Застосування BVT Cr-7 для рослин і/або їх частин

[0037] У одному варіанті здійснення способи і варіанти застосування, описані в цьому документі, включають контактування рослини або рослинного матеріалу з BVT Cr-7. У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 експонується з рослинами або рослинним матеріалом так, щоб сприяти ендоефітній колонізації рослин або рослинного матеріалу. BVT Cr-7 може бути нанесений на будь-яку частину рослини, включаючи листя рослин, квітки, коріння, бульби і/або насіння, будь-яким відомим способом, включаючи нанесення з допомогою спрею, дрібнокрапельного розпилення, занурення, поживних розчинів і/або шляхом векторизації комахами, залежно від застосування.

[0038] Наприклад, молоді рослини для пересадження можна обробляти шляхом просочення матеріалу ґрунту або шляхом занурення рослин при пересаджуванні.

[0039] У іншому прикладі, захворювання, викликані патогенами, які інфікують квітки, часто можна ефективно контролювати за допомогою застосування BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* до квіток, наприклад, шляхом обробки розпиленням або векторизації комахами, наприклад, шляхом використання методу векторизації бджолами, як описано в заявці РСТ No. WO2012/135940 і заявці РСТ РСТ/CA2013/050179, зміст яких включений в даний опис як посилання в повному об'ємі. У одному варіанті здійснення векторизація бджолами дозволяє обробляти квіткові культури, оскільки бджоли доставляють *Clonostachys* до квіток, які щойно розпустилися, кожний день (на відміну, наприклад, від щотижневих спреїв).

[0040] Інші приклади застосування включають використання *Clonostachys* для листя тепличних культур за допомогою наднизького об'єму дрібнокрапельного розпилення або звичайного розпилення для контролю патогенів, таких як *Botrytis* на листі і ранах стебел, які виникають в ході видалення листя і інших методів обрізання; обробки спреєм з *Clonostachys* трав на полях для гольфа для контролювання захворювання доларовою плямкою (*Sclerotinia*),

сніжною пліснявою (*Typhula*, *Microdochium*) і інших захворювань листя; нанесення *Clonostachys* на свіжі рани (протягом 48 годин) часто забезпечує тривалий захист проти багатьох інфікуючих рани хвороботворних організмів, наприклад, при щепленні, обрізанні і у пошкоджених рослин; і насіння може бути оброблене *Clonostachys* (з подальшим ростом гриба в кореневих системах)

5 для підвищення здатності культур, таких як польовий горох, підтримувати ріст в умовах стресу у вигляді засухи або виробничої практики (включаючи використання деяких пестицидів).

[0041] У одному варіанті здійснення BVT Cr-7, як описано в даному документі, може бути придатний для контролю за патогенами, такими як *sclerotinia sclerotiorum*, *monilinia vaccinii-corymbosi* і/або *botrytis cinerea*, в різних культурах, включаючи канолу, соняшник, малину, голубику, полуницю, яблуко, грушу, ківі, кавун, каву, манго, авокадо, вишню, сливу, мигдаль, персик, кеш'ю, гуаву, люцерну, гречку, конюшину, квасолю, горох, цибулю, соєві боби, бавовну, гірчицю, ожину, аґрус, перець, баклажани і смородину.

[0042] У деяких варіантах здійснення BVT Cr-7 наноситься на рослини у вигляді експозиції з однією дозою або у вигляді експозицій з декількома дозами в різний час. Наприклад, в одному варіанті здійснення рослини отримують дозу або експонуються з BVT Cr7, шляхом розпилення або векторизації комахами за допомогою бджолиного вулика, обладнаного відповідним інокуляційним диспенсером, щонайменше, нарізно 2 дні, 4 дні, 1 тиждень, 2 тижні, 1 місяць або більше 1 місяці.

[0043] У одному варіанті здійснення рослини контактують з BVT Cr-7 один або більше разів протягом річного циклу зростання цільової рослини. Наприклад, в одному варіанті здійснення BVT Cr-7 наноситься на рослини весною на початку вегетації і/або восени в кінці вегетаційного періоду. У одному варіанті здійснення BVT Cr-7 наноситься на рослини до збору рослинних матеріалів, наприклад, за 1 тиждень, 2 тижні, 3 тижні або за 4 тижні до збору рослинних матеріалів.

Композиції для інокуляції рослин

[0044] У одному аспекті пропонується склад, що включає BVT Cr-7, який підходить для інокуляції рослин або рослинних матеріалів. Необов'язково склад може бути твердою речовиною, такою як порошкоподібний склад, або розчином, таким як водний розчин. У одному варіанті здійснення склад включає ліофілізовані спори BVT Cr-7. У одному варіанті здійснення складу, описані в цьому документі, можуть бути використані як інокуляти для обробки рослин.

[0045] У одному варіанті здійснення склад може включати різні добавки, об'єднані з виділеною культурою або спорами грибка, які походять зі штаму BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*.

[0046] Фахівцям в даній галузі техніки буде зрозуміло, що концентрація клітин або спор в складі може варіюватися залежно від умов, в яких передбачається використовувати склад (наприклад, від клімату, цільової рослини, способу нанесення складу на рослини або рослинні матеріали і т. д.).

[0047] У деяких варіантах здійснення склад являє собою твердий склад і може включати від приблизно 1×10^8 до приблизно 4×10^8 спор на грам складу, необов'язково від приблизно 2×10^8 до приблизно 4×10^8 спор на грам складу.

[0048] У деяких варіантах здійснення добавки включають один або більше зі стабілізуючого агента, агента для поглинання вологи, атрактанта, розріджувача і/або агента, який запобігає злипанню. У деяких варіантах здійснення добавки можуть включати два або більше зі стабілізуючого агента, агента для поглинання вологи, атрактанта, розріджувача і/або агента, що запобігає злипанню. У одному варіанті здійснення склад придатний для векторизації комахами, наприклад, як описано в патенті РСТ/CA2013/050179, включеному в даний опис як посилання.

[0049] У одному варіанті здійснення склад включає стабілізуючий агент. Стабілізуючий агент служить для запобігання або зведенню до мінімуму розпаду, руйнування або активації спор грибка перед доставкою до цільової рослини. Приклади стабілізуючих агентів включають частки силікату кальцію. Наприклад, в деяких варіантах здійснення склад може включати спори грибка, і спори грибка можуть бути пов'язані щонайменше з деякими частками силікату кальцію. Склад може мати густину від приблизно 1×10^9 до приблизно 4×10^9 спор на грам силікату кальцію, з яким вони пов'язані. У одному варіанті здійснення склад може мати приблизно 2×10^9 спор на грам силікату кальцію, з яким вони пов'язані.

[0050] У одному варіанті здійснення склад включає агент для поглинання вологи. Агент для поглинання вологи служить для поглинання вологи зі складу для того, щоб зберегти склад відносно сухим і запобігти злежуванню або грудкуванню складу. Приклади зволожувальних агентів включають поглиначі вологи, такі як частинки або кульки силікагелю, і надвбиральні полімери, такі як поліакрилат натрію. Інші приклади абсорбуючих вологу агентів включають деревну стружку і кульки глини.

[0051] У одному варіанті здійснення склад включає аттрактант. Аттрактант може сприяти привабливості складу для рослин і/або векторизації комахами. Наприклад, аттрактант може мати чистий позитивний електростатичний заряд, так що він електростатично притягується до рослин і/або векторизації комахами, які мають сумарний негативний електростатичний заряд. У деяких прикладах аттрактант може включати мінерал або суміш мінералів. У одному конкретному прикладі аттрактант може включати мінеральну суміш, що продається Agri-Dynamics (Martins Creek, PA) під назвою DYNA-MIN™, яка включає наступні мінерали: діоксид кремнію, оксид алюмінію, кальцій, залізо, магній, калій, натрій, фосфор, титан, марганець, стронцій, цирконій, літій, рубідій, бір, цинк, ванадій, хром, мідь, ітрій, нікель, кобальт, галій, цезій, скандій, олово, молібден, а також додаткові мікроелементи. У іншому прикладі аттрактант може включати карбонат кальцію.

[0052] У одному варіанті здійснення склад включає розріджувач. Розріджувач може являти собою відповідний крохмаль або борошно. У тих прикладах, де склад повинен бути доставлений за допомогою векторизації комахами, розріджувач може бути вибраний таким чином, щоб він не подразнював або не шкодив комахам і не був з'їдений комахами. Розріджувач може бути додатково вибраний так, щоб він не поглинав значну кількість вологи, таким чином, щоб розріджувач не злежувався. Прикладами розріджувачів, які можуть бути придатні для векторизації комахами, включають кукурудзяне борошно і зернове борошно, таке як житнє, пшеничне, рисове борошно і борошно пшениці спелти. У альтернативних прикладах розріджувач може являти собою каолін. У інших прикладах розріджувач може включати молочний порошок або тальк. Вони можуть бути особливо корисними в тих прикладах, де склад доставляється способом, відмінним від векторизації комахами, наприклад, шляхом розпилення.

[0053] У одному варіанті здійснення склад включає прийнятний агент проти злежування. Один конкретний приклад агента проти злежування являє собою оксид магнію. Інші агенти проти злежування, відомі фахівцям в даній галузі техніки, також можуть бути використані в складах, описаних в даному документі.

[0054] У одному варіанті здійснення склад являє собою рідку композицію, таку як водна суспензія. У одному варіанті здійснення склад включає приблизно від 1 до 6×10^5 спор/мл і, необов'язково, приблизно від 2 до 5×10^5 спор/мл. У одному варіанті здійснення склад являє собою рідку композицію, і включає один або більше агрономічно прийнятних носіїв або розріджувачів. У одному варіанті здійснення рідкий склад включає один або більше стабілізаторів.

Пропонуються також способи отримання агента біологічного захисту, як описано в даному документі, такого як інокулят, що включає ефективну кількість BVT Cr-7. Наприклад, в одному варіанті здійснення пропонується спосіб, що включає надання виділеної культури BVT Cr-7; інокуляцію субстрату виділеною культурою BVT Cr-7 і інкубацію субстрату в умовах, відповідних для росту грибка. У одному варіанті здійснення інокульований субстрат інкубують при відносній вологості вище 90% або вище 95% і при температурі в діапазоні 20-24 градуса по Цельсію.

[0056] У одному варіанті здійснення субстрат являє собою стерильний субстрат. У одному варіанті здійснення спосіб додатково включає інкубацію субстрату в умовах, прийнятних для споруляції гриба. Умови, прийнятні для споруляції *Clonostachys rosea*, відомі в даній галузі техніки. Наприклад, в одному варіанті здійснення умови, прийнятні для споруляції гриба, включають вирощування BVT Cr-7 на субстраті, такому як стерилізоване насіння, при температурі приблизно 20-24 градуси по Цельсію, при високому рівні вологості (більше 95%) протягом декількох днів, щоб дозволити грибу рости перед зниженням відносної вологості до менше приблизно 50%, необов'язково, приблизно 20-50%, 35-45%, або приблизно 20-25% протягом, щонайменше, 10 днів, щонайменше, 2 тижнів або більше 2 тижнів для сприяння рясному отриманню спор. Автори даного винаходу встановили, що зниження рівня відносної вологості приблизно до 35-45% протягом, щонайменше, приблизно 2 тижнів особливо ефективно для отримання спор гриба BVT Cr7. У одному варіанті здійснення стерилізоване насіння являє собою насіння ячменю. У одному варіанті здійснення субстрат аерують в процесі отримання спор. Переважно, щоб субстрат інкубували в стерильних умовах, щоб уникнути забруднення іншими мікробами.

[0057] У одному варіанті здійснення спосіб додатково включає видалення спор з субстрату необов'язково шляхом суспендування у водному розчині. У одному варіанті здійснення спори видаляють з субстрату для отримання інокуляту. Необов'язково, спори можуть бути видалені з субстрату, і потім ліофілізовані або оброблені інакше, як відомо в даній галузі техніки, для отримання агента біологічного захисту. У одному варіанті здійснення спосіб включає змішування інокуляту з одним або більше додатковими інгредієнтами, такими як стабілізуючий агент, агент для поглинання вологи, аттрактант, розріджувач і/або агент проти злежування, для

отримання складу, як описано в цьому документі. У одному варіанті здійснення спосіб включає видалення спор з субстрату за допомогою змішування субстрату зі стерильною водою. У одному варіанті здійснення спосіб включає струшування суміші, відфільтровування злиплиго або шаруватого матеріалу, обережне центрифугування фільтрату і ресуспендування осадженого матеріалу для отримання водного розчину.

Додаткові варіанти

[0058] У одному варіанті здійснення пропонується спосіб контролювання патогенів у рослин, що включає введення BVT Cr-7, як описано в цьому документі, в рослину або рослинний матеріал. Наприклад, ізоляти, спори і композиції BVT Cr-7, як описано в цьому документі, можуть бути використані як профілактичний агент для зменшення імовірності інфікування, виникаючого у рослин або рослинного матеріалу, особливо інфікування патогенним грибом, таким як *Botrytis* або *Sclerotinia*.

[0059] Пропонується також спосіб контролювання патогенів у рослин, причому спосіб включає обробку партії насіння культурами або складами, розкритими в даному описі, і подальше культивування обробленого насіння до рослин.

[0060] Пропонується також композиція, що включає BVT Cr-7, як описано в цьому документі, і носій або розріджувач, і, необов'язково, яка додатково включає додатковий агент біологічного захисту, такий як протигрибковий агент або пестицид. Композиція може являти собою композицію для обробки насіння, композицію для обробки рослин або композицію для обробки ґрунту. У одному варіанті здійснення носій або розріджувач являє собою прийнятний для сільського господарства носій або розріджувач, який допомагає забезпечити стабільність і активність композиції. У одному варіанті здійснення носій або розріджувач сумісний з агентом біологічного захисту, прийнятним для сільського господарства, і має хорошу абсорбційну здатність і відповідну насипну густину, яка дозволяє легко диспергувати і приєднувати частинки.

[0061] Композиції, описані в цьому документі, які містять BVT Cr-7, можуть, наприклад, застосовуватися для насіння або при розмноженні рослин, для середовища росту (наприклад, ґрунту або води), для коріння рослин і/або для листя рослин, для квіток або маточок рослин, або для будь-якого їх поєднання. Приклади рослин, які можна обробляти за допомогою представлених композицій, включають, але не обмежуються цим, сільськогосподарські культури, такі як насінні культури, зернові культури, луб'яні культури, бобові культури, плодові культури, лісові культури і газонні трави.

[0062] Композиції, які включають BVT Cr-7, описані в цьому документі, можуть бути нанесені на рослину у вигляді водних спреїв, гранул і складів пудри/порошку відповідно до встановленої практики в даній галузі техніки. Водний спрей звичайно отримують шляхом змішування змочуваного порошку або композиції емульгованого концентрату виділеної культури або спор BVT Cr-7 з відносно великою кількістю води з утворенням дисперсії.

[0063] Приведений вище опис в загальних рисах описує дану заявку. Більш повне розуміння може бути досягнуте шляхом посилання на подальші конкретні приклади. Ці приклади описані тільки з метою ілюстрації і не призначені для обмеження об'єму винаходу. Зміни в формі і заміна еквівалентів розглядаються як обставини, які можуть пропонуватися або бути доцільними. Хоча в даному описі використовувалися конкретні терміни, такі терміни пропонуються в описовому значенні, а не з метою обмеження.

[0064] Наступні необмежувальні приклади ілюструють варіанти здійснення даного винаходу:

ПРИКЛАДИ

Приклад 1: Виділення штаму BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*

[0065] Декілька видів культурних рослин (пшеницю, сою, кукурудзу, люцерну, трави) збирали в полях поблизу Guelph, Ontario як можливі джерела нових штамів *Clonostachys roseum* f. *roseum*. Штам гриба, описаний в цьому документі як BVT Cr-7, був виділений з кореня здорової молодшої рослини пшениці (на ранній стадії куцання), взятого з поля поблизу Arkell, Ontario. Ряд інших штамів *Clonostachys rosea* f. *rosea* (від BVT Cr-1 до BVT Cr-14) також виділяли, як зазначено нижче.

[0066] Процедура, що використовується для виділення штамів *Clonostachys* з коріння рослин пшениці і інших культур, виконувалася таким чином. Завжди застосовувалися асептичні методи. Коріння від декількох рослин промивали у водопровідній воді для видалення ґрунту, висушували на паперових рушниках і потім розрізали на сегменти довжиною 1-2 см. Сегменти промокали досуха паперовими тканинами і інкубували на паракват-хлорамфенікол-агаровому середовищі в чашках Петрі при 20-20 °C. Паракват прискорює старіння коріння, що дозволяє *Clonostachys* відносно швидко (наприклад, протягом 6-8 днів) утворювати спори на поверхні коріння, які він раніше колонізував. Структури споруляції (конідіофори і конідії, які вони несуть) є

основою для виявлення і ідентифікації гриба. Конідії (тобто спори) можуть бути видалені і пророщені в культурі.

[0067] Для виділення гриба спори переносили на стерильній голці з конідіофорів на корінні в чашки Петрі із середовищем картопляного агару з декстрозою (PDA), доповненою стрептоміцином (для придушення бактерій). Після проростання спор і отримання колоній на агаровому середовищі, гриб субкультивували в чашках Петрі на середовищі PDA-стрептоміцин. Спори субкультур суспендували в стерильній дистильованій воді, і суспензії послідовно розбавляли і висівали на PDA. Колонії, зростаючі з одиночних спор, переносили в свіже агарове середовище в чашках Петрі і підтримували в культурі при 4 °C у вигляді серій ізолятів для подальшої характеристики як можливих агентів біологічного захисту.

[0068] Серії виділених штамів потім тестували і порівнювали один з одним і зі встановленими штамми *Clonostachys rosea* f. *rosea*, включаючи 88-710 і EV-1a. Штам 88-710 описаний в статті 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 (включене в даний опис як посилання в повному об'ємі).

[0069] Виділений штам BVT Cr-7 [Bee-Vectoring Technology *Clonostachys rosea* #7] був потім ідентифікований як чудовий ізолят за допомогою експериментів, представлених в прикладах 2 і 3. Виділені культури BVT Cr-7 потім підтримували і депонували під номером надходження 040913-01 до міжнародного депозитарного органу Канади, розташованого в національній мікробіологічній лабораторії, агентство суспільної охорони здоров'я Канади, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2, Canada, 4 вересня 2013 р.

Приклад 2: Тестування і характеристика BVT Cr-7 відносно інших штамів *Clonostachys rosea* f. *rosea*

[0070] Новий виділений штам BVT Cr-7 і два додаткові штами *Clonostachys rosea* f. *rosea* (88-710 і EV-1a) порівнювали в серіях експериментів, призначених для оцінки їх властивостей як агенти біологічного захисту для обробки рослин. BVT Cr-7, як встановлено, при порівнянні з 88-710 і/або EV-1a є еквівалентним або перевершує їх, опираючись на кожному з наступних критеріїв:

- Зростання і велика кількість продукції спор на стандартних агарових середовищах і на субстратах, таких як стерилізоване насіння зернових культур (пшениці і ячменю), яке може бути використане для промислового виробництва інокулятив.

- Можливість рясно закріплюватися всередині коріння (тобто як ендоефіт) різноманітних видів культурних рослин, включаючи дрібні озернені зернові культури, газонні трави, горох, канолу, соєві боби, перець, помідори і огірки.

- Можливість закріплюватися як ендоефіт в листі і квітках декількох дослідних рослин (мініроз, полуниці, соняшника, канולי).

- Здатність придушувати або контролювати широкий спектр деструктивних захворювань, які вражають листя, квітки, плоди і коріння, особливо викликаних *Botrytis cinerea* (захворюванням сірою пліснявою), *Sclerotinia sclerotiorum* (захворюванням білою пліснявою) і штамми *Pythium* spp., *Rhizoctonia* і *Fusarium* (кореневою гниллю і іншими захворюваннями).

[0071] Отже, BVT Cr-7 має бажаний профіль робочих характеристик проти різних захворювань у різних видів культур і звичайно виявляє переважну активність як агент біологічного захисту в порівнянні з 88-710 і/або EV-1a.

Приклад 3: Характеристики BVT Cr-7 при контролюванні захворювань у рослин

[0072] BVT Cr-7 наносили на серії рослин і культур з метою оцінки його активності в польових випробуваннях. Зокрема, BVT Cr-7 наносили на квітки наступних рослин (наприклад, за допомогою векторизації бджолами або обробки спреєм) для контролювання захворювань, викликаних конкретними патогенами:

- соняшник: *Sclerotinia*, *Botrytis* і *Fusarium*
- канола: *Sclerotinia*
- лохина: *Monilinia*, *Sclerotinia*, *Botrytis* і *Phomopsis*
- полуниці: *Botrytis*, *Phomopsis* і *Rhizopus*
- малина: *Botrytis*
- виноград: *Botrytis*, *Phomopsis*

[0073] BVT Cr-7 наносили також на коріння парникових гідропонних культур (за допомогою поживного розчину) і, як показано, він контролював захворювання, що викликаються *Pythium* і *Fusarium*, у перців, огірків і томатів.

[0074] BVT Cr-7 наносили (у вигляді спрею) на листя газонних трав, тепличних перців і тепличних томатів. BVT Cr-7, як виявлено, контролював захворювання, що викликаються

Sclerotinia, *Typhula* і *Microdochium*, у газонних трав, *Fusarium* у тепличних перців і *Botrytis* у тепличних томатів.

Полеві випробування BVT Cr-7 для обробки полуниці

[0075] Випробування проводили в Ontario, де чотири колонії джмелів розташовували в центрі поля з чотирьох акрів екологічно чистої полуниці. Кожну коробку колонії («вулик») оснащували дозатором для запилення джмелів порошковим складом BVT Cr-7 при їх виході з вуликів. BVT Cr-7 виявлявся більше ніж в 80% квіток полуниці по всьому полю. Рівні гнилі плодів на полі з векторизацією BVT Cr-7 джмелями були надзвичайно низькими в порівнянні з сусіднім полем екологічно чистої полуниці, яке не було оброблене. У цьому випробуванні BVT Cr-7 придушував ягідну гниль *Botrytis* на >90%, ягідну гниль *Phomopsis* на 100% і гниль *Rhizopus* («ранову водянисту гниль») на 93%.

Полеві випробування BVT Cr-7 для обробки соняшника

[0076] Тест з векторизацією BVT Cr-7 джмелями проводили на полі соняшника біля Ripley Ontario. Зібране насіння з обробленого поля і з контрольного поля в ділянці (без джмелів або BVT Cr-7) порівнювали при лабораторних аналізах. Схожість насіння при обробці векторизацією джмелями була на 27% вищою, ніж у контрольного насіння (тобто 89,7% в порівнянні з 70,7%). Обробка BVT Cr-7 також знижувала рівень декількох небажаних форм плісняви на насінні (*Fusarium*, *Botrytis* і *Penicillium*).

[0077] Джмелі істотно векторизували BVT Cr-7 щонайменше на 360 м від вуликів до квіток. BVT Cr-7 ефективно закріплювався як ендосит у великих пропорціях в суцвіттях і насінні головок соняшника. Деструктивний патоген *Sclerotinia* не був знайдений в головках соняшника, колонізованих BVT Cr-7, але був присутнім в 20-25% головок за межами діапазону векторизації BVT Cr-7 бджолами. Рослинники повідомили, що врожайність насіння збільшилася більше ніж на 20% (вплив запилення плюс BVT Cr-7) і якість поліпшилася особливо відносно більш великого розміру насіння (і, отже, більшого вмісту олії) і зниження плісняви на зібраному насінні.

Полеві випробування BVT Cr-7 для обробки лохини

[0078] Випробування на острові принца Едуарда показали, що BVT Cr-7, що наноситься джмелями у вигляді порошкової композиції або у вигляді спреїв суспензій спор у воді, може закріплюватися як ендосит в квітках, ягодах і листі низькорослих кущів лохини. Обробки приводили до збільшення частки здорових ягід на 70-100%. BVT Cr-7 сильно знижував випадки муміфікування ягід, основного захворювання лохини, викликаного грибом *Monilinia vaccinii-corymbosi*, включаючи випадки, коли погодні умови були надзвичайно сприятливі для захворювання. BVT Cr-7 також помітно знижував потемніння і передчасне опускання ягід, що, як знайшли винахідники, зумовлено досі не описаним захворюванням, що викликається *Sclerotinia sclerotiorum*. При випробуванні протягом одного року захворювання *Sclerotinia* було щонайменше таким же шкідливим як муміфікація ягід у необробленій лохини. Нанесення спреїв BVT Cr-7 в належні періоди часу було ефективне проти некрозу *Phomopsis* у низькорослих кущів лохини і у випробуванні на високорослих кущах лохини в Ontario. Таким чином, BVT Cr-7 являє собою агент широкого спектра біологічного захисту проти основних захворювань, які вражають голубику в полі.

[0079] Отже, штам BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea* здатний контролювати широкий спектр захворювань, що мають важливе економічне значення у численних видів культур.

Приклад 4: Робочі характеристики BVT Cr-7 у контрольованих умовах

[0080] BVT Cr-7 був протестований на ряді конкретних культур з метою оцінки його використання як агента біологічного захисту:

[0081] А. Розсада каноли: Обробка насіння BVT Cr-7 дала дуже сильне придушення високо агресивного штаму *Rhizoctonia solani* в стерилізованому ґрунті і кореневій гнилі *Pythium* в ґрунті поля.

[0082] В. Зібрана морква (коренеплоди): BVT Cr-7 сильно придушував гниль *Sclerotinia* при спільній з патогеном інокуляції на моркву при модульованому зберіганні.

[0083] С. Качани брокколі: Обробка спреєм з BVT Cr-7 контролювала *Alternaria*, *Cladosporium* і передчасне знебарвлення збережених качанів брокколі.

[0084] D. Персики: Аерозольне нанесення BVT Cr-7 на свіжі персики значно придушувало частоту і швидкість розвитку бурої гнилі (*Monilia*) в плодах.

[0085] Е. Міскантус: Занурення кореневищ міскантусу в суспензію спор BVT Cr-7 перед зберіганням забезпечувало захист від гнилі, зумовленої *Pythium*, *Fusarium* і *Rhizoctonia* протягом декількох місяців холодного зберігання.

[0086] На основі цих результатів BVT Cr-7 продемонстрував більш широкі доведені високі робочі характеристики відносно стійкості до хвороб при різних умовах у більш високого числа типів культур, ніж інші штами *C. rosea* f. *rosea*.

Приклад 5: Обробка тепличних томатів з використанням BVT Cr-7

[0087] Квітки парникових томатів, оброблені BVT-Cr7 *Clonostachys rosea*, і необроблені контрольні квітки оцінювали на *Clonostachys rosea*, *Botrytis cinerea* і звичайні плісняви.

[0088] BVT Cr-7 *C. rosea* доставляли на рослини з використанням векторизації бджолами за допомогою оснащення ящика колонії (вулика джмелів) диспенсером інокуляту з метою доставки інокуляту до квіток томатів в порівняно невеликій комерційній теплиці (менше чверті акра) на випробувальній ділянці в Новій Шотландії, Канада.

Лабораторні методи

[0089] Зразки квіток томата були отримані з випробувальної ділянки у відмінному стані. Кожний зразок включав чотири квітки в невеликому пластиковому пакеті. Чотири квітки кожного зразка вміщували в чашки Петрі на паракват-хлорамфенікол-агарове (PCA) середовище 20 червня 2014 р. і інкубували в прозорих пластикових коробках при 21-25 °C при слабкому денному світлі протягом 7 днів. Кожну квітку потім оцінювали мікроскопічно на *Clonostachys rosea*, *Botrytis cinerea* і звичайні плісняви. Паракват прискорює природне старіння тканин рослин і тим самим дозволяє *Clonostachys rosea* продукувати спори і таким чином вони ідентифікуються. Інші гриби також можуть рости і утворювати спори на тканинах по мірі їх старіння і вмирання.

Результати

[0090] Як показано в таблиці 1, споруляція агента біологічного захисту BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* спостерігалася на 87,5% оброблених квіток і 0% необроблених квіток. Споруючі *C. rosea* на кластерах тичинок плюс маточок оброблених квіток була щільною і інтенсивною майже у всіх випадках, так що конусоподібна форма цих кластерів виглядала майже повністю білою. Споруючі на пелюстках більшості оброблених квіток була від помірної до сильної.

[0091] Споруючі патогену *Botrytis cinerea* була виявлена на 12% необроблених квіток (і була світлою у всіх випадках) і на 0% квіток, оброблених *C. rosea*.

[0092] Звичайні парникові плісняви спостерігалися на зразках в різній мірі. Вони включали в основному штами *Cladosporium* (що не стосуються *Fulvia fulvum*), *Aspergillus*, *Penicillium* і, *Alternaria alternata* і грибок, що нагадує *Acremonium*. Для надання кількісної інформації про вплив *C. rosea* на ці плісняви, кожну квітку оцінювали на «плісняви» (тобто будь-які гриби, відмінні від *C. rosea* або *Botrytis*) по шкалі 1-5, представленій в таблиці 1, де 1 являє собою нульовий слід плісняви і 5 являє собою дуже сильну плісняву. Області квіток зі споруляцією цих пліснев були дуже низькими (середня оцінка 1,80/5,00) в квітках, в яких закріпився і спорулював *C. rosea*, але високі (4,55/5,00) за відсутністю *C. rosea* (включаючи всі контрольні квітки). Таким чином, агент біологічного захисту BVT Cr-7, як виявлено, помітно придушує ці плісняви в доповнення до *Botrytis*. По суті висіяні квітки після обробки *C. rosea* виявилися дуже «чистими» в порівнянні з необробленими квітками.

No. зразка	Квітки, оброблені BVT-Cr7			Необроблені контрольні квітки		
	BVT-Cr7+ з 4	Ступінь плісняви*	Сумарно	Ступінь плісняви*	Сумарно	B. cinera
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%		Сумарно 101		Сумарно 255		7
		Середній ступінь на квітку 1,80		4,55		

[0093] Примітно, що використання векторизації бджолами для доставки інокуляту BVT-Cr7 створювало можливість швидкого і повного ендоефітного закріплення агента біологічного захисту

в квітках, судячи по помітних рівнях споруляції, що спостерігаються після того, як квітки інкубували протягом тижня на PCA.

[0094] Спостерігалось прекрасне закріплення *C. rosea* в кластерах "тичинок плюс маточок", і це має особливе значення, враховуючи, що вони є основними воротами надходження патогенів.

5 [0095] Спостерігалось явне повне придушення *B. cinerea* і значне придушення різних тепличних форм плісняви в квітках, колонізованих *C. rosea*, що вказує на широкий спектр можливостей і активності BVT Cr-7 проти інших грибів (наприклад, шляхом конкурентного виключення).

10 [0096] Незважаючи на те, що даний винахід описаний з посиланням на те, що в цей час вважається переважними прикладами, потрібно розуміти, що застосування не обмежене описаними прикладами. Навпаки, винахід призначений для охоплення різних модифікацій і еквівалентних установок, включених в рамки суті і об'єму прикладеної формули винаходу.

15 [0097] Всі публікації, патенти, патентні заявки і біологічні депозити включені в даний опис як посилання в повному об'ємі в тій же мірі, як якщо б кожна окрема публікація, патент, патентна заявка або біологічний депозит були конкретно і індивідуально вказані, як включені як посилання в повному об'ємі.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

- 20 1. Виділена культура *Clonostachys rosea f. rosea*, де виділена культура являє собою штам *Clonostachys rosea f. rosea* IDAC 040913-01 для застосування як агента біологічного захисту.
2. Виділена культура за п. 1, де виділена культура колонізує рослини як ендоефіт.
3. Виділена культура за п. 1, де контактування рослини з виділеною культурою придушує або контролює захворювання або патоген, які вражають листя, квітки, плоди і/або коріння рослини.
- 25 4. Виділена культура за п. 3, де захворювання являє собою захворювання сірою пліснявою, захворювання білою пліснявою, буру гниль, кореневу гниль і/або фомопсис.
5. Виділена культура за п. 3, де захворювання викликається *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* і/або штамми *Pythium spp.*, *Rhizoctonia* і/або *Fusarium*.
6. Спори гриба, отримані з виділеної культури *Clonostachys rosea f. rosea*, за будь-яким з пп. 1-5.
- 30 7. Спори гриба за п. 6, де спори отримують шляхом інкубації виділеної культури на субстраті в умовах, прийнятних для споруляції.
8. Композиція, яка включає виділену культуру за будь-яким з пп. 1-6 або спори гриба за п. 6 або 7.
9. Композиція за п. 8, яка додатково включає носій або розріджувач.
- 35 10. Композиція за п. 8 або 9, де композиція знаходиться в рідкій формі або в твердій формі.
11. Композиція за п. 10, де композиція знаходиться в твердій формі і додатково включає одне або більше зі стабілізуючого агента, агента для поглинання вологи, атрактанта, розріджувача і/або агента, що запобігає злипанню.
12. Композиція за п. 11, де стабілізуючий агент являє собою частинки силікату кальцію.
- 40 13. Композиція за п. 11, де агент для поглинання вологи включає осушувачі, частинки або гранули силікагелю, гіперабсорбуючі полімери, поліакрилат натрію, деревні стружки і/або кульки глини.
14. Композиція за п. 11, де атрактант включає мінерали.
15. Композиція за п. 14, де мінерали включають одне або більше з діоксиду кремнію, оксиду алюмінію, кальцію, заліза, магнію, калію, натрію, фосфору, титану, марганцю, стронцію, цирконію, літію, рубідію, бору, цинку, ванадію, хрому, міді, ітрію, нікелю, кобальту, галію, цезію, скандію, олова, молібдену і/або карбонату кальцію.
16. Композиція за п. 11, де атрактант включає Dyna-MIN™.
17. Композиція за будь-яким з пп. 8-16, де композиція включає від приблизно 1×10^8 до 4×10^8 спор на грам композиції, необов'язково від приблизно 2×10^8 до 4×10^8 спор на грам композиції.
- 50 18. Спосіб обробки рослини агентом біологічного захисту, що включає контактування рослини з виділеною культурою, спорами гриба або композицією за будь-яким з пп. 1-16.
19. Спосіб за п. 18 для поліпшення життєздатності, росту і/або врожайності рослини.
20. Спосіб за п. 18 для профілактики або лікування захворювання і/або патогенів у рослини.
- 55 21. Спосіб за п. 18, для контролю росту плісняви на рослині.
22. Спосіб за п. 18, для поліпшення схожості насіння рослин.
23. Спосіб за п. 20, де патоген являє собою *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium spp.*, *Alternaria*, *Monilia*, *Monilinia*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Rhizoctonia*, *Streptomyces*, *Didymella* і/або *Fusarium*.

24. Спосіб за п. 20, де захворювання являє собою захворювання сірою пліснявою, захворювання білою пліснявою, буру гниль, кореневу гниль і/або фомопсис.
25. Спосіб за будь-яким з пп. 18-24, де рослину вибирають з соняшнику, каноли, лохини, полуниці, винограду, перця, огірків, томатів, газонних трав, перця, томатів, броколі, персиків, розсади каноли і/або міскантуса.
26. Спосіб за будь-яким з пп. 18-25, де рослину вирощують в теплиці.
27. Спосіб за будь-яким з пп. 18-26, де контактування рослини з виділеною культурою, спорами гриба або композицією включає нанесення спрею, дрібнокрапельного розпилення, занурення або нанесення поживного розчину на рослину.
28. Спосіб за будь-яким з пп. 18-26, де контактування рослини з виділеною культурою, спорами гриба або композицією включає векторизацію комахами.
29. Застосування виділеної культури, спор гриба або композиції за будь-яким з пп. 1-16 як агента біологічного захисту.
30. Застосування за п. 29 для поліпшення життєздатності, росту і/або врожайності рослини.
31. Застосування за п. 29 для лікування або профілактики захворювання або патогену у рослини.
32. Застосування за п. 31, де патоген являє собою *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium spp.*, *Alternaria*, *Monilia*, *Monilinia*, *Colletotrichum*, *Cladosporium Rhizoctonia*, *Streptomyces*, *Didymella* і/або *Fusarium*.
33. Застосування за п. 31, де захворювання являє собою захворювання сірою пліснявою, захворювання білою пліснявою, буру гниль, кореневу гниль і/або фомопсис.
34. Спосіб зменшення псування рослинного матеріалу, причому спосіб включає контактування рослинного матеріалу з виділеною культурою, спорами гриба або композицією за будь-яким з пп. 1-16.
35. Спосіб за п. 34, де рослинний матеріал являє собою фрукти, овочі або зерно.
36. Спосіб за п. 34 або 35, де контактування рослинного матеріалу включає нанесення спрею, дрібнокрапельного розпилення або занурення рослинного матеріалу в рідку композицію за будь-яким з пп. 8-10.
37. Спосіб за будь-яким з пп. 34-36, де рослинний матеріал зібраний.
38. Спосіб отримання агента біологічного захисту, що включає інокуляцію субстрату виділеною культурою за п. 1 і інкубацію субстрату в умовах, прийнятних для росту гриба, для отримання штаму *Clonostachys rosea f. rosea* BVT Cr-7, депонованого за номером IDAC 040913-01.
39. Спосіб за п. 38, де умови, прийнятні для росту гриба, включають відносну вологість більше 95 % і температуру в діапазоні 20-24 градуси по Цельсію.
40. Спосіб за п. 38 або 39, де субстрат являє собою стерильний субстрат, необов'язково стерильне насіння, таке як насіння ячменю.
41. Спосіб за будь-яким з пп. 38-39, який додатково включає інкубацію субстрату в умовах, прийнятних для споруляції гриба.
42. Спосіб за п. 41, де умови, прийнятні для споруляції гриба, включають зменшення відносної вологості до менше приблизно 50 %, необов'язково до приблизно 35-45 %.
43. Спосіб за п. 41 або 42, який додатково включає видалення спор з субстрату для отримання інокуляту.
44. Спосіб за п. 43, який включає змішування спор з носієм або розріджувачем.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601