



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/14 (2013.01); A01N 63/04 (2013.01)

(21)(22) Заявка: 2016113495, 11.09.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.09.2014

Дата регистрации:
28.05.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
11.09.2013 US 61/876,469

(43) Дата публикации заявки: 16.10.2017 Бюл. № 29

(45) Опубликовано: 28.05.2019 Бюл. № 16

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 11.04.2016

(86) Заявка РСТ:
CA 2014/000683 (11.09.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/035504 (19.03.2015)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спаская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

**САТТОН Джон (СА),
МЭЙСОН Годд Гордон (СА)**

(73) Патентообладатель(и):

**БИ ВЕКТОРИНГ ТЕКНОЛОДЖИ ИНК.
(СА)**

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: COTA L.V., MAFFIA L.A. et.al.,
**Brazilian isolates of Clonostachys rosea:
colonization under different temperature and
moisture conditions and temporal dynamics on
strawberry leaves, The society for applied
Microbiology. Letters in applied microbiology,
2008, v. 46, p. 312-317. CA 2646428 A,
09.12.2014. RU 2154381 C2, 20.08.2000. RU
2370525 C2, (см. прод.)**

**(54) ВЫДЕЛЕННЫЙ ШТАММ CLONOSTACHYS ROSEA ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ АГЕНТА
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии. Предложены штамм гриба *Clonostachys rosea* f. *rosea* IDAC 040913-01, его споры, композиция на основе штамма или его спор в качестве агента биологической защиты растений, способ обработки растений агентом биологической защиты растений, применение штамма, его спор или композиции в качестве агента биологической защиты растений, способ уменьшения порчи растительного материала и

способ получения агента биологической защиты растений. Указанный штамм, композиции, включающие указанный штамм, и/или споры, происходящие от указанного штамма, могут наноситься на растения или растительные материалы с целью улучшения урожайности растений, улучшения роста растений или лечения или профилактики заболеваний или патогенов у растения. 7 н. и 30 з.п. ф-лы, 1 табл., 5 пр.

RU 2 689 608 C2

RU 2 689 608 C2

(56) (продолжение):
20.10.2009.

R U 2 6 8 9 6 0 8 C 2

R U 2 6 8 9 6 0 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 1/14 (2006.01)
A01N 63/04 (2006.01)
A01P 21/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12N 1/14 (2013.01); A01N 63/04 (2013.01)

(21)(22) Application: **2016113495, 11.09.2014**

(24) Effective date for property rights:
11.09.2014

Registration date:
28.05.2019

Priority:

(30) Convention priority:
11.09.2013 US 61/876,469

(43) Application published: **16.10.2017 Bull. № 29**

(45) Date of publication: **28.05.2019 Bull. № 16**

(85) Commencement of national phase: **11.04.2016**

(86) PCT application:
CA 2014/000683 (11.09.2014)

(87) PCT publication:
WO 2015/035504 (19.03.2015)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B.Spaskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**SATTON Dzhon (CA),
MEJSON Todd Gordon (CA)**

(73) Proprietor(s):

BI VEKTORING TEKNOLODZHI INK. (CA)

(54) ISOLATED CLONOSTACHYS ROSEA STRAIN FOR USE AS A BIOLOGICAL PROTECTION AGENT

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: disclosed are *Clonostachys rosea* f. *rosea* IDAC 040913-01, its spores, a strain-based composition or its spore as a biological protection agent of plants, method of treating plants with a plant biological protection agent, using a strain, its spores or composition as a biological protection agent of plants, method of reducing spoilage of plant material and a

method of producing agent of biological protection of plants.

EFFECT: said strain, compositions comprising said strain and/or spores from said strain can be applied on plants or plant materials in order to improve crop yield, improve plant growth or treat or prevent diseases or pathogens in a plant.

37 cl, 1 tbl, 5 ex

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США с серийным номером 61/876469, поданной 11 сентября 2013 г., содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение относится к выделенному штамму гриба *Clonostachys rosea* и более конкретно к выделенному штамму *Clonostachys rosea*, пригодному в качестве агента биологической защиты для обработки растений.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] *Clonostachys rosea* f. *rosea* является полезным микрогрибом, который находится в тканях разнообразных растений в дикой природе, и почти во всех видах культурных растений. Гриб обычно встречается в здоровых корнях, листьях, стеблях, цветах и плодах растений, собранных на фермах и в питомниках, на плантациях, виноградниках, пастбищах и садах по всему миру. Сообщалось о его нахождении в растениях и почвах таких разнообразных регионов, как субарктические, холодные и умеренно теплые зоны, пустыни и влажные тропики. Растения, колонизированные *C. rosea*, не проявляют никаких видимых признаков того, что грибок присутствует до тех пор, пока ткани не стареют и умирают в природных условиях. В это время грибок может спорулироваться, и беловатый рост на поверхности растений может становиться заметным, особенно с помощью лупы. В отличие от патогенных организмов, связанных с заболеванием, *Clonostachys* не вызывает повреждений, пятнистости, увядания или других симптомов у растений. *Clonostachys rosea* f. *rosea*, как известно, является также полезным агентом биологической защиты для обработки растений и способствует защите растений от болезней и стрессов окружающей среды, а также содействует росту растений и урожайности.

[0004] Stewart et al. (патент США No. 8101551) описывают штамм 88-710 *Clonostachys rosea* и относят его к штамму, имеющему преимущества в стимуляции мощности, жизнеспособности, роста и урожайности растений.

[0005] Остается потребность в новых штаммах *Clonostachys rosea*, которые являются полезными в качестве агентов биологической защиты для обработки растений.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Авторы настоящего изобретения выделили и охарактеризовали новый штамм гриба *Clonostachys rosea* f. *rosea*. Как описано в настоящем документе, этот новый штамм *Clonostachys rosea* f. *rosea*, обозначенный как «BVT Cr-7» особенно полезен в качестве агента биологической защиты для обработки растений. В одном аспекте изобретения выделенная культура штамма BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea* была депонирована под номером поступления 040913-01 в международный депозитарный орган Канады, расположенный в национальной микробиологической лаборатории, агентство общественного здравоохранения Канады, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2, Canada, 4 сентября 2013 г.

[0007] Как показано в примере 1, ряд различных штаммов *Clonostachys rosea* f. *rosea* был выделен и охарактеризован с целью выявления штаммов с особенно предпочтительными свойствами для использования в качестве агента биологической защиты. По сравнению с другими штаммами BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea* продемонстрировал ряд улучшенных свойств и/или сочетания желаемых свойств для использования в качестве агента биологической защиты. Например, BVT Cr-7 продемонстрировал улучшенные или желаемые свойства в отношении роста и обилия продукции спор, своей способности существовать как эндофит внутри разнообразных

растений, включая корни и цветы культурных растений и листву опытных растений, и своей способности подавлять или контролировать широкий спектр заболеваний растений и/или патогенных микроорганизмов. В одном варианте осуществления BVT Cr-7 проявляет одно или более улучшенных свойств по сравнению с контрольным штаммом

5 *Clonostachys rosea* f. *rosea*, таким как 88-710 и/или EV1a.

[0008] Кроме того, как указано в примерах 2-5, применение BVT Cr-7 для растений при полевых испытаниях, а также в теплицах в контролируемых условиях показывает, что BVT Cr-7 представляет собой агент с широким спектром биологической защиты с

10 высокой производительностью против целого ряда различных заболеваний, в разнообразных условиях и для самых разных растений. Как показано в примере 4, BVT Cr-7 также полезен для снижения порчи растительных материалов, например, путем снижения уровней гнили или изменения цвета собранных культур.

[0009] Соответственно, в одном аспекте предлагается выделенная культура штамма BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*, как описано в настоящем документе. В одном

15 варианте осуществления штамм представляет собой штамм, который был депонирован под номером поступления 040913-01 в международный депозитарный орган Канады, расположенный в национальной микробиологической лаборатории, агентство общественного здравоохранения Канады, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2, Canada, 4 сентября 2013 г.

[0010] Предлагаются также споры, образованные штаммом BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*, а также потомство штамма BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea* и составы, содержащие выделенные культуры, споры и/или потомство BVT Cr-7. Предлагается также выделенная клетка штамма BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*, которая способна

20 воспроизводиться бесполом путем. В одном варианте осуществления предлагается спора, полученная путем инкубации выделенной культуры BVT Cr-7 на субстрате в условиях, подходящих для споруляции. В одном варианте осуществления предлагается состав, включающий споры BVT Cr-7, которые связаны со стабилизирующим агентом, таким как силикат кальция.

[0011] В одном варианте осуществления выделенная культура BVT Cr-7, описанная

30 в настоящем документе, колонизирует растения как эндофит. В одном варианте осуществления контактирование растения с BVT Cr-7 подавляет или контролирует заболевание или патоген, которые влияют на листья, цветы, плоды и/или корни растения. В одном варианте осуществления заболевание представляет собой заболевание серой плесенью, заболевание белой плесенью, бурую гниль, корневую гниль и/или фомопсис.

35 В одном варианте осуществления заболевание вызывается *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* и/или штаммами *Pythium* spp., *Rhizoctonia* и/или *Fusarium*.

[0012] В одном варианте осуществления предлагается также растение или растительный материал, которые колонизированы инокулятом BVT Cr-7.

[0013] В одном варианте осуществления штамм BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*

40 является полезным в качестве агента биологической защиты для обработки растений. В одном варианте осуществления предлагается способ обработки растения, включающий контактирование растения со штаммом BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*, как описано в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления BVT Cr-7 является полезным для улучшения жизнеспособности, роста и/или урожайности растений по сравнению с контрольным растением, которое не было обработано BVT Cr-7. В одном варианте осуществления BVT Cr-7 является полезным для профилактики или лечения заболеваний и/или патогенов у растения. В одном варианте осуществления BVT Cr-7 является полезным для стимуляции исключения колонизации растения другими грибами,

включая патогенные грибы. В одном варианте осуществления BVT Cr-7 пригоден для инициации природной устойчивости к заболеваниям и стрессам у растения, например, в ответ на инфицирование патогеном. Предлагается также способ снижения порчи растительного материала, включающий контактирование растительного материала с

5 BVT Cr-7.

[0014] В одном варианте осуществления BVT Cr-7 является полезным для обработки растения с целью профилактики или лечения заболеваний и/или патогенов, которые могут повлиять на жизнеспособность, рост и/или урожайность растений. В одном варианте осуществления патогеном является микроорганизм, такой как грибок или

10 бактерии. Примеры патогенов, которые могут повлиять на жизнеспособность, рост и/или урожайность растения, которые могут контролироваться BVT Cr-7, включают, но не ограничиваются этим, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* spp., *Alternaria*, *Monilia*, *Monilinia*, *Colletotrichum*, *Cladosporium* *Rhizoctonia*, *Streptomyces*, *Didymella* и/или *Fusarium*. Примеры заболеваний, которые могут повлиять на жизнеспособность, рост

15 и/или урожайность растения, которые можно регулировать с помощью использования BVT Cr-7, включают, но не ограничиваются заболеванием серой плесенью, заболеванием белой плесенью, бурой гнилью и/или корневой гнилью. Другие примеры включают заболевания фомопсисом, например, у голубики или винограда и паршой картофеля.

[0015] В одном варианте осуществления растение представляет собой любое растение или его часть, которые могут быть колонизированы штаммом BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea* в качестве эндофита. В одном варианте осуществления растение представляет собой цветковое растение, зерновое, бобовое или овощное растение.

Например, в одном варианте осуществления способы и варианты применения, описанные в настоящем документе, пригодны для обработки таких растений, как цветковые

25 растения или культуры, такие как овощи, фрукты, злаки, а также их семена или рассада.

В одном варианте осуществления способы и варианты применения, описанные в настоящем документе, пригодны для обработки саженцев/пересаживаемых растений хвойных деревьев. В одном варианте осуществления растение представляет собой

30 дерево, такое как сосна, черная ель или саженцы сосны. В одном варианте осуществления растение представляет собой пшеницу, ячмень, подсолнечник, канолу, голубику, клубнику, малину, виноград, картофель, перец, огурцы, помидоры, газонные травы,

перец, помидоры, огурцы, брокколи, цветную капусту, персики, яблоки, канолу, цветущие декоративные растения, такие как розы, герани, цикламены, львиный зев, экзакум, бегонии или лилии. В одном варианте осуществления растение выращивается на

35 открытом воздухе. В одном варианте осуществления растение выращивают в теплице.

[0016] В одном варианте осуществления способы и варианты применения, описанные в настоящем документе, включают контактирование растение с BVT Cr-7, таким как

культура BVT Cr-7, его споры или композиции. В одном варианте осуществления культура BVT Cr-7, его споры или композиции пригодны в качестве материала для

40 инокуляции. В некоторых вариантах осуществления BVT Cr-7 наносят на растение или его часть в виде спрея, мелкокапельного распыления, окунания, порошка или питательного раствора и/или путем векторизации насекомыми, например, путем использования векторизации пчелами, как описано в заявке РСТ No. РСТ/СА2013/

050179, включенной в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

45 [0017] Предлагаются также способы получения агента биологической защиты, причем способ включает инокуляцию субстрата выделенной культурой BVT Cr-7 и инкубацию субстрата в условиях, подходящих для роста грибов для получения штамма BVT Cr-7

Clonostachys rosea f. *rosea*. Необязательно, способ дополнительно включает инкубацию

субстрата в условиях, подходящих для споруляции грибка и удаления спор с субстрата для получения материала для инокуляции.

[0018] Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из последующего подробного описания. Следует понимать, однако, что подробное описание и конкретные примеры, демонстрирующие предпочтительные варианты осуществления изобретения, приведены только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники из этого подробного описания.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

10 Определения

[0019] В настоящем описании «штамм BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*» или «BVT Cr-7» относится к штамму гриба, депонированному под номером поступления 040913-01 в международный депозитарный орган Канады, расположенный в национальной микробиологической лаборатории, агентство общественного здравоохранения Канады, 15 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2, Canada, 4 сентября 2013 г. Термины «штамм BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*», «BVT Cr-7» или «штамм IDAC 040913-01 *Clonostachys rosea* f. *rosea*» также включают изоляты указанного штамма или любые клетки, культуры, споры, и потомки, полученные из указанного штамма, например, путем бесполого размножения.

[0020] Различные способы, известные в данной области техники, могут быть использованы для культивирования BVT Cr-7 или получения спор грибка, включая, но, не ограничиваясь способами, описанными в настоящем описании, и в статье 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, и заявке на патент США No. 2012/0021906 «Fungal Inoculant Compositions», все они включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[0021] В рамках изобретения термин «растение» относится к любому члену царства 30 *Plantae*, который способен колонизироваться BVT Cr-7 в виде эндофита. В предпочтительном варианте осуществления изобретения растение представляет собой культивируемое растение. В одном варианте осуществления «растение» включает также клубни, семена и/или рассаду, которые приводят к росту растения и необязательно включает растительный материал. В рамках изобретения термин «растительный материал» 35 относится к любому материалу, который собирается или отделяется от растения и предназначается для использования в качестве пищевого продукта или для других целей, который подвержен порче из-за заболевания и/или инфекции, вызванных патогенами. Примеры растительного материала включают, но не ограничиваются этим, зерновые, фрукты или овощи.

[0022] В рамках изобретения термин «колонизированный как эндофит» относится к процессу, с помощью которого споры гриба проникают и образуют колонии грибов 40 внутри растения-хозяина, или его части, не вызывая симптомов или других признаков заболевания, или не нанося иного вреда хозяину.

[0023] В рамках изобретения термин «агент биологической защиты» относится к агенту, который способствует жизнеспособности, росту, мощности и/или урожайности растений; повышает степень прорастания и/или качество семян; повышает устойчивость к болезням, вредителям и/или экологическим стрессам, таким как неблагоприятные погодные или почвенные условия; контролирует заболевания или действует против

них или против патогенов, или пригоден для лечения или профилактики заболевания или патогена; или способствует восстановлению растений от повреждения и/или инфекции. Предпочтительным примером агента биологической защиты является BVT Cr-7 *Clonostachys rosea*, как описано в настоящем документе.

5 [0024] В настоящем описании «патоген» относится к микроорганизму, который может проникать в растение-хозяин и колонизировать его, и подавлять жизнеспособность, рост, мощность и/или урожайность растения. Примеры патогенов включают, но не ограничиваются этим, бактерии и грибки, такие как *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* и штаммы *Pythium*, *Alternaria*, *Monilia*, *Monilinia*, *Colletotrichum*,
10 *Cladosporium Rhizoctonia*, *Streptomyces*, *Didymella* и/или *Fusarium*.

Взаимодействие *Clonostachys rosea* с растениями и организмами, вызывающими заболевания растений

[0025] Не ограничиваясь теорией, считается, что BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* обеспечивает защиту растений с помощью различных механизмов, включая активацию
15 природной устойчивости растений к болезням и стрессам, а также за счет конкурентного исключения других патогенов.

[0026] *Clonostachys* воспроизводится с помощью большого числа микроскопических (5-7 мкм) бобовидных спор. При нанесении на растения споры прорастают с возникновением маленьких трубочек, из которых образуются чрезвычайно тонкие
20 ветви, и они проникают в ткани растений. Проникновение может происходить в живые лепестки, листья, раны растения, корни, клубни и другие части растений. Оказавшись внутри тканей, каждая ветвь образует микроскопическую грибковую колонию. Растения с колониями *Clonostachys* не проявляют никаких симптомов, таких как симптомы, вызываемые болезнетворными организмами (патогенами). После внедрения в качестве
25 эндофита внутрь растительных тканей *Clonostachys* может оказывать благотворное воздействие, например, индукцию природной устойчивости растений к болезням и стрессам.

[0027] Взаимоотношение микроскопических колоний *Clonostachys* с тканями растений резко изменяется, когда ткани растений начинают стареть, например, когда листья
30 впервые начинают желтеть или когда начинается развиваться заболевание или стресс. В это время маленькие колонии начинают быстро расти и часто полностью занимать соседние ткани. У *Clonostachys* этот рост начинается раньше, чем почти у всех других грибков и бактерий, которые растут на стареющих и умирающих растениях. Таким образом, *Clonostachys* является пионером в колонизации стареющих растительных
35 тканей. По сути дела он оккупирует ткани раньше других организмов, включая деструктивные патогены, такие как *Botrytis*, *Sclerotinia* и *Monilinia*. После того, как ткани оккупированы, другие организмы, включая патогены, не замещают оккупирующий организм. *Clonostachys* способен блокировать рост патогенов и других грибов просто за счет упреждающей оккупации тканей. Это конкурентное исключение является
40 основным способом, с помощью которого *Clonostachys* подавляет болезнетворные организмы и развитие заболевания у растений. Как показано в примерах, BVT Cr-7 *Clonostachys* является особенно эффективным в контроле заболеваний и патогенов у широкого круга разнообразных растений.

[0028] *Clonostachys* продуцирует споры, когда колонизированные ткани постепенно
45 стареют и умирают. Во многих случаях такие споры инициируют новые циклы эндофитного роста у ближайших живых растений. *Clonostachys* способен сохраняться некоторое время в мертвых растительных материалах, которые он колонизировал, когда они были живыми. Тем не менее, он обладает небольшой способностью расти

на мертвых растительных материалах, уже оккупированных другими грибами и бактериями. В такой ситуации *Clonostachys* не характеризуется хорошей конкуренцией с микробами, такими как *Penicillium* и *Aspergillus*, которые адаптированы к микробному миру растительных остатков и почвы.

5 [0029] *Clonostachys* обладает также способностью расти на гифах и мицелии других грибов (т.е. является микопаразитом). *Clonostachys* обычно атакует другой гриб только после создания очень тесного контакта с гифами, склероциями или другой частью гриба (т.е. абсолютного контакта или на расстоянии, приблизительно 1-5 мкм). Делая это, гифы *Clonostachys* иногда обвиваются вокруг гриба, являясь паразитами, «гриб-хозяин»
10 в основном погибает.

[0030] Не ограничиваясь теорией, основные способы, с помощью которых *Clonostachys* подавляет патогены и заболевания у растений, как полагают, представляют собой: А. Быструю оккупацию стареющих или поврежденных тканей, так, чтобы предотвратить рост патогенов в тканях; и В. Стимуляцию природных механизмов устойчивости
15 растений к болезнетворным организмам. Кроме того, *Clonostachys* способен инактивировать или уничтожить структуры, определяющие выживание грибов (например, склероции и различные виды спор в почве или на ней), путем паразитизма (т.е. роста на них как источниках питания). BVT Cr-7 представляет собой выделенный штамм *Clonostachys*, который обладает рядом характеристик, которые делают его
20 особенно эффективным в качестве агента биологической защиты для обработки растений.

Свойства и характеристики штамма BVT Cr-7

[0031] В одном варианте осуществления предлагается выделенный штамм *Clonostachys*, называемый BVT Cr-7. В одном варианте осуществления штамм представляет собой
25 штамм, депонированный под номером поступления 040913-01 в международный депозитарный орган Канады, расположенный в национальной микробиологической лаборатории, агентство общественного здравоохранения Канады, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2, Canada, 4 сентября 2013 г. В одном варианте осуществления «штамм BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*» или «BVT Cr-7» включает любые культуры,
30 споры, клетки и потомки, полученные из указанного штамма, например, путем бесполого размножения. Как описано в настоящем документе, BVT Cr-7 обладает рядом преимущественных свойств по сравнению с другими штаммами *Clonostachys*.

[0032] Например, в одном варианте осуществления BVT Cr-7 способен продуцировать споры на стандартных агаровых средах и семенах растений, таких как стерилизованные
35 семена зерновых культур. В одном варианте осуществления BVT Cr-7 обладает улучшенной способностью к продукции спор на стандартных агаровых средах и семенах растений, таких, как стерилизованные семена зерновых по сравнению с другими штаммами *Clonostachys rosea* f. *rosea*, такими как 88-710 (по-другому известный как AFr-710, PG-710). Штамм 88-710 описан в статье Sutton et al., Evaluation of the Fungal Endophyte
40 *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 (включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В одном варианте осуществления семена зерновых представляют собой семена пшеницы и ячменя. В одном варианте осуществления BVT
45 Cr-7 пригоден для получения инокулята для использования при обработке растений.

[0033] В одном аспекте BVT Cr-7 способен существовать в растениях как эндофит. В одном варианте осуществления BVT Cr-7 способен существовать как эндофит в корнях растений, таких как корни культурных растений. В одном варианте осуществления BVT

Cr-7 характеризуется улучшенной способностью существовать как эндофит в корнях растений по сравнению с другими штаммами *Clonostachys rosea* f. *rosea*, такими как 88-710. Например, в одном варианте осуществления BVT Cr-7 характеризуется улучшенной способностью существовать как эндофит в культурных растениях и/или в таких растениях, как небольшие зерновые злаки, газонные травы, горох, канола, соя, перец, помидоры и огурцы.

[0034] В одном варианте осуществления BVT Cr-7 способен существовать как эндофит в листьях и/или цветах растений. В одном варианте осуществления BVT Cr-7 характеризуется улучшенной способностью существовать как эндофит в листьях и цветах растений по сравнению с другими штаммами *Clonostachys rosea* f. *rosea*, такими как 88-710. Например, в одном варианте осуществления BVT Cr-7 характеризуется улучшенной способностью существовать как эндофит в листьях и/или цветах минироз, клубники, подсолнечника и канолы.

[0035] В другом аспекте BVT Cr-7 способен подавлять и/или контролировать заболевание у растений. В одном варианте осуществления BVT Cr-7 способен подавлять и/или контролировать заболевание у растений, вызванное патогенами, такими как другие грибы или микроорганизмы. В одном варианте осуществления BVT Cr-7 обладает улучшенной способностью подавлять или контролировать заболевания у других растений по сравнению с другими штаммами *Clonostachys rosea* f. *rosea*, такими как 88-710. Например, в одном варианте осуществления BVT Cr-7 обладает улучшенной способностью подавлять или контролировать заболевания, которые влияют на листья, цветы, плоды и/или корни растений. В одном варианте осуществления заболевание вызвано *Botrytis cinerea* (заболевания серой плесенью), *Sclerotinia sclerotiorum* (заболевания белой плесенью) и/или штаммами *Pythium* spp., *Rhizoctonia*, и/или *Fusarium* (корневые гнили и другие заболевания).

[0036] В одном варианте осуществления BVT Cr-7 способен уменьшать порчу растительных материалов. Например, в одном варианте осуществления контактирование собранного растительного материала с BVT Cr-7, например, путем обработки спреем, снижает случаи заболевания гнилью по сравнению с необработанным растительным материалом.

Применение BVT Cr-7 для растений и/или их частей

[0037] В одном варианте осуществления способы и варианты применения, описанные в настоящем документе, включают контактирование растения или растительного материала с BVT Cr-7. В одном варианте осуществления BVT Cr-7 экспонируется с растениями или растительным материалом так, чтобы способствовать эндофитной колонизации растений или растительного материала. BVT Cr-7 может быть нанесен на любую часть растения, включая листья растений, цветы, корни, клубни и/или семена, любым известным способом, включая нанесение с помощью спрея, мелкокапельного распыления, окунания, питательных растворов и/или путем векторизации насекомыми, в зависимости от применения.

[0038] Например, молодые растения для пересадки можно обрабатывать путем пропитки материала почвы или путем погружения растений при пересадке.

[0039] В другом примере, заболевания, вызванные патогенами, инфицирующими цветки, часто можно эффективно контролировать с помощью применения BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* к цветкам, например, путем обработки распылением или векторизации насекомыми, например, путем использования метода векторизации пчелами, как описано в заявке РСТ No. WO2012/135940 и заявке РСТ РСТ/CA2013/050179, содержание которых включено в данное описание в качестве ссылки в полном объеме. В одном варианте

осуществления векторизация пчелами позволяет обрабатывать цветковые культуры, так как пчелы доставляют *Clonostachys* к только что распуску цветкам каждый день (в отличие, например, от еженедельных спреев).

[0040] Другие примеры применения включают использование *Clonostachys* для листьев тепличных культур с помощью сверхнизкого объема мелкокапельного распыления или обычного распыления для контроля патогенов, таких как *Botrytis* на листьях и ранах стеблей, возникающих в ходе удаления листьев и других методов обрезки; обработки спреем с *Clonostachys* трав на полях для гольфа для контролирования заболевания долларовым пятнышком (*Sclerotinia*), снежной плесенью (*Typhula*, *Microdochium*) и других заболеваний листьев; нанесение *Clonostachys* на свежие раны (в течение 48 часов) часто обеспечивает длительную защиту против многих инфицирующих раны болезнетворных организмов, например, при прививке, обрезке и у поврежденных растений; и семена могут быть обработаны *Clonostachys* (с последующим ростом гриба в корневых системах) для повышения способности культур, таких как полевая горох, поддерживать рост в условиях стресса в виде засухи или производственной практики (включая использование некоторых пестицидов).

[0041] В одном варианте осуществления BVT Cr-7, как описано в настоящем документе, может быть пригоден для контроля за патогенами, такими как *sclerotinia sclerotiorum*, *monilinia vaccinii-corymbosi* и/или *botrytis cinerea*, в различных культурах, включая канолу, подсолнечник, малину, голубику, клубнику, яблоко, грушу, киви, арбуз, кофе, манго, авокадо, вишню, сливу, миндаль, персик, кешью, гуаву, люцерну, гречиху, клевер, фасоль, горох, лук, соевые бобы, хлопок, горчицу, ежевику, крыжовник, перец, баклажаны и смородину.

[0042] В некоторых вариантах осуществления BVT Cr-7 наносится на растения в виде экспозиции с одной дозой или в виде экспозиций с несколькими дозами в разное время. Например, в одном варианте осуществления растения получают дозу или экспонируются с BVT Cr7, например, путем распыления или векторизации насекомыми с помощью пчелиного улья, оборудованного подходящим инокуляционным диспенсером, по меньшей мере, порознь 2 дня, 4 дня, 1 неделю, 2 недели, 1 месяц или более 1 месяца.

[0043] В одном варианте осуществления растения контактируют с BVT Cr-7 один или более раз в течение годового цикла роста целевого растения. Например, в одном варианте осуществления BVT Cr-7 наносится на растения весной в начале вегетации и/или осенью в конце вегетационного периода. В одном варианте осуществления BVT Cr-7 наносится на растения до сбора растительных материалов, например, за 1 неделю, 2 недели, 3 недели или за 4 недели до сбора растительных материалов.

Композиции для инокуляции растений

[0044] В одном аспекте предлагается состав, включающий BVT Cr-7, который подходит для инокуляции растений или растительных материалов. Необязательно состав может быть твердым веществом, таким как порошкообразный состав, или раствором, таким как водный раствор. В одном варианте осуществления состав включает лиофилизированные споры BVT Cr-7. В одном варианте осуществления составы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в качестве инокулятов для обработки растений.

[0045] В одном варианте осуществления состав может включать различные добавки, объединенные с выделенной культурой или спорами грибка, происходящими от штамма BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*.

[0046] Специалисту в данной области техники будет понятно, что концентрация клеток или спор в составе может варьироваться в зависимости от условий, в которых

предполагается использовать состав (например, от климата, целевого растения, способа нанесения состава на растения или растительные материалы и т.д.).

[0047] В некоторых вариантах осуществления состав представляет собой твердый состав и может включать от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 4×10^8 спор на грамм состава, необязательно от приблизительно 2×10^8 до приблизительно 4×10^8 спор на грамм состава.

[0048] В некоторых вариантах осуществления добавки включают один или более из стабилизирующего агента, агента для поглощения влаги, аттрактанта, разбавителя и/или предотвращающего слипание агента. В некоторых вариантах осуществления добавки могут включать два или более из стабилизирующего агента, агента для поглощения влаги, аттрактанта, разбавителя и/или агента, предотвращающего слипание. В одном варианте осуществления состав пригоден для векторизации насекомыми, например, как описано в патенте РСТ/СА2013/050179, включенном в данное описание в качестве ссылки.

[0049] В одном варианте осуществления состав включает стабилизирующий агент. Стабилизирующий агент служит для предотвращения или сведения к минимуму распада, разрушения или активации спор грибка перед доставкой к целевому растению. Примеры стабилизирующих агентов включают частицы силиката кальция. Например, в некоторых вариантах осуществления состав может включать споры грибка, и споры грибка могут быть связаны, по меньшей мере, с некоторыми частицами силиката кальция. Состав может иметь плотность от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 4×10^9 спор на грамм силиката кальция, с которым они связаны. В одном варианте осуществления состав может иметь приблизительно 2×10^9 спор на грамм силиката кальция, с которым они связаны.

[0050] В одном варианте осуществления состав включает агент для поглощения влаги. Агент для поглощения влаги служит для поглощения влаги из состава для того, чтобы сохранить состав относительно сухим и предотвратить слеживание или комкование состава. Примеры увлажняющих агентов включают поглотители влаги, такие как частицы или шарики силикагеля, и сверхвпитывающие полимеры, такие как полиакрилат натрия. Другие примеры абсорбирующих влагу агентов включают древесную стружку и шарики глины.

[0051] В одном варианте осуществления состав включает аттрактант. Аттрактант может способствовать привлекательности состава для растений и/или векторизации насекомыми. Например, аттрактант может иметь чистый положительный электростатический заряд, так что он электростатически притягивается к растениям и/или векторизации насекомыми, которые имеют суммарный отрицательный электростатический заряд. В некоторых примерах аттрактант может включать минерал или смесь минералов. В одном конкретном примере аттрактант может включать минеральную смесь, продаваемую Agri-Dynamics (Martins Creek, PA) под названием DYNA-MIN™, которая включает следующие минералы: диоксид кремния, оксид алюминия, кальций, железо, магний, калий, натрий, фосфор, титан, марганец, стронций, цирконий, литий, рубидий, бор, цинк, ванадий, хром, медь, иттрий, никель, кобальт, галлий, цезий, скандий, олово, молибден, а также дополнительные микроэлементы. В другом примере аттрактант может включать карбонат кальция.

[0052] В одном варианте осуществления состав включает разбавитель. Разбавитель может представлять собой подходящий крахмал или муку. В тех примерах, где состав должен быть доставлен с помощью векторизации насекомыми, разбавитель может

быть выбран таким образом, чтобы он не раздражал или не вредил насекомым и не был съеден насекомыми. Разбавитель может быть дополнительно выбран так, чтобы он не поглощал значительное количество влаги, таким образом, чтобы разбавитель не слеживался. Примерами разбавителей, которые могут быть пригодны для векторизации насекомых, включают кукурузную муку и зерновую муку, такую как ржаная, пшеничная, рисовая мука и муку пшеницы спельты. В альтернативных примерах разбавитель может представлять собой каолин. В других примерах разбавитель может включать молочный порошок или тальк. Они могут быть особенно полезными в тех примерах, где состав доставляется способом, отличным от векторизации насекомыми, например, путем распыления.

[0053] В одном варианте осуществления состав включает подходящий агент против слеживания. Один конкретный пример агента против слеживания представляет собой оксид магния. Другие агенты против слеживания, известные специалистам в данной области техники, также могут быть использованы в составах, описанных в данном документе.

[0054] В одном варианте осуществления состав представляет собой жидкую композицию, такую как водная суспензия. В одном варианте осуществления состав включает приблизительно от 1 до 6×10^5 спор/мл и, необязательно, приблизительно от 2 до 5×10^5 спор/мл. В одном варианте осуществления состав представляет собой жидкую композицию, и включает один или более агрономически приемлемых носителей или разбавителей. В одном варианте осуществления жидкий состав включает один или более стабилизаторов.

Предлагаются также способы получения агента биологической защиты, как описано в данном документе, такого как инокулят, включающий эффективное количество BVT Cr-7. Например, в одном варианте осуществления предлагается способ, включающий предоставление выделенной культуры BVT Cr-7; инокуляцию субстрата выделенной культурой BVT Cr-7 и инкубацию субстрата в условиях, подходящих для роста грибка. В одном варианте осуществления инокулированный субстрат инкубируют при относительной влажности выше 90% или выше 95% и при температуре в диапазоне 20-24 градуса по Цельсию.

[0056] В одном варианте осуществления субстрат представляет собой стерильный субстрат. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает инкубацию субстрата в условиях, подходящих для споруляции гриба. Условия, подходящие для споруляции *Clonostachys rosea*, известны в данной области техники. Например, в одном варианте осуществления условия, подходящие для споруляции гриба, включают выращивание BVT Cr-7 на субстрате, таком как стерилизованные семена, при температуре приблизительно 20-24 градуса по Цельсию, при высоком уровне влажности (более 95%) в течение нескольких дней, чтобы позволить грибу расти перед снижением относительной влажности до менее приблизительно 50%, необязательно, приблизительно 20-50%, 35-45%, или приблизительно 20-25% в течение, по меньшей мере, 10 дней, по меньшей мере, 2 недель или более 2 недель для содействия обильному получению спор. Авторы настоящего изобретения установили, что снижение уровня относительной влажности приблизительно до 35-45% в течение, по меньшей мере, приблизительно 2 недель особенно эффективно для получения спор гриба BVT Cr7. В одном варианте осуществления стерилизованные семена представляют собой семена ячменя. В одном варианте осуществления субстрат аэрируют в процессе получения спор. Предпочтительно, чтобы субстрат инкубировали в стерильных условиях, чтобы избежать загрязнения другими микробами.

[0057] В одном варианте осуществления способ дополнительно включает удаление спор из субстрата необязательно путем суспендирования в водном растворе. В одном варианте осуществления споры удаляют из субстрата для получения инокулята.

5 Необязательно, споры могут быть удалены из субстрата, и затем лиофилизованы или обработаны иначе, как известно в данной области техники, для получения агента биологической защиты. В одном варианте осуществления способ включает смешивание инокулята с одним или более дополнительными ингредиентами, такими как стабилизирующий агент, агент для поглощения влаги, аттрактант, разбавитель и/или агент против слеживания, для получения состава, как описано в настоящем документе.

10 В одном варианте осуществления способ включает удаление спор из субстрата с помощью смешивания субстрата со стерильной водой. В одном варианте осуществления способ включает встряхивание смеси, отфильтровывание слипшегося или слоистого материала, осторожное центрифугирование фильтрата и ресуспендирование осажденного материала для получения водного раствора.

15 **Дополнительные варианты**

[0058] В одном варианте осуществления предлагается способ контролирования патогенов у растений, включающий введение BVT Cr-7, как описано в настоящем документе, в растение или растительный материал. Например, изоляты, споры и композиции BVT Cr-7, как описано в настоящем документе, могут быть использованы

20 в качестве профилактического агента для уменьшения вероятности инфицирования, возникающего у растений или растительного материала, особенно инфицирования патогенным грибом, таким как *Botrytis* или *Sclerotinia*.

[0059] Предлагается также способ контролирования патогенов у растений, причем способ включает обработку партии семян культурами или составами, раскрытыми в

25 данном описании, и последующее культивирование обработанных семян до растений.

[0060] Предлагается также композиция, включающая BVT Cr-7, как описано в настоящем документе, и носитель или разбавитель, и, необязательно, дополнительно включающая дополнительный агент биологической защиты, такой как противогрибковый агент или пестицид. Композиция может представлять собой

30 композицию для обработки семян, композицию для обработки растений или композицию для обработки почвы. В одном варианте осуществления носитель или разбавитель представляет собой приемлемый для сельского хозяйства носитель или разбавитель, который помогает обеспечить стабильность и активность композиции. В одном варианте осуществления носитель или разбавитель совместим с агентом биологической защиты,

35 приемлемым для сельского хозяйства, и обладает хорошей абсорбционной способностью и подходящей насыпной плотностью, что позволяет легко диспергировать и присоединять частицы.

[0061] Композиции, описанные в настоящем документе, содержащие BVT Cr-7, могут, например, применяться для семян или при размножении растений, для среды роста

40 (например, почвы или воды), для корней растений и/или для листьев растений, для цветов или пестиков растений, или для любого их сочетания. Примеры растений, которые можно обрабатывать с помощью представленных композиций, включают, но не ограничиваются этим, сельскохозяйственные культуры, такие как семенные культуры, зерновые культуры, лубяные культуры, бобовые культуры, плодовые культуры, лесные

45 культуры и газонные травы.

[0062] Композиции, включающие BVT Cr-7, описанные в настоящем документе, могут быть нанесены на растение в виде водных спреев, гранул и составов пудры/порошка в соответствии с установленной практикой в данной области техники. Водный спрей

обычно получают путем смешивания смачиваемого порошка или композиции эмульгируемого концентрата выделенной культуры или спор BVT Cr-7 с относительно большим количеством воды с образованием дисперсии.

[0063] Приведенное выше описание в общих чертах описывает настоящую заявку. Более полное понимание может быть достигнуто путем ссылки на последующие конкретные примеры. Эти примеры описаны только с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения объема изобретения. Изменения в форме и замена эквивалентов рассматриваются как обстоятельства, которые могут предлагаться или быть целесообразными. Хотя в данном описании использовались конкретные термины, такие термины предлагаются в описательном смысле, а не с целью ограничения.

[0064] Следующие неограничивающие примеры иллюстрируют варианты осуществления настоящего изобретения:

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Выделение штамма BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*

[0065] Несколько видов культурных растений (пшеницу, сою, кукурузу, люцерну, травы) собирали в полях вблизи Guelph, Ontario в качестве возможных источников новых штаммов *Clonostachys roseum* f. *roseum*. Штамм гриба, описанный в настоящем документе как BVT Cr-7, был выделен из корня здорового молодого растения пшеницы (на ранней стадии кущения), взятого с поля вблизи Arkell, Ontario. Ряд других штаммов *Clonostachys rosea* f. *rosea* (от BVT Cr-1 до BVT Cr-14) также выделяли, как указано ниже.

[0066] Процедура, используемая для выделения штаммов *Clonostachys* из корней растений пшеницы и других культур, выполнялась следующим образом. Всегда применялись асептические методы. Корни от нескольких растений промывали в водопроводной воде для удаления почвы, высушивали на бумажных полотенцах и затем разрезали на сегменты длиной 1-2 см. Сегменты промокали досуха бумажными тканями и инкубировали на паракват-хлорамфеникол-агаровой среде в чашках Петри при 20-20°C. Паракват ускоряет старение корней, что позволяет *Clonostachys* относительно быстро (например, в течение 6-8 дней) образовывать споры на поверхности корней, которые он ранее колонизировал. Структуры споруляции (конидиофоры и конидии, которые они несут) являются основой для выявления и идентификации гриба. Конидии (т.е. споры) могут быть удалены и пророщены в культуре.

[0067] Для выделения гриба споры переносили на стерильной игле с конидиофоров на корнях в чашки Петри со средой картофельного агара с декстрозой (PDA), дополненной стрептомицином (для подавления бактерий). После прорастания спор и получения колоний на агаровой среде, гриб субкультивировали в чашках Петри на среде PDA-стрептомицин. Споры субкультур суспендировали в стерильной дистиллированной воде, и суспензии последовательно разбавляли и высевали на PDA. Колонии, растущие из одиночных спор, переносили в свежую агаровую среду в чашках Петри и поддерживали в культуре при 4°C в виде серий изолятов для дальнейшей характеристики в качестве возможных агентов биологической защиты.

[0068] Серии выделенных штаммов затем тестировали и сравнивали друг с другом и с установленными штаммами *Clonostachys rosea* f. *rosea*, включая 88-710 и EV-1a. Штамм 88-710 описан в статье 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 (включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

[0069] Выделенный штамм BVT Cr-7 [Bee-Vectoring Technology *Clonostachys rosea* #7]

был затем идентифицирован в качестве превосходного изолята с помощью экспериментов, представленных в примерах 2 и 3. Выделенные культуры BVT Cr-7 затем поддерживали и депонировали под номером поступления 040913-01 в международный депозитарный орган Канады, расположенный в национальной микробиологической лаборатории, агентство общественного здравоохранения Канады, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, R3E 3R2, Canada, 4 сентября 2013 г.

Пример 2: Тестирование и характеристика BVT Cr-7 относительно других штаммов *Clonostachys rosea* f. *rosea*

[0070] Новый выделенный штамм BVT Cr-7 и два дополнительных штамма *Clonostachys rosea* f. *rosea* (88-710 и EV-1a) сравнивали в сериях экспериментов, предназначенных для оценки их свойств в качестве агентов биологической защиты для обработки растений. BVT Cr-7, как установлено, при сравнении с 88-710 и/или EV-1a является эквивалентным или превосходит их, основываясь на каждом из следующих критериев:

- Рост и обилие продукции спор на стандартных агаровых средах и на субстратах, таких как стерилизованные семена зерновых культур (пшеницы и ячменя), которые могут быть использованы для промышленного производства инокулятов.
- Возможность обильно закрепляться внутри корней (т.е. как эндофит) разнообразных видов культурных растений, включая мелкие озеренные зерновые культуры, газонные травы, горох, канолу, соевые бобы, перец, помидоры и огурцы.
- Возможность закрепляться в качестве эндофита в листьях и цветах нескольких опытных растений (минироз, клубники, подсолнечника, канолы).
- Способность подавлять или контролировать широкий спектр деструктивных заболеваний, которые поражают листья, цветы, плоды и корни, особенно вызванных *Botrytis cinerea* (заболеванием серой плесенью), *Sclerotinia sclerotiorum* (заболеванием белой плесенью) и штаммами *Pythium* spp., *Rhizoctonia* и *Fusarium* (корневой гнилью и другими заболеваниями).

[0071] Следовательно, BVT Cr-7 обладает желаемым профилем рабочих характеристик против различных заболеваний у различных видов культур и обычно проявляет предпочтительную активность в качестве агента биологической защиты по сравнению с 88-710 и/или EV-1a.

Пример 3: Характеристики BVT Cr-7 при контроле заболеваний у растений

[0072] BVT Cr-7 наносили на серии растений и культур с целью оценки его активности в полевых испытаниях. В частности, BVT Cr-7 наносили на цветы следующих растений (например, с помощью векторизации пчелами или обработки спреем) для контроля заболеваний, вызванных конкретными патогенами:

- подсолнечник: *Sclerotinia*, *Botrytis* и *Fusarium*
- канола: *Sclerotinia*
- голубика: *Monilinia*, *Sclerotinia*, *Botrytis* и *Phomopsis*
- клубника: *Botrytis*, *Phomopsis* и *Rhizopus*
- малина: *Botrytis*
- виноград: *Botrytis*, *Phomopsis*

[0073] BVT Cr-7 наносили также на корни парниковых гидропонных культур (с помощью питательного раствора) и, как показано, он контролировал заболевания, вызываемые *Pythium* и *Fusarium*, у перцев, огурцов и томатов.

[0074] BVT Cr-7 наносили (в виде спрея) на листья газонных трав, тепличных перцев и тепличных томатов. BVT Cr-7, как обнаружено, контролировал заболевания, вызываемые *Sclerotinia*, *Typhula* и *Microdochium*, у газонных трав, *Fusarium* у тепличных

перцев и *Botrytis* у тепличных томатов.

Полевые испытания BVT Cr-7 для обработки земляники

[0075] Испытание проводили в Ontario, где четыре колонии шмелей располагали в центре поля из четырех акров экологически чистой клубники. Каждую коробку колонии («улей») оснащали дозатором для опыления шмелей порошковым составом BVT Cr-7 при их выходе из ульев. BVT Cr-7 выявлялся более чем в 80% цветов клубники по всему полю. Уровни гнили плодов на поле с векторизацией BVT Cr-7 шмелями были чрезвычайно низкими по сравнению с соседним полем экологически чистой клубники, которое не было обработано. В этом испытании BVT Cr-7 подавлял ягодную гниль *Botrytis* на >90%, ягодную гниль *Phomopsis* на 100% и гниль *Rhizopus* («раневую водянистую гниль») на 93%.

Полевые испытания BVT Cr-7 для обработки подсолнечника

[0076] Тест с векторизацией BVT Cr-7 шмелями проводили на поле подсолнечника около Ripley Ontario. Собранные семена с обработанного поля и с контрольного поля в области (без шмелей или BVT Cr-7) сравнивали при лабораторных анализах. Всхожесть семян при обработке векторизацией шмелями была на 27% выше, чем у контрольных семян (т.е. 89,7% по сравнению с 70,7%). Обработка BVT Cr-7 также снижала уровень нескольких нежелательных форм плесени на семенах (*Fusarium*, *Botrytis* и *Penicillium*).

[0077] Шмели существенно векторизировали BVT Cr-7, по меньшей мере, на 360 м от ульев до цветов. BVT Cr-7 эффективно закреплялся в качестве эндофита в больших пропорциях в соцветиях и семенах головок подсолнечника. Деструктивный патоген *Sclerotinia* не был найден в головках подсолнечника, колонизированных BVT Cr-7, но присутствовал в 20-25% головок за пределами диапазона векторизации BVT Cr-7 пчелами. Растениеводы сообщили, что урожайность семян увеличилась более чем на 20% (влияние опыления плюс BVT Cr-7) и качество улучшилось особенно в отношении более крупного размера семян (и, следовательно, большего содержания масла) и снижения плесени на собранных семенах.

Полевые испытания BVT Cr-7 для обработки голубики

[0078] Испытания на острове принца Эдуарда показали, что BVT Cr-7, наносимый шмелями в виде порошковой композиции или в виде спреев суспензий спор в воде, может закрепляться в качестве эндофита в цветах, ягодах и листьях низкорослых кустов голубики. Обработки приводили к увеличению доли здоровых ягод на 70-100%. BVT Cr-7 сильно снижал случаи мумифицирования ягод, основного заболевания голубики, вызванного грибом *Monilinia vaccinii-corymbosi*, включая случаи, когда погодные условия были чрезвычайно благоприятны для заболевания. BVT Cr-7 также заметно снижал потемнение и преждевременное опускание ягод, что, как нашли изобретатели, обусловлено до сих пор не описанным заболеванием, вызываемым *Sclerotinia sclerotiorum*. При испытании в течение одного года заболевание *Sclerotinia* было, по меньшей мере, таким же вредоносным как мумификация ягод у необработанной голубики. Нанесения спреев BVT Cr-7 в надлежащие периоды времени были эффективны против некроза *Phomopsis* у низкорослых кустов голубики и в испытании на высокорослых кустах голубики в Ontario. Таким образом, BVT Cr-7 представляет собой агент широкого спектра биологической защиты против основных заболеваний, которые поражают голубику в поле.

[0079] Следовательно, штамм BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea* способен контролировать широкий спектр заболеваний, имеющих важное экономическое значение у многочисленных видов культур.

Пример 4: Рабочие характеристики BVT Cr-7 в контролируемых условиях

[0080] BVT Cr-7 был протестирован на ряде конкретных культур с целью оценки его использования в качестве агента биологической защиты:

[0081] А. Рассада канолы: Обработка семян BVT Cr-7 дала очень сильное подавление высоко агрессивного штамма *Rhizoctonia solani* в стерилизованной почве и корневой гнили *Rhizoctonia* в почве поля.

[0082] В. Собранная морковь (корнеплоды): BVT Cr-7 сильно подавлял гниль *Sclerotinia* при совместной с патогеном инокуляции на морковь при моделируемом хранении.

[0083] С. Кочаны брокколи: Обработка спреем с BVT Cr-7 контролировала *Alternaria*, *Cladosporium* и преждевременное обесцвечивание сохранных кочанов брокколи.

[0084] D. Персики: Аэрозольное нанесение BVT Cr-7 на свежие персики значительно подавляло частоту и скорость развития бурой гнили (*Monilia*) в плодах.

[0085] Е. Мискантус: Погружение корневищ мискантуса в суспензию спор BVT Cr-7 перед хранением обеспечивало защиту от гнили, обусловленной *Rhizoctonia*, *Fusarium* и *Rhizoctonia* в течение нескольких месяцев холодного хранения.

[0086] На основании этих результатов BVT Cr-7 продемонстрировал более широкие доказанные высокие рабочие характеристики в отношении устойчивости к болезням при различных условиях у более высокого числа типов культур, чем другие штаммы *S. rosea* f. *rosea*.

Пример 5: Обработка тепличных томатов с использованием BVT Cr-7

[0087] Цветы парниковых томатов, обработанные BVT-Cr7 *Clonostachys rosea*, и необработанные контрольные цветы оценивали на *Clonostachys rosea*, *Botrytis cinerea* и обычные плесени.

[0088] BVT Cr-7 *S. rosea* доставляли на растения с использованием векторизации пчелами с помощью оснащения ящика колонии (улья шмелей) диспенсером инокулята с целью доставки инокулята к цветам томатов в сравнительно небольшой коммерческой теплице (менее четверти акра) на испытательном участке в Новой Шотландии, Канада.

Лабораторные методы

[0089] Образцы цветов томата были получены с испытательного участка в отличном состоянии. Каждый образец включал четыре цветка в небольшом пластиковом пакете. Четыре цветка каждого образца помещали в чашки Петри на паракват-хлорамфеникол-агаровую (РСА) среду 20 июня 2014 г. и инкубировали в прозрачных пластиковых коробках при 21-25°C при слабом дневном свете в течение 7 дней. Каждый цветок затем оценивали микроскопически на *Clonostachys rosea*, *Botrytis cinerea* и обычные плесени.

Паракват ускоряет естественное старение тканей растений и тем самым позволяет *Clonostachys rosea* продуцировать споры и таким образом они идентифицируются. Другие грибы также могут расти и образовывать споры на тканях по мере их старения и умирания.

Результаты

[0090] Как показано в таблице 1, споруляция агента биологической защиты BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* наблюдалась на 87,5% обработанных цветов и 0% необработанных цветов. Споруляция *S. rosea* на кластерах тычинок плюс пестиков обработанных цветов была плотной и интенсивной почти во всех случаях, так что конусообразная форма этих кластеров выглядела почти полностью белой. Споруляция на лепестках большинства обработанных цветов была от умеренной до сильной.

[0091] Споруляция патогена *Botrytis cinerea* была обнаружена на 12% необработанных цветов (и была светлой во всех случаях) и на 0% цветов, обработанных *S. rosea*.

[0092] Обычные парниковые плесени наблюдались на образцах в различной степени.

Они включали в основном штаммы *Cladosporium* (не относящиеся к *Fulvia fulvum*), *Aspergillus*, *Penicillium* и, *Alternaria alternata* и грибок, напоминающий *Acromonium*. Для предоставления количественной информации о влиянии *S. rosea* на эти плесени, каждый цветок оценивали на «плесени» (т.е. любые грибы, отличные от *S. rosea* или *Botrytis*) по шкале 1-5, представленной в таблице 1, где 1 представляет собой нулевой след плесени и 5 представляет собой очень сильную плесень. Области цветов со спорующей этих плесеней были очень низкими (средняя оценка 1,80/5,00) в цветах, в которых закрепился и спорулировал *S. rosea*, но высокие (4,55/5,00) в отсутствие *S. rosea* (включая все контрольные цветы). Таким образом, агент биологической защиты BVT Cr-7, как обнаружено, заметно подавляет эти плесени в дополнение к *Botrytis*. По существу высеянные цветы после обработки *S. rosea* оказались очень «чистыми» по сравнению с необработанными цветами.

No. образца	Цветы, обработанные BVT-Cr7			Необработанные контрольные цветы		
	BVT-Cr7+ из 4	Степень плесени*	Суммарно	Степень плесени*	Суммарно	<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%		Суммарно 101		Суммарно 255		7
Средняя степень на цветок 1,80				4,55		

[0093] Примечательно, что использование векторизации пчелами для доставки инокулята BVT-Cr7 создавало возможность быстрого и полного эндофитного закрепления агента биологической защиты в цветах, судя по заметным уровням спорующей, наблюдаемым после того, как цветы инкубировали в течение недели на РСА.

[0094] Наблюдалось прекрасное закрепление *S. rosea* в кластерах «тычинок плюс пестиков», и это имеет особое значение, учитывая, что они являются основными воротами поступления патогенов.

[0095] Наблюдалась явное полное подавление *B. cinerea* и значительное подавление различных тепличных форм плесени в цветах, колонизированных *S. rosea*, что указывает на широкий спектр возможностей и активности BVT Cr-7 против других грибов (например, путем конкурентного исключения).

[0096] Несмотря на то, что настоящее изобретение описано со ссылкой на то, что в настоящее время считается предпочтительными примерами, следует понимать, что применение не ограничено описанными примерами. Наоборот, изобретение предназначено для охвата различных модификаций и эквивалентных установок, включенных в рамки сущности и объема прилагаемой формулы изобретения.

[0097] Все публикации, патенты, патентные заявки и биологические депозиты включены в данное описание в качестве ссылки в полном объеме в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, патентная заявка или биологический

депозит были конкретно и индивидуально указаны, как включенные в качестве ссылки в полном объеме.

(57) Формула изобретения

- 5 1. Выделенный штамм IDAC 040913-01 гриба *Clonostachys rosea* f. *Rosea*, используемый в качестве агента биологической защиты растений.
2. Выделенный штамм по п. 1, где контактирование растения с выделенным штаммом подавляет или защищает от заболевания серой плесенью, заболевания белой плесенью, бурой гнили, корневой гнили и/или фомопсиса.
- 10 3. Выделенный штамм по п. 1, где контактирование растения с выделенным штаммом подавляет или защищает от заболевания, вызываемого *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* и/или штаммами *Pythium* spp., *Rhizoctonia* и/или *Fusarium*.
4. Споры гриба, полученные из выделенного штамма *Clonostachys rosea* f. *rosea* по любому из пп. 1-3.
- 15 5. Споры гриба по п.4, где споры получают путем инкубации выделенного штамма на субстрате в условиях, подходящих для споруляции.
6. Композиция, включающая выделенный штамм по любому из пп. 1-3 или споры гриба по п.4 или 5 и носитель или разбавитель, причем композиция используется в качестве агента биологической защиты растений.
- 20 7. Композиция по п.6, где композиция находится в жидкой форме или в твердой форме.
8. Композиция по п.7, где композиция находится в твердой форме и дополнительно включает одно или более из стабилизирующего агента, агента для поглощения влаги, аттрактанта, разбавителя и/или агента, предотвращающего слипание.
- 25 9. Композиция по п.8, где стабилизирующий агент представляет собой частицы силиката кальция.
10. Композиция по п.8, где агент для поглощения влаги включает осушители, частицы или гранулы силикагеля, гиперабсорбирующие полимеры, полиакрилат натрия, древесные стружки и/или шарики глины.
- 30 11. Композиция по п.8, где аттрактант включает минералы.
12. Композиция по п.11, где минералы включают одно или более из диоксида кремния, оксида алюминия, кальция, железа, магния, калия, натрия, фосфора, титана, марганца, стронция, циркония, лития, рубидия, бора, цинка, ванадия, хрома, меди, иттрия, никеля, кобальта, галлия, цезия, скандия, олова, молибдена и/или карбоната кальция.
- 35 13. Композиция по п.8, где аттрактант включает Dyna-MIN™.
14. Композиция по п.6, где композиция включает споры гриба по п.4 или 5, и композиция содержит от приблизительно 1×10^8 до 4×10^8 спор на грамм композиции, необязательно от приблизительно 2×10^8 до 4×10^8 спор на грамм композиции.
- 40 15. Способ обработки растения агентом биологической защиты растений, включающий контактирование растения с выделенным штаммом, спорами гриба или композицией по любому из пп. 1-13.
16. Способ по п.15 для предупреждения или лечения *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* spp., *Alternaria*, *Monilia*, *Monilinia*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Rhizoctonia*, *Streptomyces*, *Didymella* и/или *Fusarium* у растения.
- 45 17. Способ по п.15 для предупреждения или лечения заболевания серой плесенью, заболевания белой плесенью, бурой гнили, корневой гнили и/или фомопсиса у растения.
18. Способ по п.15, где растение выбирают из подсолнечника, канолы, голубики, клубники, винограда, перца, огурцов, томатов, газонных трав, перца, томатов, брокколи,

персиков, рассады канолы и/или мискантуса.

19. Способ по п.15, где растение выращивают в теплице.

20. Способ по п.15, где контактирование растения с выделенным штаммом, спорами гриба или композицией включает нанесение спрея, мелкокапельного распыления, окунание или нанесение питательного раствора на растение.

21. Способ по п.15, где контактирование растения с выделенным штаммом, спорами гриба или композицией включает векторизацию насекомыми.

22. Применение выделенного штамма, спор гриба или композиции по любому из пп. 1-13 в качестве агента биологической защиты растений.

23. Применение по п.22 для улучшения жизнеспособности, роста и/или урожайности растения.

24. Применение по п.22 для лечения или профилактики заболевания или патогена у растения.

25. Применение по п.24, где патоген представляет собой *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* spp., *Alternaria*, *Monilia*, *Monilinia*, *Colletotrichum*, *Cladosporium Rhizoctonia*, *Streptomyces*, *Didymella* и/или *Fusarium*.

26. Применение по п.24, где заболевание представляет собой заболевание серой плесенью, заболевание белой плесенью, бурую гниль, корневую гниль и/или фомопсис.

27. Способ уменьшения порчи растительного материала, причем способ включает контактирование растительного материала с выделенным штаммом, спорами гриба или композицией по любому из пп. 1-13.

28. Способ по п.27, где растительный материал представляет собой фрукты, овощи или зерно.

29. Способ по п.27, где контактирование растительного материала включает нанесение спрея, мелкокапельного распыления или окунание растительного материала.

30. Способ по п.27, где растительный материал представляет собой собранный урожай.

31. Способ получения агента биологической защиты растений, включающий: инокуляцию субстрата выделенным штаммом по п.1; и

инкубацию субстрата в условиях, подходящих для роста гриба, для получения штамма BVT Cr-7 *Clonostachys rosea* f. *rosea*.

32. Способ по п.31, где условия, подходящие для роста гриба, включают относительную влажность более 95% и температуру в диапазоне 20-24 градуса по Цельсию.

33. Способ по п.31 или 32, где субстрат представляет собой стерильный субстрат, необязательно стерильные семена, такие как семена ячменя.

34. Способ по любому из пп. 31-33, дополнительно включающий инкубацию субстрата в условиях, подходящих для споруляции гриба.

35. Способ по п.34, где условия, подходящие для споруляции гриба, включают уменьшение относительной влажности до менее приблизительно 50%, необязательно до приблизительно 35-45%.

36. Способ по п.34 или 35, дополнительно включающий удаление спор с субстрата для получения инокулята.

37. Способ по п.36, включающий смешивание спор с носителем или разбавителем.