

	<p>(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)</p>	<p>(11) 공개번호 10-2015-0002663</p>	<p>(43) 공개일자 2015년01월07일</p>
<p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A01N 63/04</i> (2006.01) <i>A01N 25/12</i> (2006.01) <i>A01N 25/22</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2014-7028638 (22) 출원일자(국제) 2013년03월11일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2014년10월13일 (86) 국제출원번호 PCT/CA2013/050179 (87) 국제공개번호 WO 2013/134870 국제공개일자 2013년09월19일 (30) 우선권주장 61/609,540 2012년03월12일 미국(US)</p>	<p>(71) 출원인 비 벡터링 테크놀로지 인크. 캐나다, 온타리오주 엘7케이 1엔7, 칼레돈, 위리 엄 스트리트 이스트 48 (72) 발명자 마손 토드 고든 캐나다, 온타리오주 엘6엘 6브이8, 오크빌, 스프 링 아주어 크레센트 113 서튼, 존 클리포드 캐나다, 온타리오주 엔0비 1비 0, 아리스, 알.알. #1, 로드 39 (74) 대리인 김윤배, 이상목, 강철중</p>		
<p>전체 청구항 수 : 총 47 항</p>			
<p>(54) 발명의 명칭 미립자 칼슘 실리케이트 및 크로노스타치스 로세아를 포함하는 식물 치료용 제제</p>			

(57) 요약

비벡터링(bee vectoring)에 의한 식물적용용 분말 식물 치료 제제로서, 미립자 칼슘 실리케이트, 크로노스타치스 로세아, 제제에서 습기를 제거하기 위한 수분 흡수제, 제제가 식물을 유인하기 위한 유인제 및 희석제를 포함한 제제.

특허청구의 범위

청구항 1

식물의 치료용 제제로서,

- a) 미립자 칼슘 실리케이트; 및
- b) 미립자 칼슘 실리케이트와 결합된 식물 치료제를 포함하는, 제제.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 식물 치료제는 칼슘 실리케이트의 적어도 일부에 결합(bonded)하여 안정화된 식물 치료 미립자를 형성하는 것인, 제제.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 약 5 중량% 내지 15 중량%의 안정화된 식물 치료 미립자를 포함하는, 제제.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 약 7 중량% 내지 8 중량%의 안정화된 식물 치료 미립자를 포함하는, 제제.

청구항 5

제 2 항에 있어서, 칼슘 실리케이트의 적어도 일부는 자유 칼슘 실리케이트이며, 제제는 약 10 중량% 내지 25 중량%의 자유 칼슘 실리케이트를 포함하는 것인, 제제.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 약 17 중량% 내지 18 중량%의 자유 칼슘 실리케이트를 포함하는, 제제.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 식물 치료제는 미생물제(microbial agent)를 포함하는 것인, 제제.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 식물 치료제는 균류 포자를 포함하는 것인, 제제.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 식물 치료제는 크로노스타키스 로세아(*clonostachys rosea*)를 포함하는 것인, 제제.

청구항 10

제 7 항에 있어서, 식물 치료제는 비우베리아 바시아나(*beauveria bassiana*)를 포함하는 것인, 제제.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

- a) 식물 치료제는 균류 포자를 포함하고;
- b) 균류 포자는 칼슘 실리케이트의 적어도 일부에 결합되고; 그리고
- c) 식물 치료제는 결합되는 칼슘 실리케이트 1 g 당 약 1×10^9 내지 4×10^9 포자의 밀도를 가지는 것인, 제제.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 결합되는 칼슘 실리케이트 1 g 당 약 2×10^9 포자를 포함하는, 제제.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 제제 1 g 당 약 2×10^8 내지 4×10^8 의 포자를 포함하는 것인, 제제.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 미립자 칼슘 실리케이트는 약 45 미크론 내지 약 75 미크론의 체 규격(sieve designation)을 가지는 미립자를 포함하는 것인, 제제.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 미립자 칼슘 실리케이트는 약 45 미크론의 체 규격을 가지는 입자를 포함하는 것인, 제제.

청구항 16

제 1 항에 있어서, 미립자 칼슘 실리케이트 및 식물 치료제와 혼합된 수분 흡수제를 추가 포함하는, 제제.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 수분 흡수제는 실리카겔을 포함하는 것인, 제제.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 실리카겔은 약 700 미크론 내지 4000 미크론의 체 규격을 가지는 입자를 포함하는 것인, 제제.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 실리카겔은 약 840 미크론의 체 규격을 가지는 입자를 포함하는 것인, 제제.

청구항 20

제 16 항에 있어서, 약 0.5 중량% 내지 5 중량%의 수분 흡수제를 포함하는, 제제.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 약 1 중량%의 수분 흡수제를 포함하는, 제제.

청구항 22

제 1 항에 있어서, 미립자 칼슘 실리케이트 및 식물 치료제와 혼합된, 제제를 식물 및/또는 벡터링(vectoring) 곤충에 벡터링하기 위한 유인제(attracting agent)를 추가 포함하는 것인, 제제.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 유인제는 유효 양의 정전하(net positive electrostatic charge)를 가지는 것인, 제제.

청구항 24

제 22 항에 있어서, 유인제는 미네랄 혼합물을 포함하는 것인, 제제.

청구항 25

제 22 항에 있어서, 약 5 중량% 내지 약 20 중량%의 유인제를 포함하는, 제제.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 약 10 중량%의 유인제를 포함하는, 제제.

청구항 27

제 22 항에 있어서, 유인제는 약 35 미크론 내지 약 75 미크론의 체 규격을 가지는 것인, 제제.

청구항 28

제 22 항에 있어서, 유인제는 약 45 미크론의 체 규격을 가지는 것인, 제제.

청구항 29

제 1 항에 있어서, 미립자 칼슘 실리케이트 및 식물 치료제와 혼합된 회석제를 추가 포함하는, 제제.

청구항 30

제 29 항에 있어서, 회석제는 곡물 가루를 포함하는 것인, 제제.

청구항 31

제 30 항에 있어서, 회석제는 호밀 가루, 밀가루, 스펀트 가루, 쌀가루, 및 옥수수 가루 중 적어도 하나를 포함하는 것인, 제제.

청구항 32

제 31 항에 있어서, 회석제는 옥수수 가루를 포함하는 것인, 제제.

청구항 33

제 29 항에 있어서, 약 50 중량% 내지 75 중량%의 회석제를 포함하는, 제제.

청구항 34

제 33 항에 있어서, 약 64 중량%의 회석제를 포함하는, 제제.

청구항 35

제 29 항에 있어서, 회석제는 약 75 미크론 내지 약 250 미크론의 체 규격을 가지는 것인, 제제.

청구항 36

제 35 항에 있어서, 회석제는 약 125 미크론의 체 규격을 가지는 것인, 제제.

청구항 37

제 1 항에 있어서, 고결방지제를 추가 포함하는, 제제.

청구항 38

제 37 항에 있어서, 고결방지제는 산화마그네슘을 포함하는 것인, 제제.

청구항 39

제 38 항에 있어서, 약 0.75 중량% 내지 5.0 중량%의 산화마그네슘을 포함하는, 제제.

청구항 40

제 39 항에 있어서, 약 1 중량% 내지 약 1.5 중량%의 산화마그네슘을 포함하는, 제제.

청구항 41

제 37 항에 있어서, 고결방지제는 약 75 미크론 내지 약 150 미크론의 체 규격을 가지는 것인, 제제.

청구항 42

제 41 항에 있어서, 고결방지제는 약 125 미크론의 체 규격을 가지는 것인, 제제.

청구항 43

식물에서 균핵병균(sclerotinia sclerotiorum), 잿빛곰팡이(botrytis cinerea), 및 모닐리니아 백시니-코림보시(monilinia vaccinii-corymbosi) 중 적어도 하나의 치료를 위한 제 1 항 내지 제 42 항 중 어느 한 항에 따른 제제의 용도.

청구항 44

캐놀라 식물 및 해바라기 식물 중 적어도 하나의 질병을 치료하기 위한 제 1 항 내지 제 42 항 중 어느 한 항에 따른 제제의 용도.

청구항 45

작물에서 발아율을 증가시키기 위한 제 1 항 내지 제 42 항 중 어느 한 항에 따른 제제의 용도.

청구항 46

비벡터링제(bee vectoring agent)로서의 제 1 항 내지 제 42 항 중 어느 한 항에 따른 제제의 용도.

청구항 47

제 16 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 수분 흡수제는 곤충에 의해 이송될 수 없도록 크게 선택되는 입자 크기를 가지는 것인, 제제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 식물 치료 제제에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 비벡터링(bee vectoring)와 같은 곤충 벡터링에 의해 식물에 전파될 수 있는 식물 치료 제제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 미국등록특허 5,348,511 (Gross 외)는 기존의 상업용 벌집의 하부 구조로 통합되어 있는 축소되어 수정된 수퍼로 삽입되는 장치를 이용하여 이탈리아 땅벌(Apis mellifera L.)에 의해 전파되는 해충 방제용 생물방제제에 관하여 개시하고 있다. 상기 장치는 벌들이 벌집에서 나올 때 벌들이 생물방제제를 표면에 묻혀서 벌집에서 나오게 하는 분리된 입구 및 출구 경로를 제공한다.

[0003] 미국등록특허 5,189,100 (Kovach)는 벌집을 파괴하지 않으며 설치, 교환 및 제거가 쉽고, 그리고 하우징에 삽입될 수 있는 카트리지를 포함하는 벌 전파 장치 또는 디스펜서(dispenser)에 관하여 개시하고 있다. 상기 장치는 경작자와 같은 비전문 양봉업자들이 쉽게 이용할 수 있도록 고안되어 있다. 이는 일반 벌집의 입구에 벌집 또는 군집을 최소한으로 파괴하면서 끼울 수 있다. 벌들이 벌집에서 나올 때, 벌들은 건조 생물학적 방제 서스펜션을 통해 진입로를 거쳐 벌집을 떠나고, 농작물에 수분시킴으로써 꽃에 생물 방제제를 운반 및 증착 시킨다. 생물방제제가 낮은 농도가 되면, 힌지(hinge)된 리드를 들어올리거나 또는 오래된 카트리지를 충전된 것으로 교체함으로써 추가 물질을 쉽게 추가할 수 있다. 또한 리드는 생물 방제제를 건조된 상태로 유지하도록 충분한 제습효과를 제공하고, 따라서 벌 집종을 가능하게 한다. 수분 활동이 끝나면 디스펜서는 벌집 입구에서 빼냄으로써 간단히 제거된다. 제거는 벌집을 파괴시키지 않는다. 밤에 장치를 설치 또는 제거할 때 사용자는 최소한의 보호장비만을 필요로 한다.

[0004] PCT 공개 출원 WO 2010/136599 (Put 외)는 벌, 특히 땅벌(bumblebee)을 이용하여 생물 방제제 또는 다른 물질을 전파시키는 것에 관하여 개시하고 있다. 전파 장치는 벌집 안에 설치되거나 또는 벌집과 접촉하고 있고, 벌들이 벌집을 나올 때, 벌에 의해 운반, 이동 및 전파되는 생물 방제제 또는 다른 물질을 포함하고 있다.

발명의 내용

[0005] 이하에서, 출원인의 발명을 다양한 측면에서 제공하는 것을 목적으로 하되 발명을 한정하는 것은 아니다.

[0006] 본 발명의 일 측면에 따르면, 식물 치료 제제는 미립자 칼슘 실리케이트(규산칼슘) 및 상기 미립자 칼슘 실리케이트와 결합한 식물 치료제를 포함한다.

[0007] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 곤충 벡터링에 의한 식물 적용용 생물방제 분말 제제에 있어서, 식물

치료제; 상기 식물 치료제를 안정화하기 위하여 식물 치료제와 결합한 안정화제; 제제로부터 습기를 흡수하는 수분 흡수제; 제제가 식물을 유인하도록 하는 유인제(attracting agent); 및 희석제를 포함한다.

[0008] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 식물 치료용 분말 제제는 크로노스타치스 로세아(*clonostachys rosea*) 포자를 포함하는 식물 치료제를 포함한다. 상기 제제는 제제 그램당 약 2×10^8 내지 약 4×10^8 의 포자를 포함한다.

[0009] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 액체에 식물 치료제의 현탁액을 제공하는 단계; 미립자 칼슘 실리케이트를 제공하는 단계; 및 현탁액과 칼슘 실리케이트를 결합하는 단계를 포함한 식물 치료용 제제의 제조방법을 제공한다.

[0010] 다른 일 측면에 따르면, 크로노스타치스 로세아 포자를 미립자 안정화제와 결합시켜, 안정화된 식물 치료 미립자를 제조하는 단계; 안정화된 식물 치료 미립자를 적어도 하나의 첨가제를 결합시켜, 안정화된 식물 치료 미립자와 첨가제의 혼합물 제조하는 단계; 및 제제에서 포자의 농도가 제제 그램당 약 2×10^8 내지 약 4×10^8 이 되도록, 혼합물에 자유 안정화제를 첨가하는 단계를 포함하는 식물 치료 제제의 제조방법을 제공한다.

[0011] 다른 일 측면에 따르면, 곤충 벡터링에 의한 식물 치료 제제는 식물 치료제, 및 제제로부터 습기를 흡수하는 미립자 수분 흡수제를 포함한다. 수분 흡수제는 곤충에 의해 벡터링되도록 큰 크기의 미립자를 가진다. 몇 실시예에서, 제습 미립자의 크기는 안정화된 식물 치료 미립자의 크기보다 더 클 수 있다. 몇 실시예에서, 제습 미립자는 안정화된 식물 치료 미립자의 크기보다 약 15 내지 약 90 배 더 클 수 있다.

[0012] 다른 일 측면에 따르면, 크로노스타치스 로세아는 카놀라(*canola*)에서 보트리테스 시네리아(*botrytis cinerea*, 잿빛 곰팡이 병 또는 귀부)을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0013] 다른 일 측면에 따르면, 크로노스타치스 로세아는 카놀라에서 스크레로티니아 스크레로티오룸 (*sclerotinia sclerotiorum*; 별빛균핵버섯)을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0014] 몇 실시예에서, 식물 치료제는 안정화된 식물 치료 미립자를 형성하기 위하여 적어도 몇 칼슘 실리케이트와 결합될 수 있다. 제제는 약 5중량% 내지 15중량%, 더 특별하게는 약 7중량% 내지 8중량%의 안정화된 식물 치료 미립자를 포함할 수 있다.

[0015] 몇 실시예에서, 적어도 몇 칼슘 실리케이트는 자유 칼슘 실리케이트(*free calcium silicate*)일 수 있다. 제제는 약 10중량% 내지 25중량% 자유 칼슘 실리케이트, 더 특별하게는 약 17중량% 내지 18중량% 자유 칼슘 실리케이트를 포함할 수 있다.

[0016] 몇 실시예에서, 식물 치료제는 미생물제(*microbial agent*)를 포함할 수 있다. 예를 들면, 식물 치료제는 크로노스타치스 로세아와 같은 진균 포자를 포함할 수 있다. 더 구체적인 예로서, 식물 치료제는 백강균(*Beauveria bassiana*)을 포함할 수 있다.

[0017] 몇 실시예에서, 식물 치료제는 진균 포자를 포함할 수 있고, 그리고 진균 포자는 적어도 몇 칼슘 실리케이트와 결합할 수 있다. 식물 치료제는 결합된 칼슘 실리케이트 그램당 약 1×10^9 내지 4×10^9 의 포자 밀도, 더 특별하게는 결합된 칼슘 실리케이트 그램당 약 2×10^9 의 포자 밀도를 가질 수 있다.

[0018] 몇 실시예에서, 제제는 제제 그램당 약 2×10^8 내지 약 4×10^8 의 포자를 포함할 수 있다.

[0019] 몇 실시예에서, 미립자 칼슘 실리케이트는 약 45미크론 내지 75미크론, 더 특별하게는 약 45미크론의 체 규격 (*sieve designation*)을 갖는 미립자를 포함할 수 있다.

[0020] 몇 실시예에서, 수분 흡수제는 미립자 칼슘 실리케이트 및 식물 치료제와 혼합될 수 있다. 수분 흡수제는 실리카겔을 포함할 수 있다. 실리카겔은 약 700미크론 내지 4000미크론, 더 특별하게는 약 840미크론의 체 규격을 갖는 미립자를 포함할 수 있다. 제제는 약 0.5중량% 내지 5중량%의 수분 흡수제를 포함할 수 있고, 더 특별하게는 약 1중량%의 수분 흡수제를 포함할 수 있다.

[0021] 몇 실시예에서, 제제가 식물 및/또는 벡터링할 곤충을 유인하기 위하여, 제제는 미립자 칼슘 실리케이트 및 식물 치료제와 혼합된 유인제를 더 포함할 수 있다. 유인제는 유효 양의 정전기를 가질 수 있다. 유인제는 미네랄 혼합물을 포함할 수 있다. 제제는 약 5중량% 내지 약 20중량%의 유인제를 포함할 수 있고, 더 특별하게는 약 10중량%의 유인제를 포함할 수 있다. 유인제는 약 35미크론 내지 75미크론, 더 특별하게는 약 45미크론의 체 규격 (*sieve designation*)을 가질 수 있다.

- [0022] 몇 실시예에서, 제제는 미립자 칼슘 실리케이트 및 식물 치료제와 혼합된 회석제를 더 포함할 수 있다. 회석제는 적어도 하나의 호밀 분말, 밀 분말, 스펠트(spelt) 분말, 쌀 분말 및 옥수수 분말과 같은 분말을 포함할 수 있다. 일 구체적인 실시예에 있어서, 회석제는 옥수수 분말을 포함할 수 있다. 제제는 약 50중량% 내지 75중량%, 더 특별하게는 약 64중량%의 회석제를 포함할 수 있다. 회석제는 약 75미크론 내지 약 250미크론, 더 특별하게는 약 125미크론의 체 규격(sieve designation)을 가질 수 있다.
- [0023] 몇 실시예에서, 제제는 고결 방지제(anti-caking agent)를 더 포함할 수 있다. 고결 방지제는 마그네슘 옥사이드(산화 마그네슘)를 포함할 수 있다. 제제는 약 0.75중량% 내지 5.0중량%의 마그네슘 옥사이드, 더 특별하게는 약 1중량%의 마그네슘 옥사이드를 포함할 수 있다. 고결 방지제는 약 75미크론 내지 약 150미크론, 더 특별하게는 약 125미크론의 체 규격(sieve designation)을 가질 수 있다.
- [0024] 몇 실시예에서, 제제는 식물에서 스크레로티니아 스크레로티오룸(sclerotinia sclerotiorum), 보트리티스 시네리아(botrytis cinerea), 및 모닐리니아 바시니-코림보시(monilinia vaccinii-corymbosi) 중에서 적어도 하나를 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0025] 몇 실시예에서, 제제는 카놀라 식물 및 해바라기 식물 중 적어도 하나에서 병을 치료하기 위하여 사용될 수 있다.
- [0026] 몇 실시예에서, 제제는 작물에서 발아율을 증가시키는데 사용될 수 있다.
- [0027] 몇 실시예에서, 제제는 비벡터링제(bee vectoring agent)로서 사용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 각종 장치, 공정, 및/또는 제제는 각각 청구된 본 발명의 구현예의 실시예를 제공하기 위해 후술될 것이다. 후술되는 구현예는 임의의 청구된 본 발명을 제한하지 않고 임의의 청구된 본 발명은 후술되는 것과 다른 장치, 공정, 및/또는 제제를 포함할 수 있다. 청구된 본 발명은 후술되는 어느 하나의 장치, 공정, 및/또는 제제의 특성 모두를 갖는 장치, 공정, 및/또는 제제로 제한되지 않거나, 후술되는 장치, 공정, 및/또는 제제의 다수 또는 모두에 공통적인 특성으로 제한되지 않는다. 후술되는 장치, 공정, 및/또는 제제는 본 특허 출원의 발행에 의해 부여된 어느 독점권의 구현예가 아닐 가능성이 있다. 독점권이 본 특허 출원의 발행에 의해 부여되지 않기 때문에 후술되는 장치, 공정, 및/또는 제제로 개시되는 임의의 본 발명은 또 다른 보호 인스트루먼트의 주요 문제일 수 있고, 예를 들면 연속 특허 출원, 및 출원인, 발명자 또는 소유자가 본 문헌의 개시물에 의해 임의의 공개된 이러한 본 발명에 대한 포기, 부인 또는 헌납하려고 하지 않는다.
- [0029] 예시 식물 치료 제제는 식물 치료제(즉, 작물에 유용한 제제), 및 하나 이상의 첨가제를 포함한다. 예를 들면, 식물 치료제는 식물의 성장, 기력, 및 생산성을 촉진시키고; 작물의 발아 속도 및/또는 종자 품질을 개선시키며; 열악한 기후 또는 토양 조건과 같은 질병, 해충, 및/또는 환경 스트레스에 대한 내성을 개선시키고; 질병 또는 해충에 대하여 제어하거나 행해지며; 또는 상처 및/또는 감염으로부터 식물의 회복을 촉진시킬 수 있다.
- [0030] 소정예에 있어서, 식물 치료제는 하나 이상의 박테리아, 바이러스, 또는 진균 또는 진균 포자와 같은 미생물을 포함할 수 있다. 적합한 진균 포자의 일례로는 크로노스타시스 로세아를 포함하고, 이것은 카놀라, 해바라기, 라즈베리, 블루베리, 딸기, 사과, 배, 키위, 수박, 커피, 망고, 아보카도, 체리, 자두, 아몬드, 복숭아, 캐슈, 구아바, 알팔파, 메밀, 클로버, 콩, 완두콩, 양파, 대두, 목화, 겨자, 블랙베리, 구스베리, 피망, 가지, 및 건포도를 포함하는 각종 작물의 스크레로티니아 스크레로티오룸, 모닐리니아 백시니-코림보시(monilinia vaccinii-corymbosi), 및/또는 보트리티스 시네레아와 같은 병원균을 제어할 수 있다. 적합한 진균 포자의 또 다른 예로는 백강균을 포함하고, 이것은 크랜베리 작물의 크랜베리 구더기를 제어할 수 있다. 적합한 박테리아의 일례로는 바실러스 튜링겐시스이고, 이것은 각종 작물의 해충을 제어할 수 있다.
- [0031] 제제 중 식물 치료제의 농도는, 예를 들면 식물 치료제의 특성, 및/또는 제제가 사용될 수 있는 조건(예를 들면, 기후, 목적 식물 등)에 따라 달라질 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 식물 치료제는 크로노스타시스 로세아의 포자를 포함하고, 제제는 제제의 g 당 약 2×10^8 내지 4×10^8 포자를 포함할 수 있다.
- [0032] 제제는 식물 치료제와 함께 조합되는 각종 첨가제를 포함할 수 있다. 소정예에 있어서, 이하 더 상세하게 설명하는 바와 같이, 첨가제는 하나 이상의 안정화제, 수분 흡수제, 유인제, 회석제, 및/또는 고결 방지제를 포함한다.

- [0033] 안정화제는 일반적으로 식물 치료제를 식물 대상에 전달하기 전에 식물 치료제의 부패, 파괴, 또는 활성을 방지하거나 최소화하는 역할을 할 수 있다. 예를 들면, 상기 식물 치료제가 진균 포자인 경우에 있어서, 안정화제는 상대적으로 건조한 진균 포자를 유지하기 위해서 물을 흡수함으로써 휴면 상태의 포자를 안정화시키고 포자를 식물에 전달하기 전에 포자의 발아를 방지하거나 최소화할 수 있다.
- [0034] 안정화제의 일례로는 미립자상 칼슘 실리케이트(상품명 Micro-cel® 하에 시판)이다. 칼슘 실리케이트의 미립자는 약 45 미크론(약 325 메쉬) 내지 약 75 미크론(약 200 메쉬)의 체 규격을 가질 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 칼슘 실리케이트의 미립자는 약 45 미크론(325 메쉬)의 체 규격을 갖는다.
- [0035] 소정예에 있어서, 식물 치료제는 안정화된 식물 치료 미립자를 생성하기 위해서 안정화제의 적어도 일부에 결합될 수 있다. 예를 들면, 진균 포자를 일반적으로 미립자 칼슘 실리케이트에 부착시키기 위해서, 물 중 진균 포자의 현탁액을 미립자 칼슘 실리케이트 상에 분무시킬 수 있다. 진균 포자의 현탁액은 그 전체를 참조하여 여기 포함된 미국 특허 출원 번호 US2012/0021906(Sutton 등)에 기재된 대로 제조될 수 있다. 안정화된 식물 치료 미립자는 포자에 결합되는 칼슘 실리케이트의 g 당 약 1×10^9 내지 약 4×10^9 포자의 포자 농도를 가질 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 안정화된 식물 치료 미립자는 포자에 결합되는 칼슘 실리케이트의 g 당 약 2×10^9 포자의 포자 농도를 갖는다.
- [0036] 소정예에 있어서, 제제는 약 5중량% 내지 약 15중량%의 안정화된 식물 치료 미립자, 보다 구체적으로는 약 7중량% 내지 약 8중량%의 안정화된 식물 치료 미립자를 포함할 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 제제는 7.5중량%의 안정화된 식물 치료 미립자를 포함할 수 있다.
- [0037] 소정예에 있어서, 안정화제의 적어도 일부는 식물 치료제에 결합하는 것 없이 제제에 혼합될 수 있다. 이러한 안정화제를 자유 안정화제라 칭할 수 있다. 제제 중 자유 안정화제의 양은 필요에 따라 식물 치료제의 특정 농도를 갖는 제제를 생성하기 위해 선택될 수 있다. 예를 들면, 제제의 성분은 함께 혼합된 다음, 자유 안정화제는 제제 중 포자 농도가 제제의 g 당 약 2×10^8 내지 4×10^8 포자 농도에 도달할 때까지 제제에 첨가될 수 있다. 이러한 예에 있어서, 제제는 약 10중량% 내지 약 25중량%의 자유 안정화제, 보다 구체적으로는 약 17중량% 내지 약 18중량%의 자유 안정화제를 포함할 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 제제는 약 17.5중량%의 자유 안정화제를 포함할 수 있다.
- [0038] 수분 흡수제는 상대적으로 건조한 제제를 유지하고 제제의 고화 및 응집을 방지하기 위해서, 제제로부터 수분을 흡수할 수 있다. 수분 흡수제의 예로는 실리카겔의 미립자 또는 비드와 같은 건조제, 및 폴리아크릴산나트륨과 같은 고흡수성 폴리머를 포함한다. 수분 흡수제의 추가 예로는 대팻밥, 및 클레이 볼을 포함한다. 소정예에 있어서, 제제는 약 0.5중량% 내지 5중량%의 수분 흡수제를 포함할 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 제제는 약 1중량%의 수분 흡수제를 포함할 수 있다.
- [0039] 곤충 벡터링에 의해 제제가 전달되는 예에 있어서, 제제로부터 수분을 계속 흡수하기 위해서, 수분 흡수제의 미립자 사이즈가 너무 커서 곤충에 의해 전달되지 않도록 선택될 수 있으므로 일반적으로 살포기에 남아있을 것이다. 예를 들면, 미립자는 약 700 미크론(25 메쉬) 및 약 4000 미크론(5 메쉬)의 체 규격을 가질 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 실리카겔은 약 840 미크론(20 메쉬)의 체 규격을 갖는 미립자의 형태일 수 있다.
- [0040] 유인제는 제제에 식물 및/또는 벡터링 곤충을 유인하는데 도움이 될 수 있다. 예를 들면, 유효 음의 정전하를 갖는 식물 및/또는 벡터링 곤충을 정전기적으로 유인하기 위해서, 유인제는 유효 양의 정전하를 가질 수 있다. 소정예에 있어서, 유인제는 미네랄, 또는 미네랄의 혼합물을 포함할 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 유인제는 상품명 DYNA-MIN™ 하에 Agri-Dynamics(Martins Creek, PA)에 의해 시판되는 미네랄 혼합물을 포함할 수 있고, 이것은 하기 미네랄: 이산화 규소, 산화 알루미늄, 칼슘, 철, 마그네슘, 칼륨, 나트륨, 인, 티타늄, 망간, 스트론튬, 지르코늄, 리튬, 루비등, 붕소, 아연, 바나등, 크롬, 구리, 이트륨, 니켈, 코발트, 갈륨, 세슘, 스칸등, 주석, 몰리브덴, 및 추가 미량 원소를 포함할 수 있다. 또 다른 예에 있어서, 유인제는 칼슘 석회석을 포함할 수 있다.
- [0041] 소정예에 있어서, 제제는 약 5중량% 내지 약 20중량%의 유인제를 포함할 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 제제는 약 10중량%의 유인제를 포함할 수 있다. 소정예에 있어서, 유인제는 약 35 미크론(약 350 메쉬) 내지 약 75 미크론(약 200 메쉬)의 체 규격을 가질 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 유인제는 약 45 미크론(약 325 메쉬)의 체 규격을 가질 수 있다.
- [0042] 회석제는 적합한 전분 또는 곡물 가루일 수 있다. 제제가 곤충 벡터링에 의해 전달되는 예에 있어서, 회석제는

곤충을 자극하거나 손상시키지 않도록 선택되어서 곤충이 먹지 않을 것이다. 또한, 회석제는 상당한 양의 수분을 흡수하지 않도록 선택되어서 회석제가 응집하지 않는다. 곤충 벡터링에 적합할 수 있는 회석제의 예로는 옥수수 가루, 및 호밀, 밀, 쌀가루, 및 스펀트 가루와 같은 곡물 가루를 포함한다. 대체예에 있어서, 회석제는 카올린일 수 있다. 다른 예에 있어서, 회석제는 분유 또는 탈크를 포함할 수 있다. 이것들은 제제가 곤충 벡터링 이외의 분무와 같은 방식으로 전달되는 예에서 특히 유용할 수 있다.

[0043] 소정예에 있어서, 제제는 약 50중량% 내지 약 75중량%의 회석제를 포함할 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 제제는 약 64중량%의 회석제를 포함할 수 있다. 소정예에 있어서, 회석제는 약 75 미크론(약 200 메쉬) 내지 약 250 미크론(약 60 메쉬)의 체 규격을 가질 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 회석제는 약 125 미크론(약 125 메쉬)의 체 규격을 가질 수 있다.

[0044] 제제는 임의의 적합한 고결 방지제를 포함할 수 있다. 고결 방지제의 하나의 구체예로는 산화 마그네슘이다. 제제는 약 0.75중량% 내지 약 5.0중량%의 고결 방지제, 보다 구체적으로는 약 1중량% 내지 약 1.5중량%의 고결 방지제를 포함할 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 제제는 1.25중량%의 고결 방지제를 포함할 수 있다. 소정예에 있어서, 고결 방지제는 약 75 미크론(약 200 메쉬) 내지 약 150 미크론(약 100 메쉬)의 체 규격을 가질 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 고결 방지제는 약 125 미크론(약 125 메쉬)의 체 규격을 갖는다.

[0045] 식물 치료 제제는 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 일례에 있어서, 안정화된 식물 치료 미립자는 진균 포자와 같은 식물 치료제를 안정화제에 결합함으로써 상술한 바와 같이 조제된다. 안정화된 식물 치료 미립자를 하나 이상의 수분 흡수제, 유인제, 회석제, 및 고결 방지제와 같은 첨가제와 조합할 수 있다. 예를 들면, 첨가제는 안정화된 식물 치료 미립자와 혼합될 수 있다. 필요에 따라, 추가적인 자유 안정화제는 소망한 값으로 포자의 농도를 조정하기 위해서 혼합물에 첨가될 수 있다. 예를 들면, 자유 안정화제는 제제의 g 당 약 2×10^8 내지 약 4×10^8 포자로 포자의 농도를 조정하기 위해 첨가될 수 있다.

[0046] 소정예에 있어서, 제제가 살포기에 넣어지거나 곤충 벡터링을 위해 곤충에 이용 가능해진 후에 제제의 유통 기한은 4~5일일 수 있다. 대체예에 있어서, 유통 기한은 길게, 예를 들면 10일까지일 수 있다. 제제의 유통 기한은, 예를 들면 주위 습도, 및 온도를 포함하는 각종 요인에 따라 달라질 수 있다.

[0047] 상술한 제제는 곤충 벡터링에 특히 유용할 수 있다. 그러나, 제제는 분무와 같은 다른 방식으로 파종될 수 있다.

[0048] 상기 명세서에는 하나 이상의 공정, 제제, 또는 장치의 예를 제공하지만, 다른 공정, 제제, 또는 장치는 동반하는 청구항의 범위 내인 것이라고 이해될 것이다.

[0049] 실시예

[0050] 실시예 1: 식물 치료 제제의 제조

[0051] 하기 조성의 식물 치료 제제가 제조된다:

[0052] 마이크로셀의 g 당 2×10^9 포자의 농도에서 Microcel®(325 메쉬, 44 미크론)에 결합되는 7.5중량%의 크로노스타치스 로세아의 안정화된 식물 치료 미립자;

[0053] 17.5중량%의 Free Microcel®(325 메쉬, 44 미크론);

[0054] 1.25중량%의 산화 마그네슘(125 메쉬, 125 미크론);

[0055] 10중량%의 Dyna-min™(325 메쉬, 44 미크론);

[0056] 64중량%의 옥수수 가루(125 메쉬, 125 미크론);

[0057] 1중량%의 실리카겔(약 20 메쉬, 700~1000 미크론);

[0058] 제제는 크로노스타치스 로세아의 현탁액을 Microcel® 미립자 상에 분무함으로써 제조된다. 얻어진 미립자는 산화 마그네슘, dyna-min™, 옥수수 가루, 및 실리카겔과 혼합된다. free Microcel®이 첨가되어서 제제의 g 당 약 3×10^8 포자로 포자의 농도가 조정된다.

[0059] 실시예 2: 디스펜서를 통해 벌집을 빠져나갈 때 땅벌(Bumble Bee)에 의한 식물 치료제의 획득

[0060] 각각의 땅벌(뒤영벌, *Bombus impatiens*)의 콜로니를 갖는 땅벌의 벌집은 디스펜서를 구비하고 있는데 이것은 벌

이 벌집을 빠져나갈 때 이동하도록 보내진다.

[0061] 벌집은 연구 온실의 벤치 상에 위치된다. 벌은 커다란 메쉬 케이지 안에 갇혀있다. 새로운 콜로니는 홀로 남겨져서 적응하고 24시간 동안 그들의 새로운 환경에 익숙해진다. 24시간의 기간 후, 디스펜서는 벌이 벌집을 빠져나갈 때 제제의 베드를 통해서 도보하도록 보내지기 위해서, 실시예 1에 기재된 제제로 채워진다.

[0062] 개별 땅벌은 벌집을 빠져나갈 때 포획된다. 각각의 벌은 1.5 ml 마이크로원심분리("마이크로원심") 튜브 안에 넣고 부착된 뚜껑으로 폐쇄했다. 포획된 벌을 가진 튜브는 수시간(2-12시간) 동안 냉장고에 저장된 다음, 각각의 벌에 부착된 포자의 수를 계산하기 위해 진행된다.

[0063] 각각의 벌은 계면활성제(0.01% Triton X-100 v/v)를 포함하는 공지된 용량의 물로 세정(마이크로원심 튜브의 내벽에서부터 세정을 포함)하고, Vortex(Fisher Genie 2)로 5시간(약 5초마다) 격렬하게 교반했다. 물 및 벌은 "세정수"가 연속적으로 회석되기 전에 10분 동안 정치해 둔다.

[0064] 0.5 ml의 "세정수"의 분액을 연속적으로 회석(10배 회석)하고 0.1 ml의 각 회석액을 페트리 디쉬에 PDTSA(콜로니 성장 속도를 감소(및 콜로니를 카운팅하기 위해 분리시키기 위해서 Triton X-100(0.01% 또는 대략 8 drops/L)으로 개선된 감자 한천 배지 및 박테리아를 아래로 유지하기 위해서 100 ppm에서 황산 스트렙토마이신) 상에 분무했다. 각각의 벌에 대해서, 3번의 연속적인 회석을 행하고 3개의 0.1 ml 분액의 각 회석액을 PDTSA 상에서 플레이트했다. 페트리 디쉬를 약 22-24C(70-74F 또는 실온)에서 4-5일 동안 배양하고 이것에 의해서 크로노스타치스 로세아의 시간 콜로니를 성장시켜 콜로니를 계산했다. 콜로니 수는 관련된 회석량 곱하기 10(0.1 ml만이 플레이트되기 때문에)으로 곱셈하고, 벌을 세정하는데 사용되는 물의 총 용량에 대해 조정되었다. 이것은 벌 당 크로노스타치스 로세아의 실행 가능한(콜로니 형성) 단위의 계산된 수를 제공했다. 표 1에 나타낸 바와 같이, 이들 테스트의 벌은 일반적으로 벌집을 빠져나가는 도중에 디스펜서를 빠져나갈 때마다 크로노스타치스 로세아의 약 100,000~125,000 실행 가능한 포자로 실행된다.

표 1

테스트 #	콜로니 형성 단위/벌의 수 (벌 당 평균 3 번의 연속 회석)			
	벌 #1	벌 #2	벌 #3	벌 #4
1	1.14 X 10 ⁵	1.02 X 10 ⁵	1.21 X 10 ⁵	0.99 X 10 ⁵
2	1.25 X 10 ⁵	1.18 X 10 ⁵	1.11 X 10 ⁵	-
3	0.97 X 10 ⁵	1.09 X 10 ⁵	1.09 x 10 ⁵	1.23 X 10 ⁵

[0065]

[0066] 벌의 현미경을 이용한 검사는 분말의 미립자가 특별히 벌의 다리 및 하측(이들 모두는 털이 많음)에 존재하는 것으로 확인된다.

[0067] 실시예 3: 땅벌-백터링된 크로노스타치스 로세아 및 바실러스 튜링겐시스로 치료된 해바라기의 평가

[0068] 필드 1:

[0069] 제1 테스트 사이트는 200 m 폭, 그리고 필드의 동쪽측을 따라 시골길에서부터 계속되는 20 에이커 해바라기 필드(필드 1)가 포함된다. 4개의 땅벌 거처(퀴드)의 5개 그룹은 2011년 7월에 필드에 설치되었다. 거처는 해바라기를 갖는 영역의 가장자리에서 도로 옆 일정한 간격으로 위치하므로, 용이하게 접근 가능했다. 각각의 거처는 거처의 출구 경로에 분말 식물 치료 제제를 포함하는 트레이를 수용하도록 구비되어 있다. 식물 치료 제제를 포함하는 트레이를 거처 안에 삽입하였다. 제제는 실시예 1에 기재된 대로 제조되었지만, 바실러스 튜링겐시스(제제의 g 당 2 × 10⁸ 포자)가 추가 포함되었다. 트레이는 2011년 7월에 거처 안에 삽입되었고, 2011년 8월까지 약

3일마다 대체되었다.

- [0070] 필드에서 초기에 심어진 해바라기의 개화기는 7월 하반기의 더운 날씨(35-38℃의 매일 높음)에 의해 단축된 것으로 관찰되었다.
- [0071] 트레이는 2011년 8월 10일에 검사되었다. 분말 식물 치료 제제는 건조한 상태로 관찰되었고 응집되지 않았다.
- [0072] 해바라기의 샘플을 2011년 8월 10일에 취했다. 꽃의 약 75-80%가 커다란 주변 꽃잎을 잃은 것으로 관찰되었다. 일부 비(표면 토양을 축축하게 함)가 이전 1-3일 동안 발생하였다.
- [0073] 샘플링: 해바라기 헤드를 퀴드 #2(즉, 도로로부터 2번째) 및 퀴드 #4(즉, 도로로부터 4번째)와 관련해서 표본화했다. 헤드를 도로의 직각으로 필드를 가로질러 만든 트랜섹트에서 퀴드로부터 5개의 거리(3 m, 40 m, 80 m, 120 m, 및 160 m)에서 수집되었다. 4개의 헤드를 각각의 샘플링 거리에서 취해서, 플라스틱 패치 가방에 넣고 실험실에 운송했다.
- [0074] 샘플의 치료: 수집된 해바라기 헤드로부터 꽃 부분에서 크로노스타치스 로세아의 발생 정도는 파라콰트 클로람 페니콜 한천(PCA)상에 꽃 부분을 놓은 다음, 하기 절차에 따라 진균의 포자 형성을 위해 검사함으로써 계산했다.
- [0075] 약 160-200의 꽃 부분 전부를 약 12-15 입의 영역의 해바라기 헤드 각각으로부터 반복적으로 살균된 검자를 사용하여 추출했다. 각각의 영역은 성장된 종자를 갖고 약 1.0-1.5 cm 건너의 존(즉, 헤드의 중심이 아님)에 존재한다. 각 헤드로부터 꽃 부분의 약 절반을 2개의 페트리 디쉬 각각의 PCA 상에 뿌렸다(별도로 실체처럼). 꽃 부분을 갖는 페트리 디쉬를 반투명 플라스틱 박스에 넣고 직사 광선으로부터 떨어뜨려 배양했다. 꽃 부분은 어느 정도 숨털이어서 한천 배지와 양호하게 접촉되지 않지만, 그럼에도 불구하고 노화되었고 균일하게("일정") 옅은 갈색으로 변했다.
- [0076] 꽃 부분이 제거된 해바라기 헤드를 냉방에 놓았다.
- [0077] 플레이트된 꽃 부분은 배양의 5일 및 7일 후에 크로노스타치스 로세아의 포자 형성에 대해서 시각적으로 확인했고 8일 후 그리고 또다시 8일 후에 현미경으로 평가했다. 각 시간의 평가에서, 각 디쉬의 꽃 부분은 하기 동일한 증가 스케일을 사용하여 크로노스타치스 로세아의 포자 형성 발생 정도에 대해 총체적으로 평가했다: 0=포자 형성 없음; 1=1-10%의 포자 형성을 갖는 꽃 부분; 2=11-20%; 3=21-30% 10=91-100%. 이하 표 2 및 3에 있어서, 이들 값을 4개의 해바라기 헤드 각각에 대해서 페트리 디쉬 A 및 B 란에 나타내었다. 스케일에 대한 범위의 중심점(즉, 0%, 5%, 15%, 25% ... 95%)을 사용해서 계산된 %값을 제공했다. 평균 %값 당 헤드는 A 및 B란의 비율에 대한 중심점 값으로부터 유래했다. 거처로부터 주어진 거리에서 수집된 4개의 헤드에 대한 평균 %값은 포자 형성된 크로노스타치스 로세아(각 표의 오른쪽 란에 굵은 값)에 대한 꽃 부분의 전반적으로 계산된 평균%를 제공했다.
- [0078] 결과 및 고찰-플레이팅 후 8일: 이하 표 2 및 3은 플레이팅 후 8일에 평가한 결과를 나타냈다. 이들 표는 크로노스타치스 로세아를 갖는 꽃 부분의 평균 퍼센트에 대한 계산을 나타내고, 이것은 식물 치료제를 꽃에 벡터링했을 때의 성공의 척도이다.

표 2

헤드 수

별집으로부터 의 거리 (m)	1			2			3			4			평균 %**
	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	
3	0	1	2.5	0	0	0	1	0	2.5	1	0	2.5	1.88
40	0	0	0	2	0	7.5	1	1	5.0	0	0	0	3.13
80	1	0	2.5	0	0	0	0	1	2.5	0	2	7.5	3.13
120	1	1	5.0	1	1	5.0	3	0	12.5+	1	0	2.5	6.25
160	0	0	0	1	0	2.5	0	0	0	0	1	2.5	1.25

트랜섹트 1 (쿼드 #2)

[0079]

표 3

헤드 수

별집으로부터 의 거리(m)	1			2			3			4			평균 %
	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	
3	1	1	5.0	2	2	15	2	1	10	0	0	0	7.50
40	2	1	10	10*	2	15	1	2	10	1	2	10	11.25
80	0	2	7.5	0	0	0	0	2	7.5	1	0	2.5	4.38
120	2	1	10	1	1	5.0	1	2	10	0	0	0	6.25
160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00

트랜섹트2 (쿼드 #4). *이 플레이트는 실험실에서 C. 로세아로 확실하게 오염되어 있어서 폐기된 경우이다. 따라서, 데이터는 계산에 포함되지 않는다.

[0080]

[0081]

크로노스타치스 로세아는 여러 가지 꽃 부분의 일부(또는 모두)에 포자 형성하는 것을 발견했다.

[0082]

크로노스타치스 로세아의 포자 형성을 가지는 꽃 부분에서는 다른 진균의 성장 (즉, 균사체 및/또는 포자 형성)이 발견되지 않았다. 이것은 크로노스타치스 로세아가 없는 꽃 부분과는 반대되는 것이다. 이것은 세균 배양액 (agar)이 사용 전에 크로노스타치스 로세아의 포자로 오염되어 있을 수 있는, 페트리 접시에 있는 꽃 부분에서 명확했다. 이러한 상황에서, 크로노스타치스 로세아는 모든 꽃 부분 상에서 크게 (heavily) 포자를 형성하였지만, 다른 진균 성장은 거의 존재하지 않았다. 크로노스타치스 로세아의 포자 형성을 가지는 꽃 부분에는 다른 진균이 희박하거나 또는 없다는 결과는, 크로노스타치스 로세아가 꽃 부분에 일반적으로 (아마도 내생적으로) 처음 안착 (establish)하게 되고, 다른 진균들의 추후 안착과 성장을 방해한다는 것을 제시하는 것이다. 이것은 크로노스타치스 로세아가 헤바라기 꽃 부분의 군집화 (colonization)에 생태학적으로 매우 잘 적응되어 있다는 것을 또한 나타내었다.

- [0083] 크로노스타치스 로세아가 포자를 형성하지 않은 꽃 부분을 8일 (더 일찍)에 측정했을 때 균사체의 집단 (masses)과, 다른 진균의 포자 형성을 커버했다. 이러한 진균들은 여러 종류의 노화하는 식물 조직에서 매우 흔한 중으로서, 알타나리아 알타나타 (풍부함); 클라도스포리움종 (풍부함); 페니실룸속과 아스페르질루스속 (둘 다 흔함); 에피코쿰종 (저빈도); 푸사륨속 (저빈도); 그리고 리조푸스 (빈번하지 않음)을 포함하고 있었다. 해바라기가 해당 부분으로 보내지고 (taken in the field), 꽃 부분이 PCA 상에 플레이팅될 때, 이러한 진균들은 꽃 부분의 표면 상에 아마도 포자 (또는 다른 번식체)로 존재하고 있었을 것이다. 그것들은 내생 식물로 여겨지는 않는다. 리조푸스는 해바라기의 넥 (neck)과 헤드 썩음병 (rot)을 일으킬 수 있다 (하나의 헤드는 랩 (lab)에 플레이팅될 때 리조푸스에 의해서 야기되는 것으로 판명된 넥과 헤드를 가지는 인접 분야에서 발견되었음).
- [0084] 꽃 부분으로부터 회수한 크로노스타치스 로세아는 땅벌에 의해서 해바라기 헤드로 벡터링해온 것으로 추정하고 있다. 크로노스타치스 로세아가 회수한 해바라기 헤드의 발생률은 트란섹트 #1에서는 35%였고, 트란섹트 2에서는 55%였다. 꽃 부분 (크로노스타치스 로세아가 검출되지 않은 헤드의 꽃 부분을 포함함)의 발생률은 일반적으로 낮았다 (트란섹트 1에서는 약 2% 내지 6%, 트란섹트 2에서는 0% 내지 11%임).
- [0085] 트란섹트 1에서는 160 m 이상, 트란섹트 2에서는 120 m 이상으로 클로노스타키스를 벡터링하였다.
- [0086] 벡터링하는 트란섹트에서 일정한 변화, 예를 들어, 땅벌 군집 박스 (colony boxes)로부터의 거리 감소가 있다는 양호한 증거는 없었다. 발생률 데이터는 벡터링이 상당히 고르다는 것을 제시하고 있다.
- [0087] 결과 및 논의-플레이팅 (plating)후 18일: 아래의 표4와 표5는 플레이팅 후 18일에 측정 결과를 나타낸 것이다. 이러한 표들은 꽃에 식물 치료제를 벡터링하는 데 있어서의 측정 성과인, 크로노스타치스 로세아를 가지는 꽃 부분의 평균% 측정을 나타낸 것이다.

표 4

헤드 수

별집으로부터의 거리 (m)	1			2			3			4			평균 % ^{**}
	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	
3	2	2	15	2	4	25	0	0	0	2	1	10	12.5
40	0	0	0	3	4	30	1	3	15	1	2	10	13.8
80	1	0	2.5	0	1	2.5	5	2	30	1	2	10	11.3
120	0	0	0	2	3	20	3	2	20	5	1	25	16.3
160	0	1	2.5	2	2	15	3	4	30	1	4	20	16.9

표4- 트란섹트 1 (쿼드 2의 경우)

[0088]

표 5

별집으로부터의 거리 (m)	헤드 수												평균 %**
	1			2			3			4			
	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	
3	5	7	55	7	9	75	5	7	55	3	5	35	55.0
40	3	3	25	#	5	45	6	3	40	5	6	50	40.0
80	4	5	40	5	8	60	7	3	45	1	2	10	38.8
120	4	4	35	1	1	2.5	1	4	20	2	2	15	18.1
160	2	1	10	3	3	25	1	1	5	2	1	10	12.5

표5- 트란섹트 2 (쿼드4의 경우)

[0089]

[0090]

크로노스타치스 로세아의 포자 형성은 접종 후 8일보다 18일에 훨씬 더 풍부했다.

[0091]

비병원균 (클라도스포룸속과 알터나리아)은 성장해서 여러 개의 꽃 부분을 커버했다. 크로노스타치스 로세아는 빈번하게 비병원균의 균사체, 분명하게는 기생균 (즉, 다른 진균을 “먹는 (eating)” 균기생균)을 성장시켰다.

[0092]

갯빛 곰팡이병 (회색 곰팡이병) (이것은 습한 날씨에 헤드 씩음병의 병원균일 수 있음)을 몇 개의 꽃 부분에서 발견하였다.

[0093]

유충의 배설물 (비교적 큰 원통형 피스)이 존재했고, 여러 개의 플레이트에서 풍부했다. 이들 플레이트 상의 여러 개의 꽃 부분은 부분적으로 벌레 먹었고 (eaten), 매우 습하게 보였다. 발견된 해충의 유충은 없었다.

[0094]

8일 째와 비교했을 때 배양 후 18일에 꽃 부분 상에 증가한 크로노스타치스 로세아의 발생률은 크로노스타치스 로세아가 충분히 노쇠해서 꽃 부분을 완전한 포자 형성 발생률에 도달하도록 하는 데 PCA에 대해 8일 이상을 필요로 한다는 것을 나타내는 것이다. 배양 시 꽃 부분 중의 크로노스타치스 로세아의 일부가 어떻게 퍼지는지에 대해 설명하기 위해서 관찰하였다.

[0095]

두 종류의 트란섹트에서 크로노스타치스 로세아 포자 형성의 발생률은 배양 8일 동안의 값에 대해 몇 배로 증가했다. 이러한 데이터로부터, 크로노스타치스 로세아에 의해서 전체 범위의 포자 형성 (및 내포된 (implied) Rhc 부분 균집화)을 포획하기에는 배양 8일은 불충분한 것이다. 여러 종류의 식물 조직, 예를 들어 파라콰트 매질과 주로 접촉하게 되는 잎의 평평한 부분 (flat piece)의 경우에는 8일이면 충분하다. 그러나 "모상 (hairy)" 꽃 부분은 적어도 처음에는 접촉이 제한되어 있어서, 노쇠하는 데는 오랜 시간이 걸릴 수 있다.

[0096]

트란섹트 1에서의 14%와 비교했을 때 트란섹트 2의 해바라기의 꽃 부분 중 크로노스타치스 로세아의 포자 형성의 평균 발생률은 약 33%였다.

[0097]

트란섹트 2의 모든 해바라기 헤드에서는 크로노스타치스 로세아를 가지는 적어도 몇 개의 꽃 부분이 발견되었지만, 트란섹트 1에서는 10%의 헤드는 크로노스타치스 로세아가 결여되어 있었다.

[0098]

트란섹트 1에서는 꽃 부분 상의 크로노스타치스 로세아의 모든 발생률 (벡터링의 성과)의 변화에 대한 표시는 없었지만, 트란섹트 2에서는 80 m 뒤에 발생률의 저하가 나타났다.

[0099]

필드 2

[0100]

2차 시험 사이트는 필드 (1)이 연속되어 있는 6 에이커로 이루어져 있는 해바라기 필드 (필드 (2))를 포함하고 있지만, 습도 조건을 고려해서 필드 (1) 이후에 이식하였다. 2011년 8월 10일에 개화기는 시작에 불과하다는 것을 알아내었다. 2011년 8월 10일에 늦게 필드 (1)에서 필드 (2)로 땅벌 쿼드를 이동시켰다.

- [0101] 필드 (2)로부터 약 6개의 꽃을 2011년 8월 10일에 실시예 1에서 설명한 식물 치료제로 인공적으로 배양시켰다.
- [0102] 2011년 8월 26일에 필드 (2) (필드 1에서와 같이 퀴드로부터 동일한 거리)에서 트란섹트로부터 꽃을 수집하였다. by hand로 분말 제형으로 접종시킨 꽃을 또한 수집하였다.
- [0103] 병 (diseases), 사상균 및 해충을 위한 필드 #2의 헤드와 관엽을 조사하였고, 진단을 위해서 시료를 실험실로 가져왔다.
- [0104] 시료 꽃의 꽃 부분을 필드 (1)과 관련해서 상술한 바와 같이, 2011년 8월 27일에 PCA에 플레이팅하였다. 추후 검사를 위해서 서브 샘플링된 (sub-sampled) 헤드를 개방 패치 백에 보관하였다.
- [0105] 결과와 논의-플레이팅 후 9일
- [0106] 아래의 표6에서는 플레이팅 후 9일에 측정 결과를 나타낸 것이다. 이러한 표는 크로노스타치스 로세아를 가지는 꽃 부분의 평균%의 측정을 나타낸 것이다.

표 6

별집으로부터의 거리 (m)	헤드 수												평균 %**
	1			2			3			4			
	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	
3	1	0	2.5	1	1	5	0	2	7.5	1	1	5	5.00
40	0	2	7.5	0	2	7.5	0	2	7.5	1	0	2.5	6.25
80	0	0	0	3	3	25	0	0	0	1	1	2.5	6.87
120	2	0	7.5	1	2	10	1	1	5	3	0	12.5	8.75
160	0	0	0	0	1	2.5	2	1	10	1	0	2.5	3.75

- [0107]
- [0108] 표 6-약 20%의 헤드에서 트란섹트 1 (주의: 해충 (해바라기 나방) 손상을 관찰하였다. 트란섹트와 가장 근접해 있는 1개의 퀴드가 있었지만, 다른 퀴드의 벌이 참여했다. 2011년 8월 26일에 동물에 의해서 손상된 채로 퀴드를 발견하였다.
- [0109] 결과 및 논의- 플레이팅 후 15일: 이하의 표7은 플레이팅 후 15일에 측정 결과를 나타낸 것이다. 이러한 표는 크로노스타치스 로세아를 가지는 꽃 부분의 평균% 측정을 나타낸 것이다.

표 7

별집으로부터의 거리 (m)	헤드 수												평균 %**
	1			2			3			4			
	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	
3	2	2	15.0	3	2	20	1	3	15.0	1	2	10	15.0
40	2	3	20.0	0	3	12.5	0	3	12.5	3	1	15.0	15.0
80	0	0	0	3	4	30	0	0	0	1	4	20.0	17.5
120	3	1	15.0	2	4	30	4	4	35	4	0	17.5	24.4
160	0	2	7.5	0	3	12.5	3	1	15.0	3	1	15.0	12.5

[0110]

[0111]

표7-여러 헤드에서 트란섹트 1 (주의: 해충 (해바라기 나방)손상을 관찰하였다. 땅벌 벌집 중 트란섹트와 근접한 한 개의 퀴드가 있었지만, 다른 퀴드의 벌이 참여했다. 퀴드는 (동물에 의해서)손상된 채로 발견하였다 (2011년 8월 26일).

[0112]

결과 및 논의 - 필드 2에서 손으로 (by hand) 집중한 헤드: 표8은 손으로 집중한 해바라기 헤드의 결과를 나타낸 것이다. 이러한 표는 크로노스타치스 로세아를 가지는 꽃 부분의 평균% 측정을 나타낸 것이다.

표 8

	A	B	평균
헤드 #1	9	8	80%
헤드 #2	5	8	60%
헤드 #3	3	4	30%
헤드 #4	3	3	25%
헤드 #5	4	6	45%

표 8

[0113]

[0114]

필드 3

[0115]

3차 시험 사이트는 대략 9 에이커로 이루어져 있는 해바라기 필드를 포함했다. 필드 (3)은 약 개화 중기 (mid-bloom)에 있었다. 필드 (1)과 관련해서 기재되어 있는 퀴드는 필드를 이등분하고, 해당 필드 중 절반에서 해바라기에 인접해 있는 로드웨이 (roadway)에 배치하였다. 동일한 샘플링 절차와, 필드 (1,2)에서와 같이 퀴드로부터의 거리에 따라서 필드 (3)에서 트란섹트로부터 꽃을 수집하였다.

[0116]

병, 사상균 및 해충을 위한, 필드 (3)의 헤드와 관엽을 조사하였고, 진단을 위해서 시료를 실험실로 가져왔다.

[0117]

상술한 바와 같이 2011년 8월 29일에, 샘플링된 꽃으로부터 꽃 부분을 PCA 상에 플레이팅하였다.

[0118]

결과 및 논의-플레이팅 후 7일: 아래의 표9는 플레이팅 후 7일에 측정 결과를 나타낸 것이다. 이러한 표는 크

로노스타치스 로세아를 가지는 꽃 부분의 평균% 측정을 나타낸 것이다.

표 9

별집으로부터의 거리 (m)	헤드 수												평균 % ^{**}
	1			2			3			4			
	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	
3	0	0	0	0	1	2.5	0	1	2.5	1	1	5	2.5
40	0	0	0	0	0	0	0	2	7.5	1	0	2.5	2.5
80	1	0	2.5	2	0	7.5	0	0	0	0	0	0	2.5
120	1	0	2.5	2	0	7.5	0	1	2.5	1	0	2.5	3.75
160	0	0	0	1	0	2.5	0	0	0	0	2	7.5	2.5

표9

[0119]

[0120]

결과 및 논의-플레이팅 후 13일: 아래의 표10은 플레이팅 후 15일에 측정 결과를 나타낸 것이다. 이러한 표는 크로노스타치스 로세아를 가지는 꽃 부분의 평균% 측정을 나타낸 것이다.

표 10

별집으로부터의 거리 (m)	헤드 수												평균 % ^{**}
	1			2			3			4			
	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	A	B	평균 %	
3	1	0	2.5	0	1	2.5	0	1	2.5	1	1	5	3.1
40	1	0	2.5	2	2	15.0	0	3	12.5	0	0	0	15.0
80	3	1	15.0	4	2	15.0	0	0	0	0	0	0	7.5
120	3	2	20.0	3	0	12.5	1	1	5.0	1	2	10.0	11.9
160	0	0	0	2	0	5.0	1	0	2.5	0	2	7.5	3.75

표10

[0121]

[0122]

필드 (2)와 필드 (3)모두에서, 꽃 부분을 제거시킨 후에 샘플링 (백이 개방되어 있음)을 위해서 사용한 패치 백에 헤드를 보관하였다. 9일에 검사했을 때, 몇 개의 헤드 중 여러 부분, 일부 예시에서 종자가 없는 중심부를 포함해서 크로노스타치스 로세아의 포자 형성을 일부 관찰하였다. 포자 형성은 가장 컷지만 (적용된 분말의 로

드로 주어진 것과 같음), 손으로 접촉한 헤드에 대해서는 불규칙적이었다. 특정한 다른 진균 (클라도스포룸속)은 크게 포자를 형성하였고; 이들은 "헤드 스타트 (start)"를 얻기 위해서 특이한 (extraordinary) 접촉원 로드를 가지고 있을 수 있다. 클로닝된 꽃으로 동시적으로 플레이팅된 미숙 종자를 완전히 포자 형성으로 커버했다.

[0123] 실시예 4 : 땅벌-벡터링된 크로노스타키스 로세아(*clonostachys rosea*) 및 바실러트 투링기엔시스(*bacillus thuringiensis*)로 치료된 해바라기 및 미치료된 대조군 해바라기 종자의 평가

[0124] 실시예 3에 기재된 필드 1 및 미치료된 해바라기로부터 종자 샘플이 채취되었다. 종자들의 각각의 그룹의 부표본들이 아가(agar) 배지 상에 펼쳐지고, 종자들의 발아 특성 능력; 크로노스타키스 로세아의 존재/부재; 질병-유발 병원체를 포함한 종자 상의 다른 균류의 존재가 테스트되었다.

[0125] 그룹당(즉, 필드 1 및 대조군 필드) 각각 40-50 종자인 15개의 부표본들이 페트리 디쉬 내의 PCA 배지 상에 펼쳐졌다. 배지는 조직의 노화 및 크로노스타키스 로세아의 회복을 촉진시키는 파라콰트(Paraquat), 클로람페니콜(항박테리아 항생제)를 포함하지만 미생물 영양분은 포함하지 않았다. 대부분의 부표본들은 해바라기 헤드의 다른 부분의 검은 조각들을 조금 포함하였다. 디쉬들은 플라스틱 박스 내에서 인큐베이트 되었고 필요에 따라 해부 현미경 및 복합 현미경을 사용하여 2 주 간격으로 시험되었다.

[0126] 결과:

[0127] 종자 발아 : 대조군 해바라기 - 70.7%; 필드 1의 해바라기 - 89.7%

[0128] 상술한 비 벡터링(*bee vectored*) 치료된 종자의 발아는 미치료된 대조군에 비하여 약 27% 높았다.

[0129] 평균값은 좋은 건강한 라디칼을 생성하는 종자들만을 포함한다. 라디칼을 생성하지 않거나 즉시 불임(*abort*)되는 것(예를 들어, 나타날 때 갈색인 것)들은 발아되지 않는 것으로 평가되었다.

[0130] 비-발아의 실제적인 값들

[0131] 대조군 : 10/48, 16/56, 10/42, 20/49, 14/38, 10/40, 14/44, 4/28, 16/40, 12/36, 8/30, 6/28, 12/39, 13/45, 12/41. $177 / 604 = 29.3\%$

[0132] 벌-벡터링 : 4/32, 8/46, 10/54, 4/51, 2/28, 4/48, 2/41, 4/62, 6/44, 4/49, 9/50, 2/36, 2/35, 3/35, 4/49. $68 / 660 = 10.3\%$

[0133] 크로노스타키스 로세아의 회복 : 크로노스타키스 로세아는 관찰 14-일 주기 내에서는 어떠한 해바라기 종자에서도 포자를 형성하지 않았다. 크로노스타키스 로세아는 벌 벡터링된 재료 내에서만, 해바라기 헤드로 추정되는 조직 절편 몇몇에서만 포자를 형성하였다.

[0134] 이 시점에서 크로노스타키스는 해바라기 종자 내에서는 확립되지 않거나, 설령 확립된다고 하여도 그로부터 즉시 자라나지는 않는 것으로 보인다.

[0135] 다른 균류 : 곰팡이는 필드 1의 종자보다 대조군 필드의 종자에 더욱 많다는 것이 명백하였다. 대조군 종자 내 : 후사리움(*fusarium*) spp - 매우 흔함; 페니실린 spp - 흔함; 보트리티스 시네레아 - 중간 정도로 흔함; 포자가 없는 다른 곰팡이(균사체만 있으므로 식별되지 않음). 필드 1의 종자 내 : 후사리움 spp, 페니실린 spp, 및 약간의 리조퍼스(*Rhizopus*), 그러나 모두 대조군에서보다 훨씬 적은 빈도였다. 보트리티스는 발견되지 않았다.

[0136] 두 샘플들 모두에서, 일부 종자들은 하나 이상의 이들 균류로 인해 불임되는 것으로 나타났다.

[0137] 클라도스포리움(*cladosporium*) 및 알타나리아(*alternaria*)는 두 종자 로트 모두에서 종자의 종피("겉껍질" 또는 "껍데기") 상에서 흔하였으나, 어떠한 문제를 일으키지는 않는 것으로 보였다.

[0138] 이러한 발견은 여기에 개시된 치료가 해바라기 종자의 발아율을 27%까지 향상시키고 존재하는 균류(곰팡이)의 수준을 상당히 감소시켰다는 것을 보여준다.