(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 7 월 9 일 (09.07.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/141874 A1

(51) 국제특허분류:
A01N 31/02 (2006.01) *A01N 63/10* (2020.01)
A01N 63/30 (2020.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/000009

(22) 국제출원일: 2020 년 1 월 2 일 (02.01.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0000212 2019 년 1 월 2 일 (02.01.2019) KR

(71) 출원인: 경상대학교산학협력단 **(INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY)** [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자: 곽연식 **(KWAK, Youn-Sig)**; 52667 경상남도 진주시 진주대로 1317, 110동 901호., Gyeongsangnam-do (KR). 김다란 **(KIM, Da-Ran)**; 53045 경상남도 통영시 무전2길 36, 309호., Gyeongsangnam-do (KR).

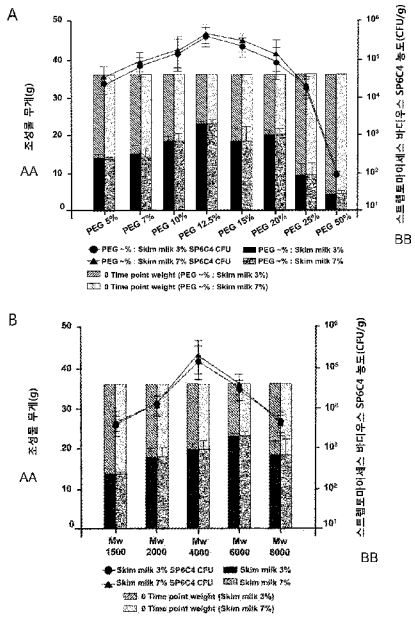
(74) 대리인: 최규환 **(CHOI, Kyu Whan)**; 35209 대전시 서구 한발대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) **Title:** BEE-VECTORING COMPOSITION FOR PREVENTING PLANT DISEASES, CONTAINING, AS ACTIVE INGREDIENTS, HYDROPHILIC POLYMER AND USEFUL MICROORGANISMS

(54) **발명의 명칭:** 친수성 고분자 및 유용 미생물을 유효성분으로 포함하는 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물



AA ... Weight of composition (g)
BB ... Concentration of Streptomyces badius SP6C4 (CFU/g)

(57) Abstract: The present invention relates to: a bee-vectoring composition for preventing plant diseases, containing, as active ingredients, a hydrophilic polymer and useful microorganisms; and a method for preventing bee-mediated plant diseases, comprising a step of treating bees with the composition. The bee-vectoring composition of the present invention has an excellent effect of inhibiting composition evaporation so as to enable useful microorganisms present in the composition to remain in a plant for a long time, thereby being usable in the development of an eco-friendly agricultural chemical for preventing diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 친수성 고분자 및 유용 미생물을 유효성분으로 포함하는 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물 및 상기 조성물을 벌에 처리하는 단계를 포함하는 벌 매개 식물병 방제 방법에 관한 것으로, 본 발명의 비-벡터리용 조성물은 조성물 증발 억제 효과가 우수하여 조성물 내에 존재하는 유용 미생물이 식물체에 장기간 머물 수 있으므로 병해 방제를 위한 친환경 농약 개발에 활용될 수 있다.

WO 2020/141874 A1

[다음 쪽 계속]

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 친수성 고분자 및 유용 미생물을 유효성분으로 포함하는 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 친수성 고분자 및 유용 미생물을 유효성분으로 포함하는 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 작물 재배 시 많은 식물병원균 또는 해충들이 작물의 생장을 저해시켜, 이들에 대한 방제를 실시하지 않을 경우 작물에 따라서는 30~100%의 수확량이 감소될 수 있다. 이러한 유해 생물을 방제하기 위해 지금까지 많은 합성농약들이 개발되고 사용되어 왔으나, 많은 항생물질과 합성 농약이 오·남용됨에 따라 생태계 파괴, 잔류로 인한 인체 독성, 발암 또는 기형 등의 각종 질환을 유발할 가능성이 매우 높아 그 사용이 제한되고 있다. 이에 따라 미생물과 식물로부터 새로운 선도물질을 탐색하고자 하는 연구와 식물 추출물 또는 미생물을 이용하는 생물농약 개발에 대한 연구가 많이 진행되어 왔다. 생물농약은 환경친화적 작물보호제로서 합성농약과는 달리 인축 및 생태계에 안전하여 부가가치가 높은 농산물을 생산할 수 있고, 합성농약으로 방제하기 어려운 병해충을 효과적으로 방제하여 안전한 농작물의 생산을 증대시킬 수 있을 뿐만 아니라 합성농약의 오남용으로 인한 문제점도 해결할 수 있다.

[3] 비-벡터링(bee-vectoring) 기술은 꿀벌이나 뒤영벌들이 모여 있는 벌통의 내부 또는 외부에 미생물 제제를 담은 분배장치를 설치하여 벌들이 수분활동을 위해 벌통에서 외부로 빠져나갈 때 분배장치를 통과하여 기어나가게 함으로써 몸에 미생물 제제가 묻게 하고, 미생물 제제가 묻어있는 벌들이 수분활동을 하는 동안에 식물체의 꽃이나 잎 부위에 유용 미생물을 퍼트려 병해충 방제를 할 수 있도록 고안된 작물 보호 기술이다. 이러한 기술은 화분매개곤충들의 빈번한 방화활동을 이용하여 병해충 방제가 필요한 꽃이나 잎에 정확히 미생물 제제를 운반함으로써, 농작물의 수량을 증가시키고 품질을 향상시킬 수 있는 장점이 있다. 또한, 병해충 방제를 위해 미생물 제제 또는 농약 등을 빈번하고 광범위하게 사용해왔던 단점을 보완할 수 있다.

[4] 한편, 한국공개특허 제2015-0002663호에는 '미립자 칼슘 실리케이트 및 크로노스타치스 로세아를 포함하는 식물 치료용 제제'가 개시되어 있으나, 본 발명의 친수성 고분자 및 유용 미생물을 유효성분으로 포함하는 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 식물병

방제 미생물을 벌에 매개하여 식물체에 전달하기 위한 비-벡터리용 조성물을 제조하였고, 조성물 총 중량에 대비하여 폴리에틸렌글리콜(poly ethylene glycol, PEG; MW 4000)이 12.5%로, 탈지유(Skim milk)가 3% 농도로 포함될 경우 조성물의 증발량이 현저하게 감소한 것을 확인하였다. 또한, 상기 조성물에 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주를 혼합하고, 이를 벌에 분사한 결과 딸기에서 잿빛곰팡이병(gray mold)의 발병이 억제되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[6] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 친수성 고분자 및 유용 미생물을 유효성분으로 포함하는 식물병 방제를 위한 비-벡터링(bee-vectoring)용 조성물을 제공한다.

[7] 또한, 본 발명은 상기 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물을 벌에 처리하는 단계를 포함하는 벌 매개 식물병 방제 방법을 제공한다.

발명의 효과

[8] 본 발명의 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물은 상온에서 조성물 증발 억제 효과가 우수하여, 조성물 내에 존재하는 유용 미생물이 식물체에 장기간 머무를 수 있도록 하여, 유용 미생물 효과를 증진시킬 수 있으므로, 병해 방제 효과가 우수한 친환경적 생물농약의 제품 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[9] 도 1은 본 발명의 비-벡터링용 조성물 제조의 최적 조건을 선발한 결과로, A는 다양한 농도의 폴리에틸렌글리콜(PEG) 및 탈지유(skim milk)와 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4를 혼합하고 상온에서 10일 동안 반응시킨 후 조성물의 무게 및 조성물에 존재하는 미생물 농도를 측정한 결과이고, B는 다양한 분자량의 폴리에틸렌글리콜 및 탈지유와 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4를 혼합하고 상온에서 10일 동안 반응시킨 후 조성물의 무게 및 조성물에 존재하는 미생물 농도를 측정한 결과이다. 0 Time point weight; 실험 시작일에 측정, 왼쪽 세로축; 조성물의 무게, 오른쪽 세로축; 유용 미생물 농도.

[10] 도 2는 딸기 재배용 시설하우스 안에 놓아둔 벌통의 출입구에 비-벡터링용 조성물을 공급할 수 있는 분사장치가 설치된 모습이다.

[11] 도 3은 수분곤충인 벌을 이용한 자연전파 시스템을 통해 비-벡터링용 조성물을 벌에 처리한 후 포장 내의 딸기에서 잿빛곰팡이병의 발병 억제 효과를 일자별로 확인한 결과이다. control(untreated); 비-벡터링 조성물 무처리 대조군, Honey bee delivery system with SP6C4; 비-벡터링 조성물 처리군.

[12] 도 4는 벌 매개 식물병 방제 방법의 효과를 평가하기 위해 딸기에 존재하는 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주의 농도를 측정하기 위해 상기 균주에

특이적으로 존재하는 항생물질 유전자인 *lanM*의 발현을 일자별로 확인한 qPCR(quantitative polymerase chain reaction) 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[13] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 친수성 고분자 및 유용 미생물을 유효성분으로 포함하는 식물병 방제를 위한 비-벡터링(bee-vectoring)용 조성물을 제공한다.

[14] 본 발명의 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물에서, 상기 친수성 고분자는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glcol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 폴리에틸렌이민(polyethylene imine), 폴리옥사졸린(polyoxazolin), 히드록시프로필 셀룰로오스(hydroxypropyl cellulose), 폴리아크릴산(poly(acrylic acid)), 폴리비닐알코올(poly(vinyl alcohol)), 폴리비닐아세테이트(poly(vinyl acetate)), 폴리아크릴로니트릴(poly acrylonitrile), 폴리에틸렌옥사이드(poly(ethylene oxide)), 폴리알릴아민(poly(allylamine)) 및 폴리아크릴아미드(polyacrylamide)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것일 수 있고, 바람직하게는 폴리에틸렌글리콜일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 폴리에틸렌글리콜은 분자량 3,500~4,500 Da의 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 폴리에틸렌글리콜은 보존제 역할을 한다.

[15] 또한, 본 발명의 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물에서, 상기 유용 미생물은 식물병에 대한 방제 활성이 있는 미생물로서, 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.), 액티노마이세스 속(*Actinomyces* sp.), 바실러스 속(*Bacillus* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.) 또는 트리코데르마 속(*Trichoderma* sp.)의 미생물일 수 있고, 바람직하게는 스트렙토마이세스 속의 미생물일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4(기탁번호: KCCM11703P)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주는 딸기 꽃 곰팡이병에 방제활성을 가진 것으로 알려진 균주이다(한국등록특허 제1695978호 참고).

[16] 본 발명의 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물은 탈지유(skim milk), 트레할로스(trehalose), 다당류(polysaccharide), 글리세롤(glycerol), 젤라틴(gelatin) 및 식용기름(edible oil)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 추가로 포함할 수 있고, 바람직하게는 탈지유를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 탈지유는 조성물에 포함된 유용 미생물을 외부 자극으로부터 보호하여 장기간 생존율을 높여주는 역할을 한다.

[17] 본 발명의 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물은, 더욱 바람직하게는 분자량 3,500~4,500 Da의 폴리에틸렌글리콜 및 탈지유가 조성물 내에 각각 11~13%(w/v) 및 2~4%(w/v)의 농도로 포함될 수 있고, 더 더욱 바람직하게는 4,000 Da의 폴리에틸렌글리콜 및 탈지유가 조성물 내에 각각 12.5%(w/v) 및 3%(w/v)의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[18] 본 발명의 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물에서, 4,000 Da의 폴리에틸렌글리콜과 탈지유가 각각 12.5%(w/v) 및 3%(w/v)의 농도로 포함될 경우, 조성물의 증발량이 감소되어 벌에 분사되기까지 장기간 상온에 노출되어도 손실량이 매우 적어 유용하며, 조성물에 함유된 유용 미생물이 식물체에 장기간 머무를 수 있으므로, 식물병 방제 효과가 우수하다.

[19] 본 발명에 따른 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물은, 예를 들어, 직접 분사가능한 용액, 현탁액의 형태 또는 고농축 수성, 유성 또는 다른 현탁액, 분산액, 에멀젼 또는 유성 분산액으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[20] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물은 다양한 형태로 제제화할 수 있다. 상기 제제는 예를 들어 용매 및/또는 담체를 첨가함으로써 제조될 수 있다. 종종, 비활성 첨가제 및 표면-활성 물질, 예를 들어 유화제 또는 분산제를 제제에 혼합한다. 적합한 표면-활성 물질은 방향족 술폰산(예를 들어 리그노술폰산, 페놀-술폰산, 나프탈렌- 및 디부틸나프탈렌술폰산), 지방산, 알킬- 및 알킬아릴술포네이트, 알킬 라우릴에테르, 지방 알코올 술페이트의 알칼리 금속, 알카라인 토금속, 암모늄염, 술페이트화 헥사-, 헵타- 및 옥타데칸올, 지방 알코올 글리콜 에테르의 염, 술포네이트 나프탈렌 및 이의 유도체, 포름알데히드의 축합물, 나프탈렌 또는 나프탈렌술폰산, 페놀 및 포름알데히드의 축합물, 폴리옥시에틸렌옥틸 페놀 에테르, 에톡실화 이소옥틸-, 옥틸- 또는 노닐페놀, 알킬페닐 또는 트리부틸페닐 폴리글리콜 에테르, 알킬아릴폴리에테르 알코올, 이소트리데실 알코올, 지방 알코올/에틸렌 옥사이드 축합물, 에톡실화 피마자유, 폴리옥시에틸렌 알킬에테르 또는 폴리옥시프로필렌, 라우릴 알코올 폴리글리콜 에테르 아세테이트, 소르비톨 에스테르, 리그닌-술파이트 폐액 또는 메틸셀룰로오스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[21] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물은 작물체 흡수 및 효과를 증진시키기 위하여 확산제 및 침투제, 또는 계면활성제와도 혼용이 가능하다.

[22] 상기 확산제 및 침투제 또는 계면활성제는 유용 미생물의 활성을 억제하지 않는 범위에서 활용 가능하다.

[23] 본 발명은 또한, 상기 식물병 방제를 위한 비-벡터링(bee-vectoring)용 조성물을 벌에 처리하는 단계를 포함하는 벌 매개 식물병 방제 방법을 제공한다.

[24] 상기 비-벡터링은 벌(bee)이 수정활동을 하는 동안 식물병 방제용 미생물 제제를 식물체에 전달하게 하여 식물병 발생을 억제시킬 수 있는 작물보호 기술 중 하나이다.

[25] 본 발명의 일 구현 예에 따른 벌 매개 식물병 방제 방법에서, 상기 식물병 방제를 위한 비-벡터링(bee-vectoring)용 조성물은 4,000 Da의 폴리에틸렌글리콜 및 탈지유를 각각 12.5%(w/v), 3%(w/v)의 농도로 혼합한 후 상기 혼합물에 10^6 CFU/㎖ 농도의 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*)

SP6C4(기탁번호: KCCM11703P) 균주가 존재하는 1X PBS(phosphate buffered saline) 버퍼가 혼합된 것으로, 상기 조성물을 벌에게 분사하기 위해 벌통 입구에 분사 장치를 설치한 후 벌이 출입할 때 조성물을 벌에게 분주하여 딸기의 잿빛곰팡이병 또는 꽃곰팡이병을 방제할 수 있다.

[26] 본 발명의 일 구현 예에 따른 벌 매개 식물병 방제 방법에서, 상기 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물은 시설하우스 내에서 벌에게 처리하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[27]

[28] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[29]

[30] **실시예 1. 식물병 방제를 위한 비-벡터링(bee-vectoring)용 조성물의 제조**

[31] 비-벡터링용 조성물의 증발 억제를 위한 최적의 조성을 선발하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다. 2,000 Da PEG가 다양한 농도로 함유된 조성물들의 무게 및 조성물 내 미생물의 농도를 측정하여 최적의 PEG 농도를 선발한 후, 상기에서 선발된 최적의 PEG 농도로 다양한 분자량의 PEG가 함유된 조성물들의 무게 및 조성물 내 미생물의 농도를 측정하여 최적의 PEG 분자량을 선발하였다. 우선, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 2,000 Da을 각각 5%, 7%, 10%, 12.5%, 15%, 20%, 25%, 50%의 농도로 제조한 후 3% 또는 7% 농도의 탈지유(skim milk)를 각각 혼합하였다. 상기 혼합물에 10^6 CFU/㎖ 농도의 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주가 들어있는 1X PBS 버퍼를 첨가하였다. 이 후 상온에서 10일이 경과한 후 상기 조성물의 무게 및 조성물 내에 함유된 유용 미생물의 농도를 측정하였다.

[32] 그 결과, 총 8개 농도의 2,000 Da PEG가 각각 포함된 조성물들의 초기 측정 무게는 35 g이었고, 10일 후에 다시 측정한 결과 12.5%의 PEG가 혼합된 조성물의 무게가 약 24 g으로 가장 높았으며, 조성물에 존재하는 미생물의 농도는 12.5%의 PEG가 혼합된 조성물에서 최초 처리 농도인 10^6 CFU/㎖와 유사한 수준으로 유지되고 있음을 확인하였다(도 1A).

[33] 또한, 총 5개 분자량의 PEG가 12.5% 농도로 각각 포함된 조성물들의 초기 측정 무게는 35 g이었고, 10일 후에 다시 측정한 결과 6,000 Da PEG가 혼합된 조성물의 무게가 약 23g으로 가장 높았으나, 조성물에 존재하는 미생물의 농도는 4,000 Da PEG가 혼합된 조성물에서 최초 처리 농도인 10^6 CFU/㎖와 유사한 수준으로 유지되고 있음을 확인하였다. 그리고 skim milk는 3% 또는 7% 농도로 조성물에 처리한 경우 조성물의 무게 및 조성물 내에 존재하는 미생물의 농도가 서로 유사한 것을 확인하였다(도 1B).

[34] 상기의 결과를 통해, 비-벡터리용 조성물에 4,000 Da의 PEG가 12.5%로, skim milk가 3%로 포함될 경우 조성물의 증발 억제 효과가 가장 우수하고, 조성물 내 유용 미생물의 농도도 초기 농도와 유사한 수준으로 유지될 수 있음을 알 수

있었다.

[35]

[36] **실시예 2. 비-벡터링용 조성물의 처리에 따른 딸기 잿빛곰팡이병 발병 억제 효과**

[37] 딸기 재배용 시설하우스 안에 놓아둔 벌통의 출입구에 비-벡터리용 조성물을 공급할 수 있는 분사장치(부피: 450 ㎖)를 설치하였고(도 2), 분사장치에 균주를 도입한 경우 호기성균의 특성상 산소를 공급하는 층을 유지하기 위해 250~300 ㎖만을 투입하였다. 2주 후에 딸기의 잿빛곰팡이병 발병도를 관찰하였다. 발병도 관찰 구역은 벌통으로부터 3 M 떨어진 공간을 1구역, 입구로부터 20 M 떨어진 공간을 2구역, 포장의 끝으로부터 3 M 떨어진 공간을 3구역으로 지정하였으며, 각 구역에서 150개의 딸기 개체를 대상으로 발병도를 관찰하였다.

[38] 비-벡터링용 조성물을 수분곤충인 벌을 이용한 자연전파 시스템을 통해 딸기에 처리한 결과, 비-벡터링용 조성물이 처리되지 않은 무처리 대조군에서는 발병률이 30% 이상이었으나, 비-벡터링용 조성물이 처리된 실험군에서는 발병률이 15% 미만인 것으로 확인되었다(도 3). 이를 통해, 유용 미생물이 포함된 조성물을 비-벡터링 시스템으로 처리할 경우 식물병 발병 억제 효과가 우수함을 알 수 있었다.

[39]

[40] **실시예 3. 수분곤충의 자연전파방식을 이용한 딸기에서 유용 미생물의 농도 측정**

[41] 딸기에 존재하는 유용 미생물의 농도를 확인하기 위해 딸기의 표면에 존재하는 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4를 분리한 후 CTAB(cetyl trimethylammonium bromide) 기법을 통해 게노믹 DNA를 추출하였고, 상기 균주의 특이적 항생물질 유전자인 *lanM* 특이적 프라이머(정방향: 5'-gtacggatctgcaccacga-3'(서열번호 1), 역방향: 5'-aacagggtctccacatcgac-3'(서열번호 2)를 이용하여 qPCR(quantitative polymerase chain reaction)을 수행하였다.

[42] 딸기에 존재하는 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4의 농도를 실험 시작일에 측정한 결과, 비-벡터링용 조성물을 처리하지 않은 무처리 대조군과 비-벡터링용 조성물 처리군에서 모두 10^4 CFU/g인 것을 확인하였다. 비-벡터링용 조성물을 처리하고 2주 후에 다시 측정한 결과, 무처리 대조군의 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4의 농도는 10^3 CFU/g으로 감소한 반면, 비-벡터링용 조성물 처리군의 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4의 농도는 10^5 CFU/g으로, 유용 미생물의 농도가 초기와 유사한 수준으로 유지되고 있음을 알 수 있었다(도 4).

청구범위

[청구항 1] 친수성 고분자 및 유용 미생물을 유효성분으로 포함하는 식물병 방제를 위한 비-벡터링(bee-vectoring)용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 친수성 고분자는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glcol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 폴리에틸렌이민(polyethylene imine), 폴리옥사졸린(polyoxazolin), 히드록시프로필 셀룰로오스(hydroxypropyl cellulose), 폴리아크릴산(poly(acrylic acid)), 폴리비닐알코올(poly(vinyl alcohol)), 폴리비닐아세테이트(poly(vinyl acetate)), 폴리아크릴로니트릴(poly acrylonitrile), 폴리에틸렌옥사이드(poly(ethylene oxide)), 폴리알릴아민(poly(allylamine)) 및 폴리아크릴아미드(polyacrylamide)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물.

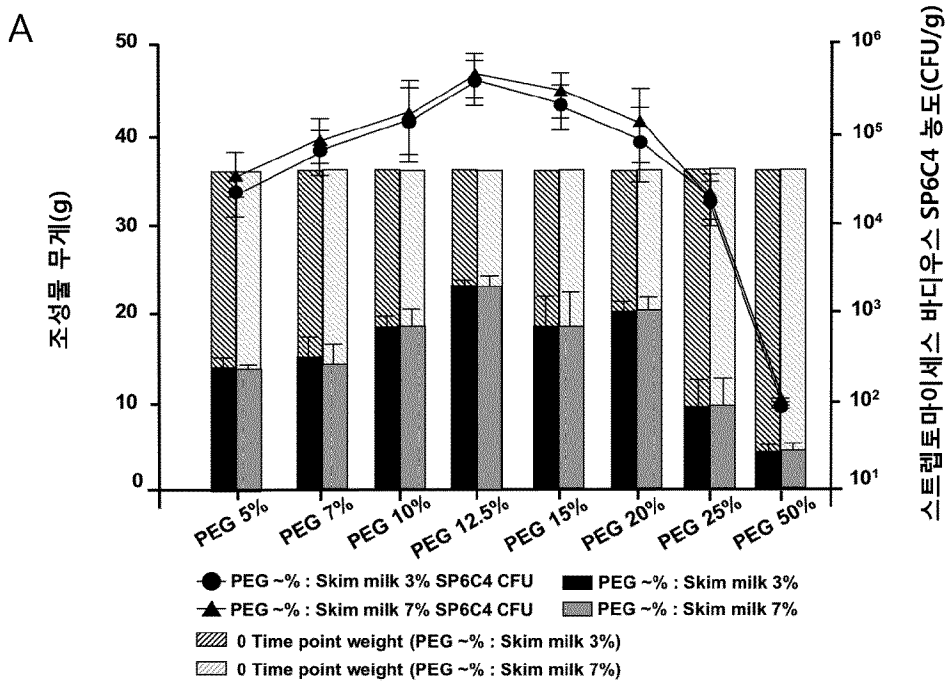
[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 유용 미생물은 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.), 액티노마이세스 속(*Actinomyces* sp.), 바실러스 속(*Bacillus* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.) 및 트리코데르마 속(*Trichoderma* sp.)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유용 미생물인 것을 특징으로 하는 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물.

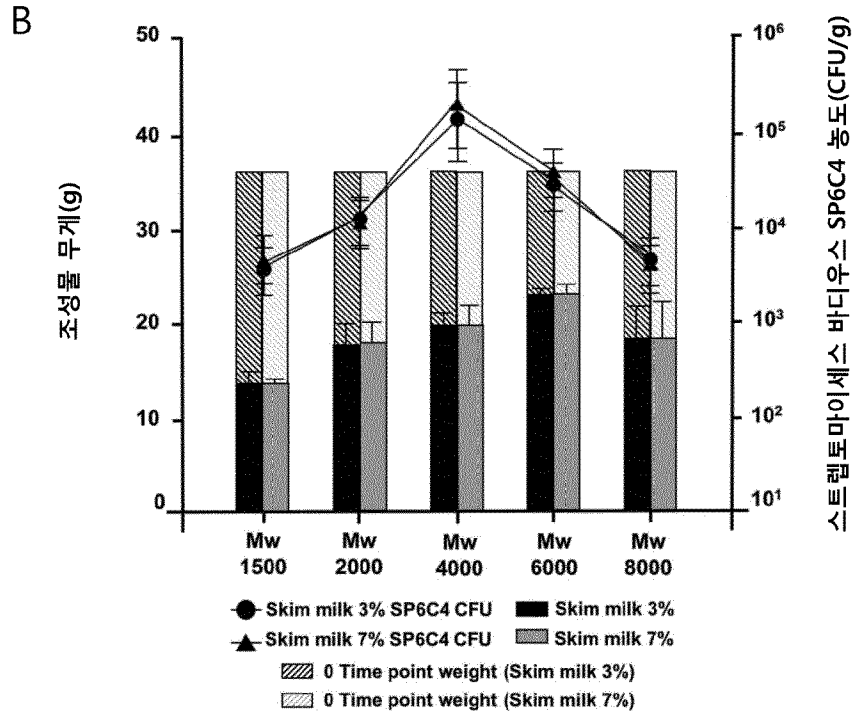
[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 비-벡터링 조성물은 탈지유(skim milk), 트레할로스(trehalose), 다당류(polysaccharide), 글리세롤(glycerol), 젤라틴(gelatin) 및 식용기름(edible oil)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물.

[청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 식물병 방제를 위한 비-벡터링(bee-vectoring)용 조성물을 벌에 처리하는 단계를 포함하는 벌 매개 식물병 방제 방법.

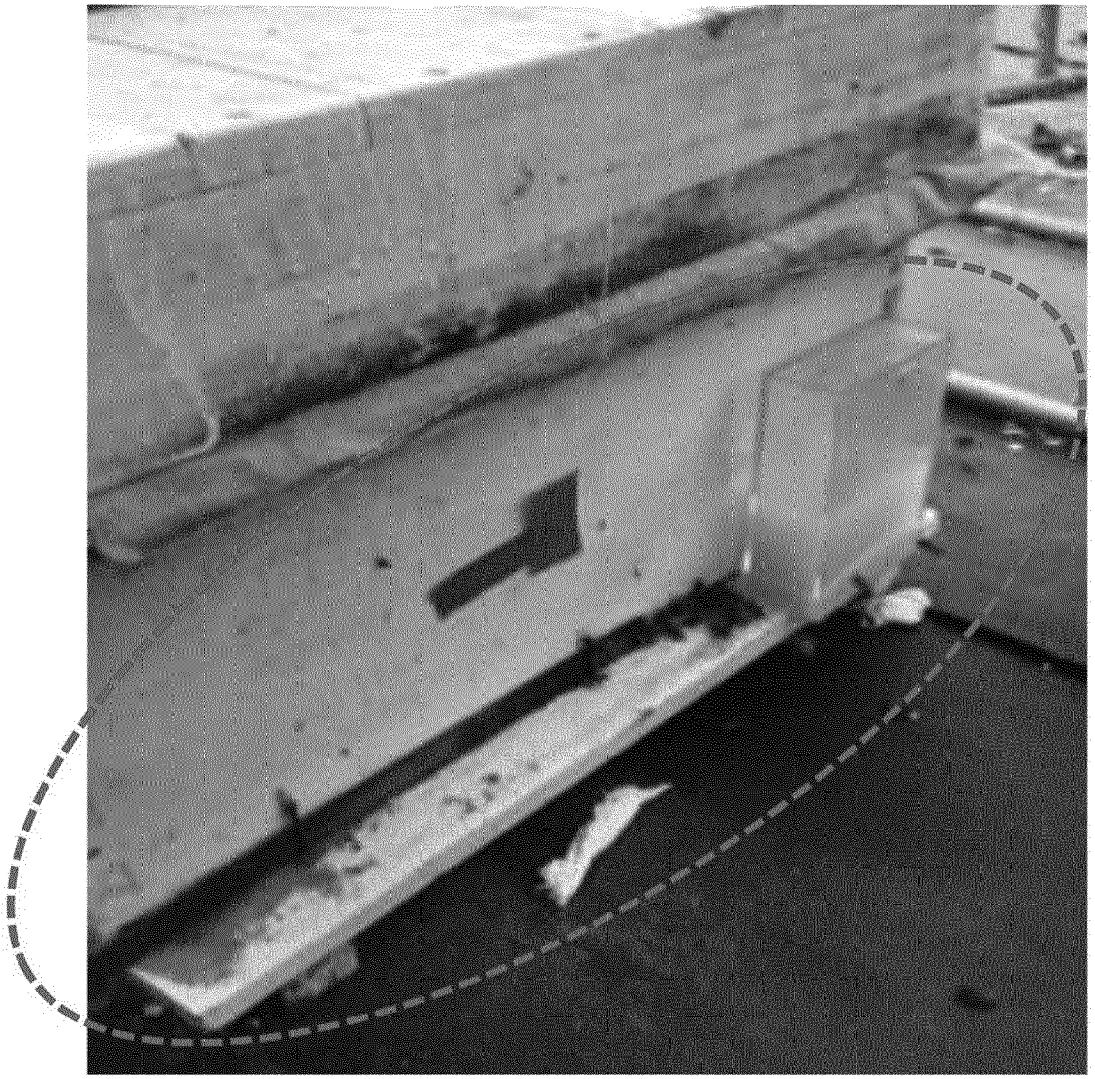
[청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 식물병 방제를 위한 비-벡터링용 조성물은 시설하우스 내에서 벌에 처리하는 것을 특징으로 하는 벌 매개 식물병 방제 방법.

[도1]

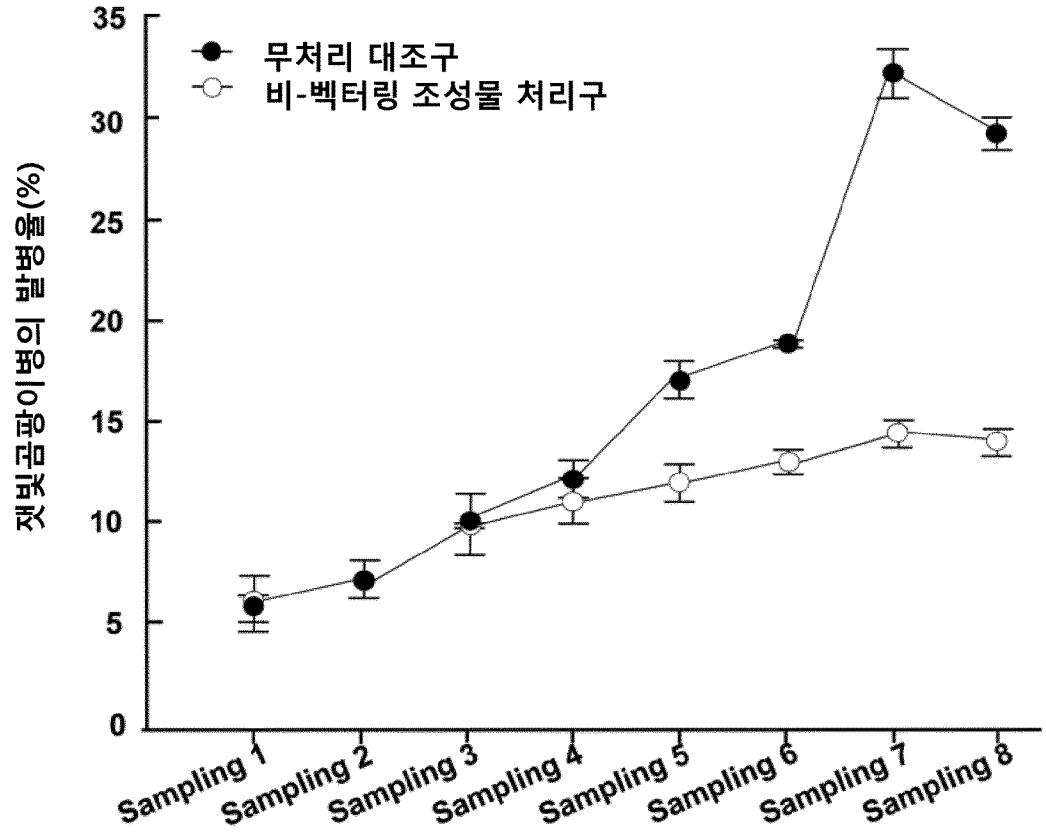

A
조성물 무게(g)
스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 농도(CFU/g)
PEG 5%
PEG 7%
PEG 10%
PEG 12.5%
PEG 15%
PEG 20%
PEG 25%
PEG 50%
PEG ~% : Skim milk 3% SP6C4 CFU
PEG ~% : Skim milk 7% SP6C4 CFU
PEG ~% : Skim milk 3%
PEG ~% : Skim milk 7%
0 Time point weight (PEG ~% : Skim milk 3%)
0 Time point weight (PEG ~% : Skim milk 7%)


B
조성물 무게(g)
스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 농도(CFU/g)
Mw 1500
Mw 2000
Mw 4000
Mw 6000
Mw 8000
Skim milk 3% SP6C4 CFU
Skim milk 7% SP6C4 CFU
Skim milk 3%
Skim milk 7%
0 Time point weight (Skim milk 3%)
0 Time point weight (Skim milk 7%)

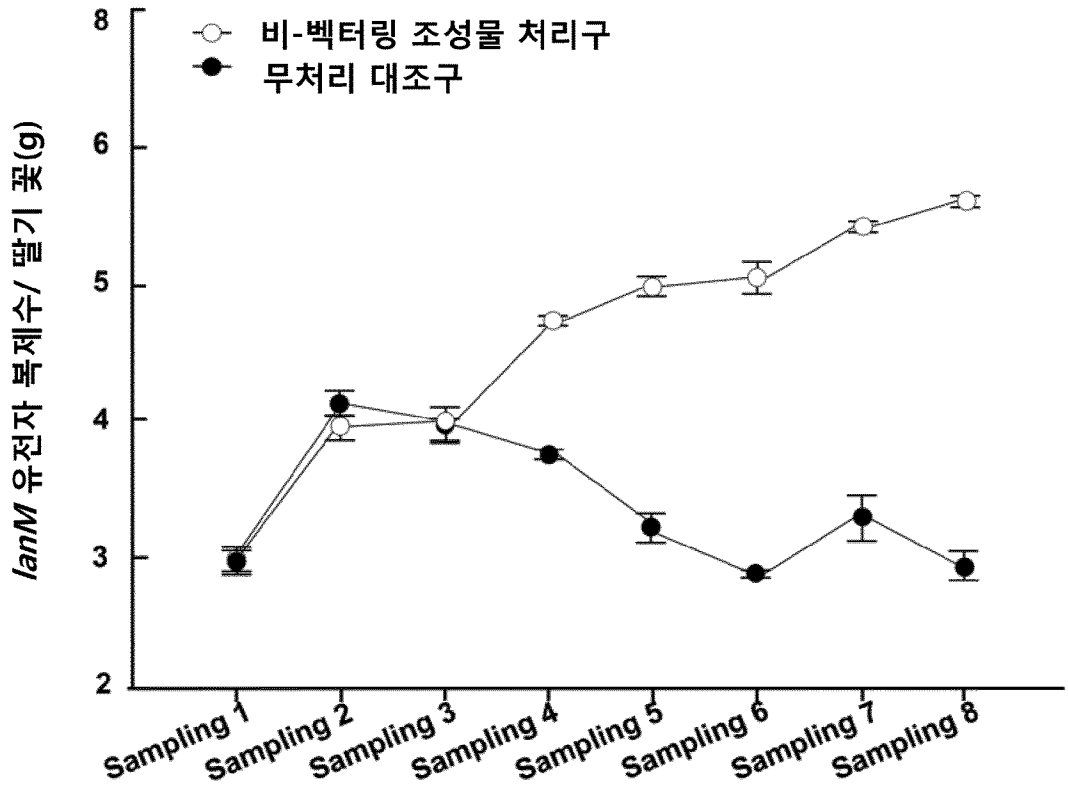
[도2]



[도3]


무처리 대조구
비-벡터링 조성물 처리구
잿빛곰팡이병의 발병율(%)
35
30
25
20
15
10
5
0
Sampling 1
Sampling 2
Sampling 3
Sampling 4
Sampling 5
Sampling 6
Sampling 7
Sampling 8

[도4]


비-벡터링 조성물 처리구
무처리 대조구
lanM 유전자 복제수/ 딸기 꽃(g)
8
6
5
4
3
2
Sampling 1
Sampling 2
Sampling 3
Sampling 4
Sampling 5
Sampling 6
Sampling 7
Sampling 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/000009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 31/02(2006.01)i, A01N 63/30(2020.01)i, A01N 63/10(2020.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N 31/02; A01K 47/06; A01N 25/02; A01N 25/12; A01N 43/50; A01N 63/04; A01N 63/30; A01N 63/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: bee-vectoring, polyethylene glycol, bacillus sp., plant disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	박홍현 등. 방울토마토 시설재배에서 비벡터링 [bee-vectoring]기술을 이용한 Bacillus subtilis 포장내 전파. 한국응용곤충학회지. 2013, vol. 52, no. 4, pages 357-364 (PARK, Honghyeon et al. Dissemination of Bacillus Subtilis by using Bee-vectoring Technology in Cherry Tomato Greenhouses. Korean Journal of Applied Entomology.) See abstract; page 359.	1-6
Y	JP 06-345607 A (CIBA GEIGY AG.) 20 December 1994 See paragraphs [0020], [0024].	1-6
A	KR 10-2015-0002663 A (BEE VECTORING TECHNOLOGY INC.) 07 January 2015 See the entire document.	1-6
A	KR 10-2015-0121021 A (BEE VECTORING TECHNOLOGY INC.) 28 October 2015 See the entire document.	1-6
A	WO 2010-136599 A2 (BIOBEST BELGIUM NV. et al.) 02 December 2010 See the entire document.	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 APRIL 2020 (21.04.2020)	**21 APRIL 2020 (21.04.2020)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea
Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/000009

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 06-345607 A	20/12/1994	AT 140364 T	15/08/1996
		AU 6452494 A	08/12/1994
		AU 676292 B2	06/03/1997
		BG 62027 B1	29/01/1999
		BG 98819 A	31/05/1995
		BR 9402169 A	02/05/1995
		CA 2125019 A1	05/12/1994
		CH 686061 A5	29/12/1995
		CN 1071093 C	19/09/2001
		CN 1107291 A	30/08/1995
		CN 1329826 A	09/01/2002
		CZ 135894 A3	18/01/1995
		CZ 285959 B6	15/12/1999
		CZ 9401358 A3	18/01/1995
		DK 0627164 T3	12/08/1996
		DK 0627164 T4	12/11/2001
		EP 0627164 A1	07/12/1994
		EP 0627164 B1	17/07/1996
		EP 0627164 B2	22/08/2001
		ES 2089899 T3	01/10/1996
		ES 2089899 T5	16/02/2002
		GR 3020572 T3	31/10/1996
		HU 214301 B	02/03/1998
		HU T67794 A	28/04/1995
		IL 109865 A	11/04/1999
		PL 175601 B1	29/01/1999
		PL 303678 A1	12/12/1994
		RO 109268 B1	30/01/1995
		RU 2121792 C1	20/11/1998
		SG 47425 A1	17/04/1998
		SK 280213 B6	08/10/1999
		SK 67294 A3	07/12/1994
		US 5430034 A	04/07/1995
KR 10-2015-0002663 A	07/01/2015	AU 2013-232699 A1	30/10/2014
		AU 2013-232699 B2	03/03/2016
		AU 2016-203562 A1	16/06/2016
		CA 2867076 A1	19/09/2013
		CA 2867076 C	27/09/2016
		CA 2934314 A1	19/09/2013
		CL 2014002398 A1	27/02/2015
		CN 104270950 A	07/01/2015
		EP 2825049 A1	21/01/2015
		HK 1206200 A1	08/01/2016
		IL 234490 A	30/10/2014
		IL 234490 B	29/06/2017
		IN 8499DEN2014 A	15/05/2015
		JP 2015-511590 A	20/04/2015
		MX 2014011059 A	11/05/2015

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		MX 360682 B	13/11/2018
		PE 20142458 A1	07/02/2015
		PE 24582014 A1	07/02/2015
		RU 2014141060 A	10/05/2016
		RU 2653885 C2	15/05/2018
		US 2015-0023906 A1	22/01/2015
		US 2016-0213006 A1	28/07/2016
		US 9380777 B2	05/07/2016
		US 9968099 B2	15/05/2018
		WO 2013-134870 A1	19/09/2013
KR 10-2015-0121021 A	28/10/2015	CA 2899257 A1	07/08/2014
		CA 2899257 C	09/05/2017
		EP 2950640 A1	09/12/2015
		EP 2950640 B1	12/09/2018
		ES 2701814 T3	26/02/2019
		JP 2016-504916 A	18/02/2016
		JP 6396926 B2	26/09/2018
		TR 201818782 T4	21/01/2019
		US 2015-0359204 A1	17/12/2015
		US 9526233 B2	27/12/2016
		WO 2014-117278 A1	07/08/2014
WO 2010-136599 A2	02/12/2010	AU 2010-252940 A1	12/01/2012
		CA 2763505 A1	02/12/2010
		CA 2763505 C	18/09/2018
		DK 2434871 T3	26/05/2014
		DK 2745682 T3	19/03/2018
		EP 2434871 A2	04/04/2012
		EP 2434871 B1	12/03/2014
		EP 2745682 A1	25/06/2014
		EP 2745682 B1	13/12/2017
		ES 2464765 T3	04/06/2014
		ES 2662579 T3	09/04/2018
		MA 33301 B1	02/05/2012
		MX 2011012740 A	06/03/2012
		PL 2745682 T3	31/07/2018
		PT 2745682 T	16/03/2018
		US 10278370 B2	07/05/2019
		US 2012-0077412 A1	29/03/2012
		US 2019-0200580 A1	04/07/2019
		WO 2010-136599 A3	20/01/2011

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2020/000009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01N 31/02(2006.01)i, A01N 63/30(2020.01)i, A01N 63/10(2020.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A01N 31/02; A01K 47/06; A01N 25/02; A01N 25/12; A01N 43/50; A01N 63/04; A01N 63/30; A01N 63/10

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 비-벡터링(bee-vectoring), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol), 바실러스 속(bacillus sp.), 식물병(plant disease)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	박홍현 등, "방울토마토 시설재배에서 비벡터링[bee-vectoring] 기술을 이용한 Bacillus subtilis 포장내 전파", 한국응용곤충학회지, 2013, 52권, 4호, 페이지 357-364 초록; 페이지 359	1-6
Y	JP 06-345607 A (CIBA GEIGY AG) 1994.12.20 단락 [0020], [0024]	1-6
A	KR 10-2015-0002663 A (비 벡터링 테크놀로지 인크.) 2015.01.07 전체 문헌	1-6
A	KR 10-2015-0121021 A (비 벡터링 테크놀로지 인크.) 2015.10.28 전체 문헌	1-6
A	WO 2010-136599 A2 (BIOBEST BELGIUM NV 등) 2010.12.02 전체 문헌	1-6

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2020년 04월 21일 (21.04.2020)	2020년 04월 21일 (21.04.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/000009

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 06-345607 A	1994/12/20	AT 140364 T	1996/08/15
		AU 6452494 A	1994/12/08
		AU 676292 B2	1997/03/06
		BG 62027 B1	1999/01/29
		BG 98819 A	1995/05/31
		BR 9402169 A	1995/05/02
		CA 2125019 A1	1994/12/05
		CH 686061 A5	1995/12/29
		CN 1071093 C	2001/09/19
		CN 1107291 A	1995/08/30
		CN 1329826 A	2002/01/09
		CZ 135894 A3	1995/01/18
		CZ 285959 B6	1999/12/15
		CZ 9401358 A3	1995/01/18
		DK 0627164 T3	1996/08/12
		DK 0627164 T4	2001/11/12
		EP 0627164 A1	1994/12/07
		EP 0627164 B1	1996/07/17
		EP 0627164 B2	2001/08/22
		ES 2089899 T3	1996/10/01
		ES 2089899 T5	2002/02/16
		GR 3020572 T3	1996/10/31
		HU 214301 B	1998/03/02
		HU T67794 A	1995/04/28
		IL 109865 A	1999/04/11
		PL 175601 B1	1999/01/29
		PL 303678 A1	1994/12/12
		RO 109268 B1	1995/01/30
		RU 2121792 C1	1998/11/20
		SG 47425 A1	1998/04/17
		SK 280213 B6	1999/10/08
		SK 67294 A3	1994/12/07
		US 5430034 A	1995/07/04
KR 10-2015-0002663 A	2015/01/07	AU 2013-232699 A1	2014/10/30
		AU 2013-232699 B2	2016/03/03
		AU 2016-203562 A1	2016/06/16
		CA 2867076 A1	2013/09/19
		CA 2867076 C	2016/09/27
		CA 2934314 A1	2013/09/19
		CL 2014002398 A1	2015/02/27
		CN 104270950 A	2015/01/07
		EP 2825049 A1	2015/01/21
		HK 1206200 A1	2016/01/08
		IL 234490 A	2014/10/30
		IL 234490 B	2017/06/29
		IN 8499DEN2014 A	2015/05/15
		JP 2015-511590 A	2015/04/20
		MX 2014011059 A	2015/05/11

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		MX 360682 B	2018/11/13
		PE 20142458 A1	2015/02/07
		PE 24582014 A1	2015/02/07
		RU 2014141060 A	2016/05/10
		RU 2653885 C2	2018/05/15
		US 2015-0023906 A1	2015/01/22
		US 2016-0213006 A1	2016/07/28
		US 9380777 B2	2016/07/05
		US 9968099 B2	2018/05/15
		WO 2013-134870 A1	2013/09/19
KR 10-2015-0121021 A	2015/10/28	CA 2899257 A1	2014/08/07
		CA 2899257 C	2017/05/09
		EP 2950640 A1	2015/12/09
		EP 2950640 B1	2018/09/12
		ES 2701814 T3	2019/02/26
		JP 2016-504916 A	2016/02/18
		JP 6396926 B2	2018/09/26
		TR 201818782 T4	2019/01/21
		US 2015-0359204 A1	2015/12/17
		US 9526233 B2	2016/12/27
		WO 2014-117278 A1	2014/08/07
WO 2010-136599 A2	2010/12/02	AU 2010-252940 A1	2012/01/12
		CA 2763505 A1	2010/12/02
		CA 2763505 C	2018/09/18
		DK 2434871 T3	2014/05/26
		DK 2745682 T3	2018/03/19
		EP 2434871 A2	2012/04/04
		EP 2434871 B1	2014/03/12
		EP 2745682 A1	2014/06/25
		EP 2745682 B1	2017/12/13
		ES 2464765 T3	2014/06/04
		ES 2662579 T3	2018/04/09
		MA 33301 B1	2012/05/02
		MX 2011012740 A	2012/03/06
		PL 2745682 T3	2018/07/31
		PT 2745682 T	2018/03/16
		US 10278370 B2	2019/05/07
		US 2012-0077412 A1	2012/03/29
		US 2019-0200580 A1	2019/07/04
		WO 2010-136599 A3	2011/01/20