(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 6 월 9 일 (09.06.2016)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2016/089166 A1

(51) 국제특허분류:
A01N 43/90 (2006.01) *A01N 63/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/013238

(22) 국제출원일: 2015 년 12 월 4 일 (04.12.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2014-0172861 2014 년 12 월 4 일 (04.12.2014) KR

(71) 출원인: **서울여자대학교 산학협력단 (SEOUL WOMEN'S UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 01797 서울시 노원구 화랑로 621 (공릉동, 서울여자대학교), Seoul (KR). **고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)** [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동 5 가), Seoul (KR).

(72) 발명자: **이동호 (LEE, Dong Ho)**; 06284 서울시 강남구 삼성로 212, 23 동 1402 호 (대치동, 은마아파트), Seoul (KR). **김재진 (KIM, Jae Jin)**; 06213 서울시 강남구 선릉로 423, 1308 호 (역삼동, 동부센트레빌아파트), Seoul (KR). **류기현 (RYU, Ki Hyun)**; 12034 경기도 남양주시 수동면 소래비로 428 번길 17-21, Gyeonggi-do (KR). **김범석 (KIM, Beom Seok)**; 04346 서울시 용산구 회나무로 32 길 45 SOD10 차 303 호 (이태원동), Seoul (KR). **류승목 (RYU, Seung Mok)**; 02574 서울시 동대문구 약령시로 12-1 301 호, Seoul (KR).

(74) 대리인: **특허법인 이지 (EZ INTERNATIONAL PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE)**; 08051 서울시 금천구 가산디지털 1 로 205 KCC 웰츠밸리 302~303 호, (가산동), Seoul (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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),

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: NOVEL ANTIVIRAL COMPOSITION, AND METHOD FOR CONTROLLING PLANT VIRUSES BY USING SAME

(54) **발명의 명칭** : 신규한 항바이러스용 조성물 및 이를 이용한 식물바이러스의 방제 방법

Position	Trichodermin(1) δ_C, type	δ_H (J in Hz)	HMBC [a]	Trichodermin(2) δ_C, type	δ_H	HMBC [a]
1	O			O		
2	78.9 CH	3.81, d(5.5)	4, 5, 11, 12	79.3 CH	3.82, d(5.5)	4, 5, 11, 12
3	36.5[b] CH_2	1.91-2.01, m	4, 5, 11, 12	36.7 CH_2	1.99, m	2, 4
		2.53, dd(8.0, 15.5)	2, 5, 12		2.54, dd(8.0, 15.5)	2, 12
4	74.9 CH	5.56, dd(3.5, 8.0)	6, 12, $CH_3\underline{C}OO$	75.0 CH	5.58, dd(3.5, 8.0)	12
5	48.8 C			49.0 C		
6	40.2 C			40.9 C		
7	24.3[b] CH_2	1.14, m	6, 8, 11	24.1 CH_2	1.48, m	6, 8, 9, 11
	CH_2	1.91-2.01, m			1.93, m	6, 8, 9,
8	27.8[b] CH_2	1.91-2.01, m		23.4 CH_2	2.09, m	7, 9
9	139.8 C			143.0 C		
10	118.6 CH	5.40, m	6, 8, 11, 16	118.6 CH	5.69, m	6
11	70.4 CH	3.60, br d(5.5)	7, 9, 10, 15	70.0 CH	3.67, br d(5.5)	9, 10
12	65.3 C			65.5 C		
13	47.6 CH_2	2.82, d(4.0)	12	47.8 CH_2	2.84, d(4.0)	12
		3.11, d(4.0)	2, 12		3.12, d(4.0)	12
14	5.6 CH_3	0.71, s	4, 5, 6, 12	5.8 CH_3	0.73, s	4, 5, 6, 12
15	15.8 CH_3	0.93, s	5, 6, 7, 11	16.0 CH_3	0.95, s	5, 6, 7, 11
16	23.0 CH_3	1.71, s	8, 9, 10			
CH_3COO	20.9 CH_3	2.07, s	$CH_3\underline{C}OO$	21.1 CH_3	2.09, s	$CH_3\underline{C}OO$
$\underline{C}H_3COO$	170.7 C			171.0 C		
$CH_2\underline{O}H$				66.2 CH_2	4.05, br d(14.0)	8, 9, 10

[a] HMBC correlation. [b] Interchangeable within the same column.

(57) **Abstract**: The present invention relates to: an antiviral composition containing, as an active ingredient, trichodermin or trichoderminol isolated from a *Trichoderma albolutescenes* strain; a composition for controlling plant viruses; and a method for controlling plant viruses by using the composition. According to the present invention, trichodermin or trichoderminol, which is a trichothecene-based compound isolated from a *Trichoderma albolutescenes* strain, has an antiviral activity against various plant viruses, and thus can be useful for controlling plant viruses. In addition, the present invention is based on a natural product, can easily mass produce an active ingredient, and can be variously applied in the agricultural fields such as in the development of an environmentally friendly control agent using a safe material inflicting no damage on plants, and in the production of high-value crops.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2016/089166 A1

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma albolutescenes*) 균주로부터 분리한 트리코더민 또는 트리코더민올을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물, 식물바이러스 방제용 조성물, 및 상기 조성물을 이용한 식물바이러스의 방제 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma albolutescenes*) 균주로부터 분리한 트리코테센 계열의 화합물인 트리코더민 또는 트리코더민올은 다양한 식물바이러스에 대한 항바이러스 활성을 가지고 있어, 식물바이러스 방제에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명은 천연물을 기반으로 한 것으로 유효성분의 대량 생산이 용이하며, 식물체에 피해를 주지 않는 안전한 물질을 이용한 환경 친화적인 방제제의 개발 및 고부가가치의 농작물 생산 등, 농업 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 신규한 항바이러스용 조성물 및 이를 이용한 식물바이러스의 방제 방법

기술분야

[1] 본 발명은 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주로부터 분리한 트리코더민 또는 트리코더민올을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물, 식물바이러스 방제용 조성물, 및 상기 조성물을 이용한 식물바이러스의 방제 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 바이러스는 숙주세포를 감염시켜 증식하는 생명체로서 숙주와 별도로 그 존재를 생각할 수 없는 생명체이다. 바이러스에는 숙주에 따라 동물바이러스, 식물바이러스, 세균바이러스, 곰팡이바이러스 등 여러 가지가 존재한다.

[3] 그 중에서 식물바이러스는 식물 세포를 감염시키는 바이러스를 총칭한다. 식물바이러스는 완전한 생명체 단위의 균류와 달리 비세포로 구성되어 있고, 효소가 없어 스스로 물질대사를 못하는 등의 비생물적 특징을 지닌다. 특히, 식물바이러스는 숙주의 세포(host cell)를 이용하여 복제하기 때문에 다양한 식물개체에게 피해를 입히며, 숙주 개체와 세포 과정(cellular process)을 공유하기 때문에 식물바이러스의 기능만을 저해하는데 어려움이 따른다(Yanmei Li et al., Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104:8083-8088, 2007). 그렇기 때문에 식물바이러스는 1890년대에 그 존재가 처음 밝혀졌음에도 불구하고, 현재까지도 발병된 식물을 포장에서 제거하거나 매개충을 방제하는 등의 물리적 또는 간접적 방제 방법이 널리 쓰이고 있을 뿐, 식물바이러스병에 대한 항바이러스제의 개발 수준은 미비한 수준이다.

[4] 최근에는 담배모자이크바이러스(tobacco mosaic virus, TMV)에 대한 항바이러스 활성을 지닌 식물유래 대사물질에 관한 연구가 이루어지고 있으며, 현재까지 소태나무(Picrasma quassioides) 유래 알칼로이드(alkaloid) 계열, 아담자(Brucea javanica) 유래 콰씨노이드(quassinoid) 계열, 금사슬나무(Cassia fistula) 유래 플라보노이드(flavonoid) 계열, 철도목(Cassia siamea) 유래 크로몬(chromone) 계열 등의 활성이 보고 되었다 (Jia Chen et al., J. Agric, Food Chem. 57:6590-9595, 2009; Xiao-Hui Yan et al., J. Agric, Food Chem. 58:1572-1577, 2010; Wei Zhao et al., Phytochem. Lett. 179-182, 2013; Qiu-Fen Hu etal., J. Nat. Prod. 75:1909-1914, 2012). 하지만 상기 물질들은 부분 병반(locallesion)만을 보이는 담배모자이크바이러스를 대상으로 항바이러스 활성을 확인한 것에 불과해 그 적용에는 한계가 있다.

[5] 이에 본 발명자들은 식물바이러스에 대한 항바이러스 활성이 우수한 신규 물질을 발굴하기 위해 연구를 거듭한 결과, 트리코더마 알불루테슨스(

Trichoderma albolutescenes) 균주로부터 트리코테센 계열의 화합물인 트리코더민 또는 트리코더민올을 분리 및 동정하였으며, 상기 화합물이 대표적인 식물바이러스인 담배모자이크바이러스뿐만 아니라 숙주 전체(systemic host)에 병징(disease symptom)을 보이는 고추모틀바이러스에 대해 우수한 항바이러스 활성을 보임을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명의 목적은 신규한 항바이러스용 조성물 및 식물바이러스 방제용 조성물을 제공하는 것이다.

[7] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 이용한 식물바이러스의 방제방법을 제공하는 것이다.

[8] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 식물바이러스 방제 활성을 갖는 농약 조성물 및 비료 첨가용 조성물을 제공하는 것이다.

[9] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결 수단

[10] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 트리코더민 또는 트리코더민올을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물을 제공한다.

[11] 또한, 본 발명은 트리코더민 또는 트리코더민올을 유효성분으로 포함하는 식물바이러스 방제용 조성물을 제공한다.

[12] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 식물체 또는 토양에 처리하는 단계;를 포함하는, 식물바이러스의 방제 방법을 제공한다.

[13] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 식물바이러스 방제 활성을 갖는 농약 조성물을 제공한다.

[14] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 식물바이러스 방제 활성을 갖는 비료 첨가용 조성물을 제공한다.

[15] 또한, 본 발명은 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주의 균체, 배양액, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 식물바이러스 방제용 조성물을 제공한다.

[16] 또한, 본 발명은 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주의 균체, 배양액, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 식물바이러스 방제용 조성물을 식물체 또는 토양에 처리하는 단계;를 포함하는, 식물바이러스의 방제 방법을 제공한다.

[17] 또한, 본 발명은 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주의 균체, 배양액, 또는 이들의 혼합물에서 트리코더민 또는 트리코더민올을 추출하는 단계를 포함하는 트리코더민 또는 트리코더민올을 생산하는 방법을 제공한다.

[18] 또한, 본 발명은 트리코더민 또는 트리코더민올을 생산하는 트리코더마 알불루테슨스 KUC2115 균주(*Trichoderma* albolutescenes KUC21115, 기탁번호 KACC93215P)을 제공한다.

발명의 효과

[19] 본 발명에 따른 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주로부터 분리한 트리코테센 계열의 화합물인 트리코더민 또는 트리코더민올은 다양한 식물바이러스에 대한 항바이러스 활성을 가지고 있어, 식물바이러스 방제에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명은 천연물을 기반으로 한 것으로 유효성분의 대량생산이 용이하며, 식물체에 피해를 주지 않는 안전한 물질을 이용한 환경 친화적인 방제제의 개발 및 고부가가치의 농작물 생산 등, 농업 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[20] 도 1은 트리코더마 알불루테슨스(*T.* albolutescens) 균주에서 분리한 트리코더민 및 트리코더민올의 NMR 스펙트럼 분석 결과를 나타낸 도이다.

[21] 도 2는 담배에서 트리코더민의 고추모틀바이러스에 대한 항바이러스 활성을 확인한 결과를 나타낸 도이다 (A: UV 사진 촬영 결과, B: RT-PCR 및 웨스턴 블랏결과, a: 50 μM, b: 10 μM, c: 5 μM, d: 1 μM, +: control, -: non-treatment,M: marker).

[22] 도 3은 담배에서 트리코더민올의 고추모틀바이러스에 대한 항바이러스 활성을 확인한 결과를 나타낸 도이다 (A: UV 사진 촬영 결과, B: RT-PCR 및 웨스턴 블랏 결과, a: 2000 μM, b: 1000 μM, c: 500 μM, d: 100 μM, +: control, -:non-treatment, M: marker).

[23] 도 4는 고추에서 트리코더민의 고추모틀바이러스에 대한 항바이러스 활성을 확인한 결과를 나타낸 도이다 (A: UV 사진 촬영 결과, B: RT-PCR 및 웨스턴 블랏 결과, a: 2000 μM, b: 1000 μM, c: 500 μM, d: 100 μM, +: control, -: nontreatment,M: marker).

[24] 도 5는 담배에서 트리코더민의 담배모자이크바이러스에 대한 항바이러스 활성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

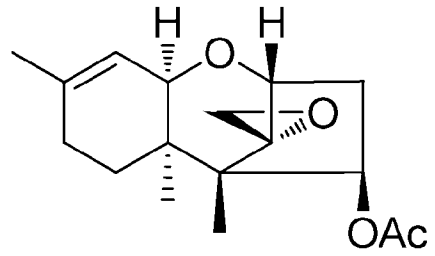
발명의 실시를 위한 최선의 형태

[25] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예들을 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명은 생략한다.

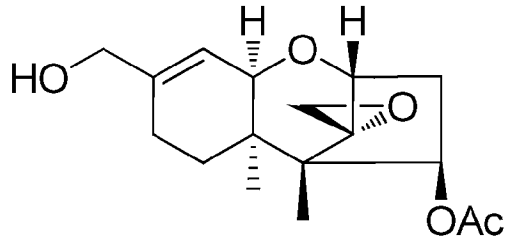
[26] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[27] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 트리코더민(Trichodermin) 또는 하기 화학식 2로 표시되는 트리코더민올(Trichoderminol)을 유효성분으로 포함하는, 항바이러스용 조성물을 제공한다.

[28] [화학식1]



[29] [화학식2]



[30] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 트리코더민(Trichodermin) 또는 상기 화학식 2로 표시되는 트리코더민올(Trichoderminol)을 유효성분으로 포함하는, 식물바이러스 방제용 조성물을 제공한다.

[31] 본 발명의 트리코더민 또는 트리코더민올은 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주로부터 분리될 수 있으며, 바람직하게는 기탁번호 KACC93215P의 트리코더마 알불루테슨스 균주로부터 분리될 수 있다. 또한, 상기 트리코더민 또는 트리코더민올은 당업계에 공지된 방법을 통해 합성될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[32] 본 발명의 식물바이러스는 담배모자이크바이러스(TMV), 고추모틀바이러스(PepMoV), 오이모자이크바이러스(CMV), 고추마일드모틀바이러스(PMMoV), 쥬키니황반모자이크바이러스(ZYMV), 수박모자이크바이러스(WMV), 호박모자이크바이러스(WMV2), 감자바이러스Y(PVY), 순무모자이크바이러스(TuMV), 메론괴저반점바이러스(MNSV), 오이녹반모자이크바이러스(CGMMV), 쥬키니녹반모자이크바이러스(ZGMMV),

[33] 감자엽권바이러스(PLRV), 나리모자이크바이러스(LMoV), 나리무병징바이러스(LSV), 오돈토그로솜링스포트바이러스(ORSV), 심비디움모자이크바이러스(CyMV), 잠두위축바이러스(BBWV), 토마토윤점바이러스(TomRSV), 담배윤점바이러스(TRSV), 토마토황화괴저바이러스(TSWV), 딸기바이러스(SMoV) 또는 선인장X바이러스(CVX)를 포함하며, 바람직하게는 담배모자이크바이러스(TMV) 또는 고추모틀바이러스(PepMoV)일 수 있으나,

이에 제한되지 않는다.

[34] 본 발명에 따른 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주로부터 분리한 트리코테센 계열의 화합물인 트리코더민 또는 트리코더민올은 다양한 식물바이러스에 대한 항바이러스 활성을 가지고 있어, 식물바이러스에 의해 발생하는 식물바이러스병의 예방 또는 치료를 위한 방제용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[35] 또한, 본 발명은 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주의 균체, 배양액, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 식물바이러스 방제용 조성물을 제공한다.

[36] 본 발명에 따른 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주의 균체, 배양액, 또는 이들의 혼합물은 다양한 식물바이러스에 대한 항바이러스 활성을 가지고 있어, 식물바이러스에 의해 발생하는 식물바이러스병의 예방 또는 치료를 위한 방제용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[37] 본 발명의 식물바이러스 방제용 조성물은 유효성분인 트리코더민 또는 트리코더민올 이외에 당업계에 공지된 항바이러스 활성을 갖는 물질을 1종 이상 더 포함할 수 있다.

[38] 본 발명의 식물바이러스 방제용 조성물은 농약분야에 공지된 다양한 형태로 제형화될 수 있으며, 제형화를 위해서는 농약분야에서 통상적으로 사용되는 제형화 방법을 어느 것이나 사용할 수 있다. 상기 조성물은 예를 들어, 액제, 입제, 분제, 유제, 오일제, 수화제 또는 도포제의 형태로 제형화될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[39] 본 발명의 식물바이러스 방제용 조성물은 제형화를 위해 다양한 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 액체 담체, 고체 담체, 계면활성제 또는 보조제 등이 포함될 수 있다.

[40] 상기 액체 담체로는 물(water), 식물유(vegetable oil), 에탄올(ethanol) 등이 사용될 수 있으며, 상기 식물유에는 대두유, 유채씨기름, 야자유, 팜핵유, 미강유, 옥수수유, 팜유, 올리브유 등이 포함되고, 이에 제한되지 않는다.

[41] 상기 고체 담체로는 광물 분말, 젤라틴, 알긴산 등이 사용될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[42] 상기 고체 담체로는 광물 분말, 젤라틴, 알긴산 등이 사용될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[43] 상기 광물 분말로는 양이온 점토(cation clay), 벤토나이트(bentonite), 카올린(kaolin), 탈크(Talc), 규조토(diatomaceous earth) 등이 사용될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[44] 상기 계면활성제로는 에틸렌옥사이드(Ethyleneoxide)계, 다이에탄올아민(Diethanolamine)계, 솔비톨(Sorbitol)계, 글리세린(Glycerine)계 등이 사용될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[45] 상기 보조제로는 증량제, 부동액, 용제, 증점제, 전착제 등이 사용될 수 있으며,

이에 제한되지 않는다.

[46] 본 발명의 식물바이러스 방제용 조성물에 포함되는 트리코더민 또는 트리코더민올의 농도는 식물체의 생육 정도, 경작지 환경, 식물바이러스병의 발병 정도 등을 고려하여 당업자에 의해 적절하게 조절할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[47] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 식물체 또는 토양에 처리하는 단계;를 포함하는, 식물바이러스의 방제 방법을 제공한다.

[48] 또한, 본 발명은 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주의 균체, 배양액, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 식물바이러스 방제용 조성물을 식물체 또는 토양에 처리하는 단계;를 포함하는, 식물바이러스의 방제 방법을 제공한다.

[49] 상기 처리 방법에는 경엽처리, 토양처리, 침지처리, 가지절단 또는 농기구소독에 적용하는 처리 방법 등이 포함될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[50] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 식물바이러스 방제 활성을 갖는 농약 조성물을 제공한다.

[51] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 식물바이러스 방제 활성을 갖는 비료 첨가용 조성물을 제공한다.

[52] 본 발명에 따른 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주로부터 분리한 트리코테센 계열의 화합물인 트리코더민 또는 트리코더민올은 다양한 식물바이러스에 대한 항바이러스 활성을 가지고 있어, 식물바이러스에 의해 발생하는 질병의 예방, 치료 또는 개선을 위한 농약, 비료 등에 첨가될 수 있다.

[53] 본 발명의 농약 조성물 또는 비료 첨가용 조성물에는 유효성분인 트리코더민 또는 트리코더민올 이외에 당업계에 공지된 일반적인 성분(예를 들어, 용매, 담체, 유화제, 분산제, 보조제 등)이 포함될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[54] 또한, 본 발명은 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주의 균체, 배양액, 또는 이들의 혼합물에서 트리코더민 또는 트리코더민올을 추출하는 단계를 포함하는 트리코더민 또는 트리코더민올을 생산하는 방법을 제공한다.

[55] 본 발명의 트리코더민 또는 트리코더민올을 추출하는 방법은 당업계의 다양한 공지의 추출 방법에 의할 수 있으며, 특별한 제한은 없다. 상세한 추출 방법의 예시는 하기 실시예에 기재되어 있다.

[56] 또한, 본 발명은 트리코더민 또는 트리코더민올을 생산하는 트리코더마 알불루테슨스 KUC2115 균주(*Trichoderma* albolutescenes KUC21115, 기탁번호 KACC93215P)을 제공한다.

[57] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이

실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[58] 실시예 1. 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma albolutescenes*) 균주의 배양 및 이의 추출물로부터 화합물의 분리

[59] 실시예 1-1. *T. albolutescens* 균주 배양 및 추출

[60] 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주는 대한민국 오대산 국립공원 토양에서 고려대학교 생명과학대학 김재진 교수에 의해 채집 및 동정되었다 (농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원정보센터, 기탁번호:KACC93215P).

[61] 상기 *T.* albolutescens 균주를 감자포도당한천배지(potato dextrose agar, PDA)에서, 28 ℃의 온도 및 암 조건에서 10일간 배양하였다. 배양된 *T. albolutescens* 균주를 2 L의 메탄올(methanol: MeOH)로 3회 추출 및 여과한 후, 진공감압농축기를 이용하여 용매를 제거하였다. 농축된 *T.* albolutescens 메탄올 추

[62] 출물을 증류수에 현탁시킨 후 에틸아세테이트(ethylacetate: EtOAc)를 이용하여 용매 분획하고, 분리된 에틸아세테이트 층을 다시 여과한 후 농축하여 최종적으로 *T. albolutescens* 에틸아세테이트 추출물 0.8 g을 수득하였다.

[63] 실시예 1-2. 화합물의 분리

[64] 실시예 1-1에서 수득한 *T.* albolutescens 에틸아세테이트 추출물 0.8 g을 역상 실리카겔(ODS-A, 12 nm, S-75 ㎛) 컬럼 크로마토그래피(3 × 58 cm)에 메탄올-증류수(MeOH:H_2O, 5:5, 8:2, 10:0) 용매 조성으로 내려 6개의 분획물(분획1~6)로 분리하였다.

[65] 상기 6개의 분획물 중 분획2(100 mg)를 순상 실리카겔(silica gel 60, 230 - 400 Mesh) 컬럼 크로마토그래피(1 × 28 cm)에 클로로포름-메탄올($CHCl_3$:MeOH, 9.8:0.2, 9.5:0.5, 9:1, 7:3) 용매 조성으로 내려, 다시 3개의 세부분획물(분획2-1~분획2-3)로 나누었다. 이 중 분획2-1(30 mg)을 순상 실리카겔(silica gel 60, 230-400 Mesh) 컬럼 크로마토그래피(1×38 cm)에 헥산-에틸아세테이트(hexane: EtOAc, 8:2, 7:3, 5:5) 용매 조성으로 내려 화합물 **2** (10 mg)를 단리하였다.

[66] 또한, 분획3(300 mg)을 순상 실리카겔(silica gel 60, 230-400 Mesh) 컬럼 크로마토그래피(1×12 cm)에 헥산-에틸아세테이트(hexane:EtOAc, 8:2, 6:4, 5:5) 용매 조성으로 내려 화합물 **1**(200 mg)을 단리하였다.

[67] 실시예 2. *T. albolutescens* 균주로부터 분리한 화합물의 구조 분석

[68] 상기 실시예 1에서 수득한 화합물 1 및 2의 구조를 분석하기 위하여 다음의 장비를 사용하여 실험을 수행하였다.

[69] 선광계(polarimeter)는 JASCO P-2000을 이용하였으며, IR 스펙트럼은 Varian 640-IR을 이용하였다. ^1H, ^{13}C, 및 2D NMR 스펙트럼은 Varian 500 MHz NMR을 이용하였고, 내부표준물질로는 TMS가 포함된 $CDCl_3$를 이용하였으며 화학적이동은 δ값으로 표현했다. 고분해능 전자분무 이온화(high-resolution

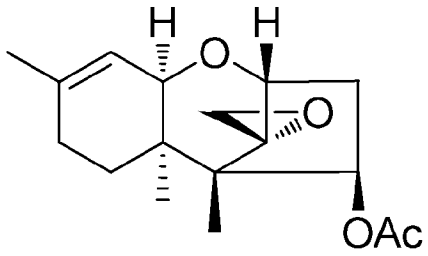
electrospray ionization: HRESI) 질량 스펙트럼은 Waters Q-TOF 질량분석기를 사용하여 측정하였다.

[70] 이상의 실험을 통하여 화합물 1을 트리코더민(화학식 1)으로, 화합물 2를 트리코더민올(화학식 2)로 동정하였다. 구체적인 실험 결과 및 화합물의 구조를 하기에 나타내었다.

[71] **Trichodermin**: 무색, 무취의 오일형태를 갖는다. 선광도를 측정한 결과 $[\alpha]^{26}_{D}$ -85.2(c 1.5, $CHCl_3$)의 수치를 얻었다. IR 스펙트럼을 측정한 결과 Vmax 값이 2963, 1730, 1436, 1373, 1240, 1078, 1029, 990cm^{-1}에서 관찰되었다. ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 분석 결과(500 MHz, $CDCl_3$)는 도 1에 나타내었다. 양성 고분해능 ESIMS에서 293.1762 $[M+H]^+$ ($C_{17}H_{25}O_4$, 293.1753로 계산)의 값을 확인하였고, 음성 ESIMS에서는 해당 이온이 나타나지 않았다.

[72] [화학식 1]

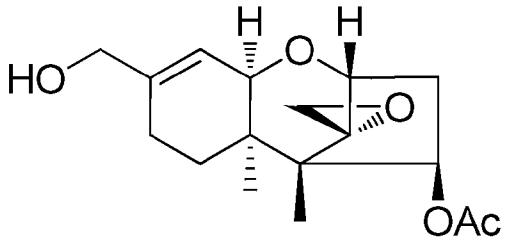
[73]



[74] **Trihocderminol**: 무색, 무취의 오일형태를 갖는다. 선광도를 측정한 결과 $[\alpha]^{26}_{D}$ -5.7(c 0.8, $CHCl_3$)의 수치를 얻었다. IR 스펙트럼을 측정한 결과 V_{max}값이 3444, 2928, 1725, 1433, 1375, 1245, 1074, 1030, 963cm^{-1}에서 관찰되었다. ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 분석 결과(500 MHz, $CDCl_3$)는 도 1에 나타내었다. 양성 ESIMS에서 309.1 $[M+H]^+$, 617.3 $[2M+H]^+$, 925.5 $[3M+H]^+$ 값이 나타났고, 고분해능 ESIMS에서 309.1694 $[M+H]^+$($C_{17}H_{25}O_5$, 309.1702로 계산)를 확인하였으며, 음성ESIMS에서는 353.1 $[M+HCOO]^-$를 확인하였다.

[75] [화학식 2]

[76]



[77] <u>실시예 3. 고추모틀바이러스에 대한 항바이러스 활성 검증</u>

[78] <u>실시예 3-1. 재료</u>

[79] 고추모틀바이러스(pepper mottle virus, PepMoV)에 대한 항바이러스 활성을 검증하기 위하여, 실험숙주식물개체로 담배(Nicotiana benthamiana)와 고추(Capsicum anuum L.)를 이용하였고, 이는 서울여자대학교 식물바이러스은행(plant virus genebank, PVGB)으로부터 제공받았다. 또한, 전신감염숙주(systemichost)내에서 항바이러스 활성을 확인하기 위하여

녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP)이 태그된 고추모틀바이러스를 이용하였다(Lee, M. Y et al., Virus Res. 155:487-494, 2011).

[80] 실시예 3-2. 담배에서 항바이러스 활성 검증

[81] 상기 실시예 2에서 수득한 화합물의 고추모틀바이러스에 대한 항바이러스 활성을 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[82] 전신감염숙주로 이용된 담배는 파종 후에 4주간 25℃가 유지되는 온실에서 배양하였다. 접종원(inoculum)으로는 고추모틀바이러스에 감염된 담배의 잎에서 녹색형광단백질이 UV 상에서 고르게 퍼져있는 잎을 채취하여 접종버퍼(0.01 M phosphate bufferd saline buffer, PBS buffer, pH 7.2)에 갈아 즙액을 만들어 사용하였다. 각 화합물의 농도별 샘플은 10% DMSO(sigma)를 포함한 PBS 버퍼에 녹여 준비하였으며 (화합물 1(트리코더민)은 50 μM, 10 μM, 5 μM, 1 μM의 농도를 사용, 화합물 2(트리코더민올)는 2000 μM, 1000 μM, 500 μM, 100 μM의 농도를 사용), 상기 화합물을 접종원인 즙액 200 ㎕와 혼합하여 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 접종하였다. 접종법으로는 4주간 배양한 담배 식물의 떡잎(cotyledon)을 포함한 하엽 4개에 카보런덤(carborundum)을 뿌린 후 접종원인 즙액과 화합물의 농도별 샘플을 혼합한 혼합액을 문질러 접종(inoculation)하였고, 최소 3 반복하였다. 대조군(control)으로는 DMSO와 접종원의 혼합액을 이용하였다. 약 2주간 UV상에서 녹색형광단백질의 유무를 통하여 고추모틀바이러스의 확산 형태를 확인하였다. 3, 6, 9, 12 dpi(days post-inoculation)에 식물체 상엽을 채취하여 UV 사진을 촬영하였고, 상기 식물체 상엽의 잎 조각에서 페놀/클로로포름 추출법을 이용하여 RNA 및 단백질을 분리한 후, 분자적 분석(RT-PCR 및 웨스턴블랏)을 수행하였다.

[83] 보다 구체적으로, RT-PCR을 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다. 먼저, 0.5 mM dNTPs, 10 pM 역방향 프라이머, 1X 반응 완충액(reaction buffer) 및 2.5 units RevertAid reverse transcriptase(Thermo scientific, USA)의 반응 혼합물에 각 RNA 샘플과 증류수를 혼합하여 20 ㎕의 양을 맞춘 후, My CyclerTM Thermal Cycler(Bio-Rad, USA)를 이용하여 42 ℃에서 60분간 반응시켜 RT 반응을 수행하였다(cDNA 생성). 그 후, 1X 반응 완충액(reaction buffer), 5 units Ex-Taq polymerase(TAKARA, Japan), 10 pM 역방향 프라이머 및 10 pM 정방향 프라이머의 반응 혼합물에 상기 RT 반응으로 합성된 cDNA 및 증류수를 혼합하여 30 ㎕의 양을 맞춘 후, My CyclerTM Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 수행하였다. [변성(denaturation) 95 ℃에서 3분 후, 95 ℃에서 30초, 58 ℃에서 30초, 72 ℃에서 60초를 총 35회 사이클 수행, PepMoV-CP 정방향 프라이머: 5'-AGC AGC TCA AGA TCA GAC AC 3', PepMoV-CP 역방향 프라이머: 5'- CAT ATT TCT GAC CCC AAG CAG -3'].상기 과정을 통해 생성된 반응물을 아가로스 겔(agarose gel)에 전기영동(electrophoresis)하고, 브로민화 에티듐(ethidium bromide, EtBr)으로 염색하여 고추모틀바이러스의 외피단백질(coat protein, CP)의 RNA coding region을 확인하였다(822 bp).

[84] 또한, 웨스턴 블랏을 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다. 먼저, 각 전체 단백질 샘플을 도데실황산나트륨-폴리아크릴아마이드 겔(sodium dodecyl sulfate (SDS)-polacrylamide gel)에 전기영동하여 분리시킨 후, 나이트로셀룰로스(nitrocellulose, NC) 멤브레인에 Mini-Pro-electrophoresis system(Bio-Rad, USA)을 이용하여 전자기 블로팅(electro blotting)과 이동(transfer)시켰다. 이동을 마친 나이트로셀룰로스 멤브레인을 TBS-T 버퍼(20 mM Tris(pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)로 3회 세척한 후, 5 % skim milk(Difco, USA)에 침지시켜 25 ℃에서 4시간동안 블락킹하였다. 고추모틀바이러스의 외피단백질의 발현을 확인하기 위하여, 상기 나이트로셀룰로스 멤브레인을 고추모틀바이러스에 대한 항체(1:1000 희석, immunoglobulin G(Ig G) fraction, 1 mg/mL)와 알칼리 포스파타아제(alkalin phosphatase, AP)에 결합(conjugated)한 2차 항체(1:7500 dilution, Promega, USA)를 이용하여 순차적으로 반응시킨 후, TBS-T 버퍼로 3회 세척하고, APsubstrate buffer(0.1 M Tris (pH 9.5), 0.1 mM NaCl, 50mN $MgCl_2$)에 침지시켰다. 최종적으로 상기 나이트로셀룰로스 멤브레인을 western blue(Promega, USA) 시약으로 염색한 후, comigrated blue marker protein과 비교하여 고추모틀바이러스의 외피단백질의 위치를 확인하였다(33 kDa).

[85] 이상의 실험 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[86] 도 2 및 도 3에 나타낸 바와 같이, 대조군에 비해 트리코더민 또는 트리코더민올을 처리한 군의 담배 상엽 샘플에서 녹색형광단백질의 관찰 시기가 늦게 나타났으며, 녹색형광단백질이 보이지 않는 담배 상엽 샘플에서는 고추모틀바이러스의 viral RNA 및 외피단백질이 나타나지 않음을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 트리코더민 또는 트리코더민올에 의해 담배에서 고추모틀바이러스의 확산 속도가 억제됨을 확인하였다.

[87] 실시예 3-3. 고추에서 항바이러스 활성 검증

[88] 상기 실시예 2에서 수득한 화합물의 고추모틀바이러스에 대한 항바이러스 활성을 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다. 숙주식물로는 가지과(Solanaceae) 식물 중 고추모틀바이러스의 주요 피해 작물인 고추를 이용하였으며, 식물 배양법, 접종원 및 접종방법은 상기 실시예 3-2와 동일하게 수행하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[89] 도 4에 나타낸 바와 같이, 대조군에 비해 트리코더민을 처리한 군의 고추 상엽에서 녹색형광단백질의 관찰 시기가 늦게 나타났으며, 녹색형광단백질이 보이지 않는 고추 상엽 샘플에서는 고추모틀바이러스의 viral RNA 및 외피단백질이 나타나지 않음을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 트리코더민에 의해 고추에서 고추모틀바이러스의 확산 속도가 억제됨을 확인하였다.

[90] 실시예 4. 담배모자이크바이러스에 대한 항바이러스 활성 검증

[91] 상기 실시예 3을 통하여 고추모틀바이러스에 대한 항바이러스 활성을 확인한 화합물의 담배모자이크바이러스(tobacco mosaic virus, TMV, 서울여자대학교

식물바이러스은행(plant virus genebank, (PVGB)으로부터 제공됨)에 대한 항바이러스 활성을 추가적으로 확인하기 위하여 반엽법(half leaf method)을 수행하였다. 반엽법은 국부감염기주인 담배(Nicotiana tabacum cv. Xanthi nc)에서 담배모자이크바이러스의 저항성 유전자에 의해 담배모자이크바이러스에 감염된 주위부에 괴사병반(local lesion)을 일으켜 검은 반점을 형성시키는 특징을 이용하는 실험이다. 보다 구체적으로, 본엽 7~8 엽기의 국부감염기주의 상위 3엽과 4엽을 절취한 후 천 위에 치상하여 카보란덤을 잎 전체에 골고루 뿌리고, DMSO에 녹인 농도별 화합물 1(트리코더민) 샘플과 담배모자이크바이러스 즙액을 혼합한 후, 이를 담배 잎의 우측 반엽에 면봉을 이용하여 접종하였다. 담배 잎의 좌측 반엽에는 담배모자이크바이러스 즙액만을 동일한 방법으로 접종하였다(대조군). 이후 담뱃잎의 엽병에 솜을 감싸고 증류수를 공급한 후 페트리접시(150 mm × 2 cm)에 치상하여 뚜껑을 닫고 23℃ 인큐베이터(공기 비순환 방식)에서 3일간 배양하였다. 배양 중에는 하루에 1회, 약 1 ml 가량의 증류수를 공급하여 담배 잎의 건조를 예방하였다. 접종 3일 후 괴사병반을 계수하였으며, 무처리한 대조군 반엽의 병반수가 100개~400개 사이의 결과만을 반영하였다. 병반의 수를 이용한 방제률은 산출된 공식(방제가(%) = [1-(약제처리 반엽 병반수 / 무처리 반엽 병반수]] X 100])을 통하여 구하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[92] 도 5에 나타낸 바와 같이, 트리코더민은 5 ppm 이상의 농도에서 약 97 %이상의 높은 담배모자이크바이러스에 대한 항바이러스 활성을 보임을 확인하였다.

[93] 이상, 본 발명의 일 실시예에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서, 구성 요소의 부가, 변경, 삭제 또는 추가 등에 의해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있을 것이며, 이 또한 본 발명의 권리 범위내에 포함된다고 할 것이다.

[94]

특허미생물 수탁증

2014년 12월 05일

김 재 진 귀하

2014년 10월 01일 제 P14-103 호로 귀하가 기탁 신청한 미생물에 대하여 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 수탁번호를 통지합니다.

다 음

1. 미생물의 명칭 : *Trichoderma albolutescens* KUC21115

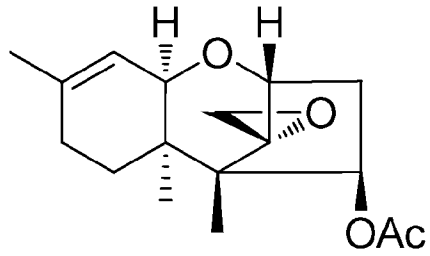
2. 미생물 수탁 번호 : KACC93215P

국립농업과학원 농업유전자원센터소장

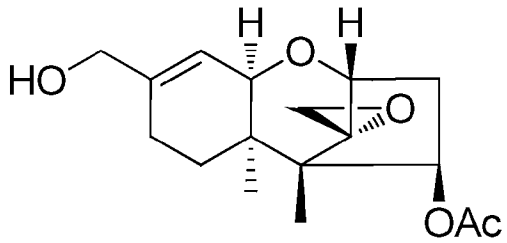
청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 트리코더민(Trichodermin) 또는 하기 화학식 2로 표시되는 트리코더민올(Trichoderminol)을 유효성분으로 포함하는, 항바이러스용 조성물.

[화학식 1]

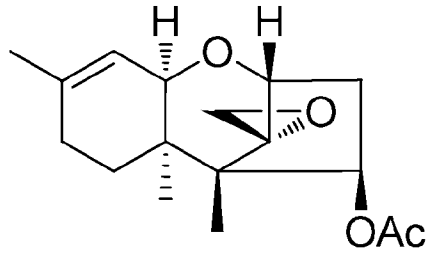


[화학식 2]

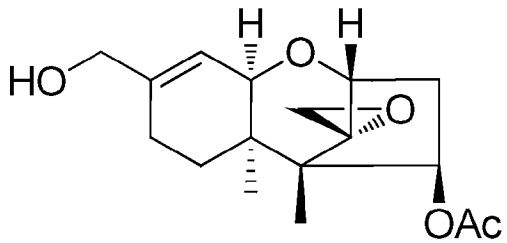


[청구항 2] 하기 화학식 1로 표시되는 트리코더민(Trichodermin) 또는 하기 화학식 2로 표시되는 트리코더민올(Trichoderminol)을 유효성분으로 포함하는, 식물바이러스 방제용 조성물.

[화학식 1]



[화학식 2]



[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 트리코더민 또는 트리코더민올은 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주로부터 분리된 것을 특징으로 하는, 식물바이러스 방제용 조성물.

[청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 식물바이러스는 담배모자이크바이러스(TMV),

고추모틀바이러스(PepMoV), 오이모자이크바이러스(CMV),
고추마일드모틀바이러스(PMMoV),
쥬키니황반모자이크바이러스(ZYMV), 수박모자이크바이러스(WMV),
호박모자이크바이러스(WMV2), 감자바이러스Y(PVY),
순무모자이크바이러스(TuMV), 메론괴저반점바이러스(MNSV),
오이녹반모자이크바이러스(CGMMV),
쥬키니녹반모자이크바이러스(ZGMMV), 감자엽권바이러스(PLRV),
나리모자이크바이러스(LMoV), 나리무병징바이러스(LSV),
오돈토그로솜링스포트바이러스(ORSV),
심비디움모자이크바이러스(CyMV), 잠두위축바이러스(BBWV),
토마토윤점바이러스(TomRSV), 담배윤점바이러스(TRSV),
토마토황화괴저바이러스(TSWV), 딸기바이러스(SMoV) 및
선인장X바이러스(CVX)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을
특징으로 하는, 식물바이러스 방제용 조성물.

[청구항 5] 제2항에 있어서, 상기 조성물은 액제, 입제, 분제, 유제, 오일제, 수화제 및 도포제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 형태로 제형화 된 것을 특징으로 하는, 식물바이러스 방제용 조성물.

[청구항 6] 제2항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 식물체 또는 토양에 처리하는 단계;를 포함하는, 식물바이러스의 방제 방법.

[청구항 7] 제2항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 식물바이러스 방제활성을 갖는 농약 조성물.

[청구항 8] 제2항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 식물바이러스 방제 활성을 갖는 비료 첨가용 조성물.

[청구항 9] 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주의 균체, 배양액, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 식물바이러스 방제용 조성물.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 식물바이러스는 담배모자이크바이러스(TMV),
고추모틀바이러스(PepMoV), 오이모자이크바이러스(CMV),
고추마일드모틀바이러스(PMMoV),쥬키니황반모자이크바이러스(ZYMV
), 수박모자이크바이러스(WMV),
호박모자이크바이러스(WMV2),감자바이러스Y(PVY),
순무모자이크바이러스(TuMV), 메론괴저반점바이러스(MNSV),
오이녹반모자이크바이러스(CGMMV),
쥬키니녹반모자이크바이러스(ZGMMV), 감자엽권바이러스(PLRV),
나리모자이크바이러스(LMoV), 나리무병징바이러스(LSV),
오돈토그로솜링스포트바이러스(ORSV),
심비디움모자이크바이러스(CyMV),잠두위축바이러스(BBWV),
토마토윤점바이러스(TomRSV),
담배윤점바이러스(TRSV),토마토황화괴저바이러스(TSWV),

딸기바이러스(SMoV) 및 선인장X바이러스(CVX)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 식물바이러스 방제용 조성물.

[청구항 11] 제9항 또는 제10항의 조성물을 식물체 또는 토양에 처리하는 단계;를 포함하는, 식물바이러스의 방제 방법.

[청구항 12] 트리코더마 알불루테슨스(*Trichoderma* albolutescenes) 균주의 균체, 배양액, 또는 이들의 혼합물에서 트리코더민 또는 트리코더민올을 추출하는 단계를 포함하는 트리코더민 또는 트리코더민올을 생산하는 방법.

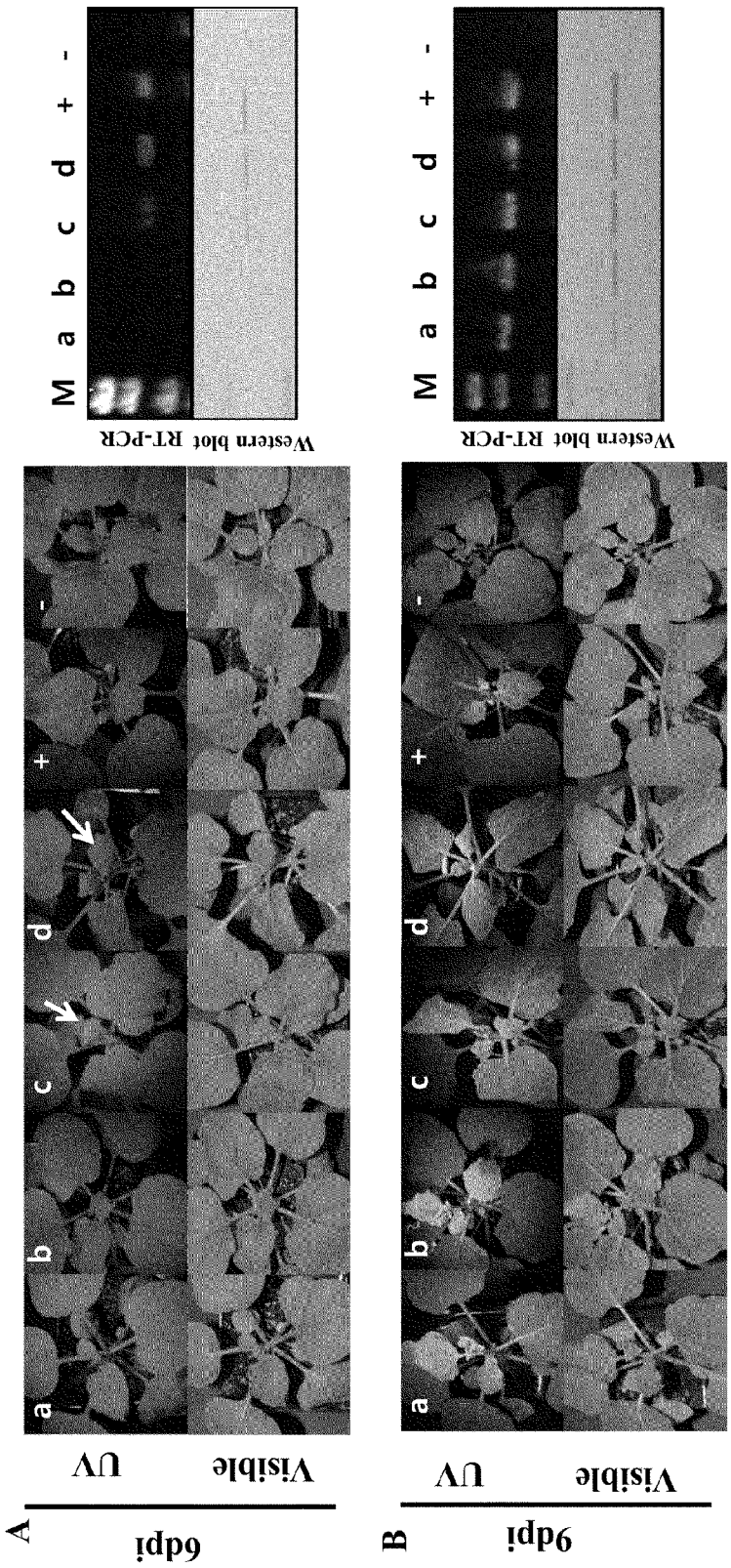
[청구항 13] 트리코더민 또는 트리코더민올을 생산하는 트리코더마 알불루테슨스 KUC2115 균주(*Trichoderma* albolutescenes KUC21115, 기탁번호 KACC93215P).

[표 1]

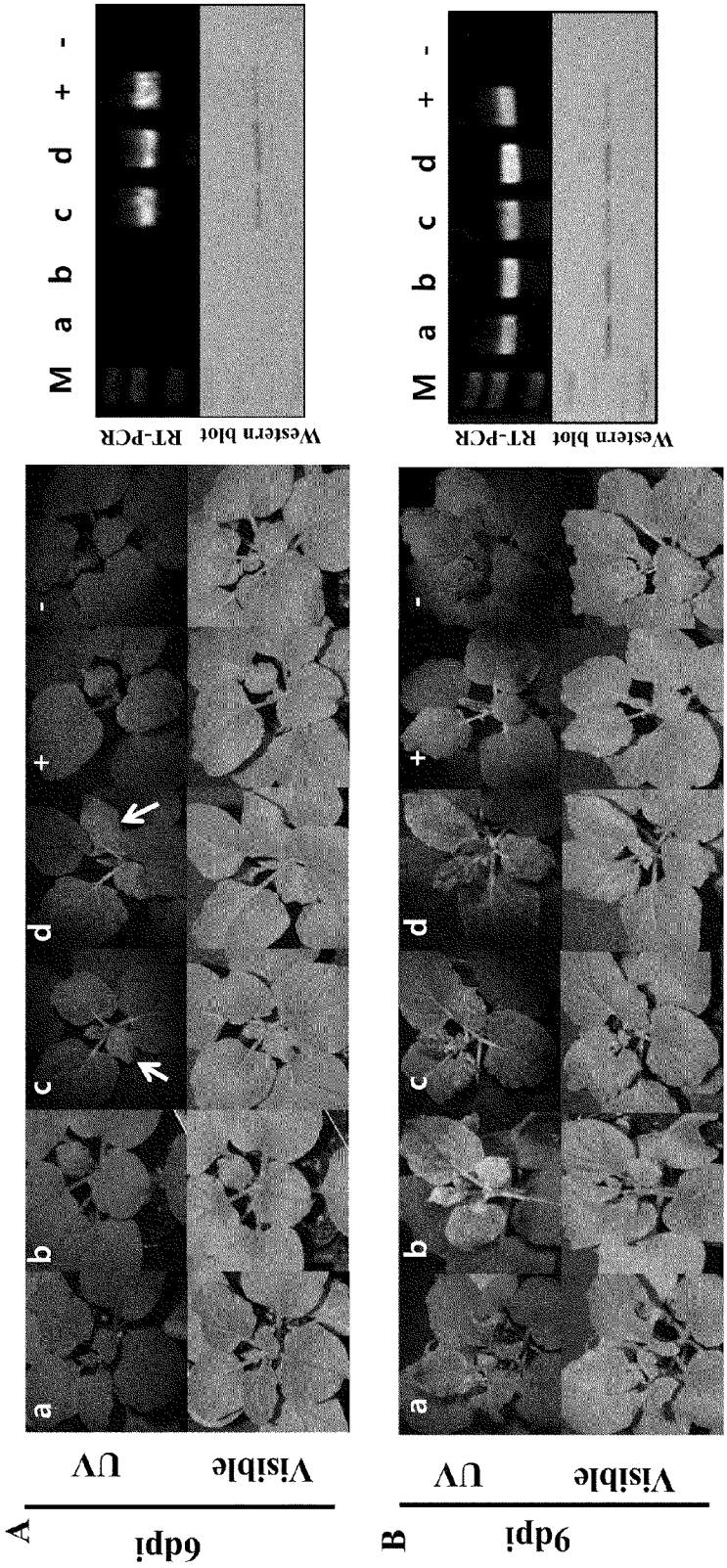
Position	Trichodermin(1)				Trichodermin(2)			
	δ_C, type		δ_H (J in Hz)	HMBC[a]	δ_C, type		δ_H	HMBC[a]
1		O				O		
2	78.9	CH	3.81, d(55)	4, 5, 11, 12	79.3	CH	3.82, d(55)	4, 5, 11, 12
3	36.5[b]	CH_2	1.91-2.01, m	4, 5, 11, 12	36.7	CH_2	1.99, m	2, 4
			2.53, dd(8.0, 15.5)	2, 5, 12			2.54, dd(8.0, 15.5)	2, 12
4	74.9	CH	5.56, dd(3.5, 8.0)	6, 12, $CH_3\underline{C}OO$	75.0	CH	5.58, dd(3.5, 8.0)	12
5	48.8	C			49.0	C		
6	40.2	C			40.9	C		
7	24.3[b]	CH_2	1.14, m	6, 8, 11	24.1	CH_2	1.48, m	6, 8, 9, 11
		CH_2	1.91-2.01, m				1.93, m	6, 8, 9,
8	27.8[b]	CH_2	1.91-2.01, m		23.4	CH_2	2.09, m	7, 9
9	139.8	C			143.0	C		
10	118.6	CH	5.40, m	6, 8, 11, 16	118.6	CH	5.69, m	6
11	70.4	CH	3.60, br d(5.5)	7, 9, 10, 15	70.0	CH	3.67, br d(5.5)	9, 10
12	65.3	C			65.5	C		
13	47.6	CH_2	2.82, d(4.0)	12	47.8	CH_2	2.84, d(4.0)	12
			3.11, d(4.0)	2, 12			3.12, d(4.0)	12
14	5.6	CH_3	0.71, s	4, 5, 6, 12	5.8	CH_3	0.73, s	4, 5, 6, 12
15	15.8	CH_3	0.93, s	5, 6, 7, 11	16.0	CH_3	0.95, s	5, 6, 7, 11
16	23.0	CH_3	1.71, s	8, 9, 10				
$CH_3\underline{C}OO$	20.9	CH_3	2.07, s	$CH_3\underline{C}OO$	21.1	CH_3	2.09, s	$CH_3\underline{C}OO$
$CH_3\underline{C}OO$	170.7	C			171.0	C		
$CH_2\underline{O}H$					66.2	CH_2	4.05, br d(14.0)	8, 9, 10

[a]HMBC correlation. [b]Interchangeable within the same column.

[도2]


A
6dpi
Visible
UV
a
b
c
d
+
-
Western blot RT-PCR
M a b c d + -
B
9dpi
Visible
UV
a
b
c
d
+
-
Western blot RT-PCR
M a b c d + -

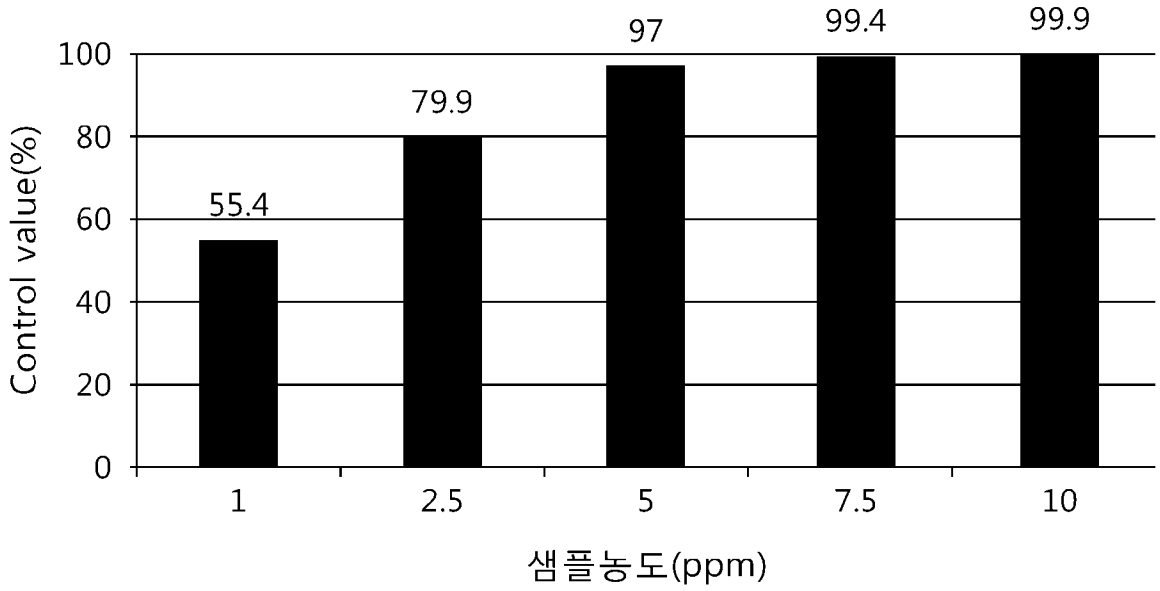
[도3]


A
6dpi
Visible
UV
a
b
c
d
+
-
RT-PCR
Western blot
M a b c d + -
B
9dpi
Visible
UV
a
b
c
d
+
-
RT-PCR
Western blot
M a b c d + -

[도4]


A
9dpi
Visible
UV
a
b
c
d
+
-
Western blot RT-PCR
M a b c d + -
B
12dpi
Visible
UV
a
b
c
d
+
-
Western blot RT-PCR
M a b c d + -

[도5]


100
80
60
40
20
0
Control value(%)
55.4
79.9
97
99.4
99.9
1
2.5
5
7.5
10
샘플농도(ppm)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/013238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 43/90(2006.01)i, A01N 63/00(2006.01)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 43/90; A01N 63/00; C12N 9/42; A01P 1/00; C12N 1/14; A01N 63/02; A01N 31/16; C07D 493/10

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: plant virus, trichodermin, trichoderminol, trichoderma albolutescenes

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101787031 A (ZHEJIANG DAYANG CHEMICAL CO., LTD.) 28 July 2010 See claims 1-2.	1-13
A	JP 2004-131422 A (BIO ORIENTED TECHNOLOGY RESEARCH ADVANCEMENT INSTITUTE et al.) 30 April 2004 See claims 1, 4.	1-13
A	CN 101429203 A (JIANDE DAYANG CHEMICAL CO., LTD.) 13 May 2009 See claims 1-2.	1-13
A	KR 10-2006-0015600 A (IDEMITSU KOSAN CO., LTD.) 17 February 2006 See claims 1, 5-6, 9.	1-13
A	JP 4883500 B2 (NATIONAL AGRICULTURE & FOOD RESEARCH ORGANIZATION) 22 February 2012 See claims 1-2.	1-13

☐ 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
14 MARCH 2016 (14.03.2016)	**14 MARCH 2016 (14.03.2016)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2015/013238

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 101787031 A	28/07/2010	CN 101787031 B	29/02/2012
JP 2004-131422 A	30/04/2004	NONE	
CN 101429203 A	13/05/2009	CN 101429203 B	11/01/2012
KR 10-2006-0015600 A	17/02/2006	CA 2526919 A1	25/11/2004
		EP 1623623 A1	08/02/2006
		US 2007-0093387 A1	26/04/2007
		WO 2004-100660 A1	25/11/2004
JP 4883500 B2	22/02/2012	JP 2007-191401 A	02/08/2007

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2015/013238

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01N 43/90(2006.01)i, A01N 63/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A01N 43/90; A01N 63/00; C12N 9/42; A01P 1/00; C12N 1/14; A01N 63/02; A01N 31/16; C07D 493/10

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: 식물바이러스, 트리코더민, 트리코더민올, 트리코더마 알불루테슨스

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CN 101787031 A (ZHEJIANG DAYANG CHEMICAL CO., LTD.) 2010.07.28 청구항 1-2 참조.	1-13
A	JP 2004-131422 A (BIO ORIENTED TECHNOLOGY RESEARCH ADVANCEMENT INSTITUTE 등) 2004.04.30 청구항 1, 4 참조.	1-13
A	CN 101429203 A (JIANDE DAYANG CHEMICAL CO., LTD.) 2009.05.13 청구항 1-2 참조.	1-13
A	KR 10-2006-0015600 A (이데미쓰 고산 가부시키가이샤) 2006.02.17 청구항 1, 5-6, 9 참조.	1-13
A	JP 4883500 B2 (NATIONAL AGRICULTURE & FOOD RESEARCH ORGANIZATION) 2012.02.22 청구항 1-2 참조.	1-13

☐ 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

"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
2016년 03월 14일 (14.03.2016)	2016년 03월 14일 (14.03.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
김승범
전화번호 +82-42-481-3371

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/013238

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 101787031 A	2010/07/28	CN 101787031 B	2012/02/29
JP 2004-131422 A	2004/04/30	없음	
CN 101429203 A	2009/05/13	CN 101429203 B	2012/01/11
KR 10-2006-0015600 A	2006/02/17	CA 2526919 A1	2004/11/25
		EP 1623623 A1	2006/02/08
		US 2007-0093387 A1	2007/04/26
		WO 2004-100660 A1	2004/11/25
JP 4883500 B2	2012/02/22	JP 2007-191401 A	2007/08/02