ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE
---

(19)

المملكة المغربية

المكتب المغربي للملكية الصناعية و التجارية
---

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication :
MA 39024 A1

(43) Date de publication :
30.09.2019

(51) Cl. internationale :
A01N 63/00; A01N 63/02; C07K 7/56; C12R 1/125; C12R 1/125; A01N 63/02; C07K 7/06; C12N 1/20; A01N 63/00

(21) N° Dépôt :
39024

(22) Date de Dépôt :
07.11.2014

(30) Données de Priorité :
08.11.2013 EP 13192134.8

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:
PCT/EP2014/074061 07.11.2014

(71) Demandeur(s) :
SYMBORG S.L., Campus de Espinardo nº 7, Edificio CEEIM E-30100 Murcia (ES)

(72) Inventeur(s) :
FERNANDEZ MARTIN, Felix ; VICENTE SANCHEZ, Javier ; BERNABÉ GARCÍA, Antonio José ; TORRECILLAS SANCHEZ, Alejandro

(74) Mandataire :
SMAS INTELLECTUAL PROPERTY

(54) Titre : **SOUCHE DE BACILLUS SUBTILIS DÉPOSÉE SOUS LE NUMÉRO DE DÉPÔT CECT 8258 ET PROCÉDÉ DE PROTECTION OU DE TRAITEMENT DE PLANTES**

(57) Abrégé : L'invention concerne une souche de Bacillus subtilis déposée sous le numéro de dépôt CECT 8258 et un procédé de protection ou de traitement de plantes, de parties de plantes, de racines de plantes ou de graines de plantes d'infestations fongiques et bactériennes, comprenant l'application d'une composition comprenant la souche de Bacillus subtilis déposée sous le numéro de dépôt CECT 8258 ou d'un surnageant obtenu à partir d'une culture de la souche de Bacillus subtilis déposée sous le numéro de dépôt CECT 8258 ou d'un extrait isolé de la souche de Bacillus subtilis déposée sous le numéro de dépôt CECT 8258 auxdites plantes, parties de plantes, racines de plantes ou graines de plantes.

سلسلة للعصوية الرقيقة مودعة برقم ايداع 8258 وفقاً لمجموعة المستنبتات الاسبانية (CECT) وطريقة لحماية أو معالجة النبات

الملخص

يتعلق الاختراع الراهن بسلالة للعصوية الرقيقة مودعة برقم ايداع 8258 وفقاً لمجموعة المستنبتات الاسبانية (CECT) وطريقة لحماية أو معالجة النبات، اجزاء النبات، جذور النبات أو بذور النبات من العدوات الفطرية والبكتيرية، حيث تشمل الطريقة وضع تركيب يشتمل على سلالة العصوية الرقيقة المودعة برقم الايداع 8258 وفقاً لـ CECT أو مادة طافية حصل عليها من مستنبت لسلالة العصوية الرقيقة المودعة برقم الايداع 8258 وفقاً لـ CECT أو خلاصة تم فصلها من سلالة العصوية الرقيقة المودعة برقم الايداع 8258 وفقاً لـ CECT على النبات، اجزاء النبات، جذور النبات أو بذور النبات المذكورة.

سلالة للعصوية الرقيقة مودعة برقم ايداع 8258 وفقاً لمجموعة المستنبتات الاسبانية (CECT) وطريقة لحماية النبات

مجال الاختراع

يقع الاختراع الراهن في مجال مبيدات آفات حيوية واكثر تحديداً، يتعلق الاختراع بسلالة حديثة لمجموعة مستنبتات اسبانية 8258 لعصوية رقيقة تثبط مدى امراض فطرية وبكتيرية للنبات. يتعلق الاختراع ايضاً بميد فطريات وتراكيب بكتيرية تشمل هذه السلالة العصوية الرقيقة الحديثة والمستقلبات، افرادياً وفي توليفة، منتجة بهذه السلالة، اما منفردة أو في توليفة مع مبيدات آفات كيماوية وحيوية.

خلفية الاختراع

لفترة من الزمن، عُرف أن متعضيات مجهرية معينة تمتلك فعالية حيوية مفيدة في التحكم بأمراض النبات. وفي حين أجريت عمليات لتعيين وتنمية مبيدات آفات حيوية، تواصل معظم مبيدات الآفات المستخدمة كونها مركبات صنعية. يشمل العديد منها مضاعفات جانبية لمتعضيات غير مستهدفة، البيئة، مستخدمي هذه المبيدات، بالاضافة إلى ركازات مبيد آفات في الطعام يتجنبة العديد من المستهلكين.

يقدم التحكم الحيوي بديلاً جذاباً لمبيدات الفطريات الكيماوية الصنعية. يمكن ان تكون مبيدات آفات حيوية اكثر أماناً للبيئة والمستخدمين، تتحلل بسرعة كبيرة، ولا تنتج ركازات كيماوية على المحاصيل المعالجة. مبيدات الآفات الحيوية المطورة من متعضيات صغرية مفيدة جداً لبرامج إدارة وباء متكامل وعلى شكل عُدة لمقاومة تطور وباء لكيماويات صنعية. بالاضافة إلى ذلك، يمكن تطوير مبيدات آفات حيوية في فترة زمنية قصيرة بكلفة أقل من مبيدات آفات صنعية.

لبعض الوقت، عُرف ان بعض البكتيريا في مستنبتات في ظروف مناسبة تتيح مستقلبات سامة للنبات مثل حمض لكتيك وخليك، سيانيد، ومضادات حيوية. يعتمد المستقلب المنتج على الظروف البيئية الموجودة البكتيريا فيها. لذا، تعتمد مستقلبات ثانوية منتجة ببكتيريا على البيئة ومتاحية متراكب انزيم معين.

المستقلبات الثانوية نواتج ثانوية لمستقلبات اولية ورغم انها غير ضرورية للبكتيريا، قد تولد بعض فوائد لضمان بقائها. تشمل البكتيريا صنع مستقبلها الثانوي متأثراً بظروف بيئية.

عيَّنت برامج تصنيف سلالات انواع عصيات معينة تُظهر فعالية مضاد فطري، بُيِّن ان هذه السلالات تنتج زْوِيتَّرْميسين-A و/أو كانوسامين، مركبين مضادين حيويين فعالين ضد انحلال بادرات مرض تحمله التربة، ناتج عن جزيئات فيتوفثورا أو سْكِلروتينا ماينور.

تصف براءة اختراع امريكية رقم 5049375 لهاندلزمان ومعاونية كيف يخفض رزترميسين-A انحلال بادرات في الفضة وفول الصويا. سبَّب تغليف البذور بـ B. Cereus ATCC 53522 تخفيض العدوى بفطر انحلال البادرات. بالاضافة إلى ذلك، بُيِّن ان استخدام تركيبة اساسها بوغ مشتقة من سلالات B. Cereus لكل من بذور فول الصويا أو التربة المحيطة بهم يحسِّن انتاج فول الصويا في دراسات حقلية. طرق استخدام مبيدات آفات حيوية معروفة في التقنية وتحوي مساحيق مبتلَّة، منسابات جافة، تغليفاً صغرياً للعوامل الفعالة، تركيبات سائلة أو صلبة لأجزاء المضاد الحيوي من مستنبتات (أو زرعات) (براءة اختراع امريكية رقم 5061495 لروسَّال أو براءة اختراع امريكية رقم 5049379 لهاندلزمان).

العصوية الرقيقة عبارة عن بكتيريا مضادة تعمل من خلال انتاج مواد مضادة بالاضافة إلى تطفل ومنافسة في الحيز والمغذيات. تشمل عموماً متعضيات صغرية تؤثر عبر مواد مضادة طيف تأثير واسع، خاصة تثبيط فطري، هذه الطريقة اكثر فعالية من تقنيات تأثير اخرى مضادة للفطر.

بُيِّن ان فعالية فطر التربة Pythium Aphanidermatum، الذي يسبب تسرب (تعفن مائي) خيار قطني، يمكن تثبيطها باستخدام زوترميسين ينتج B. Cereus strain UW85 . بُلِّغ انتاج مواد مضادة anti-botrytis و anti-alternaria بسلالتين عصويتين B. subtilis CL27 و B. pumilus CL 45. اظهر اختبار في الزجاج كلاً من المحلول الكامل والرشاحات الخالية من خلايا فعالة ضد Botrytis و Alternari . تبين براءة اختراع امريكية رقم 5597565 لليفرت ومعاونية ان B. subtilis، B. pumilus و B. polymyxa فعالة في تثبيط فطريات مسببة لمرض محصول لاحق. وتبين ايضاً لكن لا تعيِّن وجود مواد مضادة ناتجة في راشح استنبات خال من خلايا وفعاليتها.

تبين براءة اختراع امريكية رقم 5344647 لروسّال سلالات B. subtilis مع نشاط واسع مضاد للفطريات. بين باحثون عديدون في التقنية استخدام انواع عصوية ورقيقات عصوية، خاصة عوامل تحكم حيوي لكائن ممرض فطري للنبات، بما يشمل استخدام ضبط عفن فاكهة حصاد لاحق. تبين براءة اختراع امريكية رقم 5047239 لبوسي استخدام B. subtilis B-3 لتثبيط عفن بني احمر، رمادي، واحمر داكناً (يقطف مقدماً)، تفاح (يقطف لاحقاً)، وعنب (يقطف لاحقاً). تبين براءة اختراع امريكية رقم 5780080 لليفرت ومعاونية استخدام B. subtilis NCIMB 40491

لتثبيط نمو متعضيات مرض قطف لاحق يسبب فطريات Botrytis cinerea و Alternaria brassicicola في ملفوف (نبات). تبين براءة اختراع امريكية لهاينز ومعاونية B. subtilis AQ713 يثبط فعالية فعل مبيد حشري، مضاد فطري ومضاد بكتيري. تناقش ايضاً المركبات المضادة للبكتيريا والمضاد للفطر الناتجة عن هذه السلالة. تبين براءة اختراع امريكية رقم 6245551 لليمان ومعاونية سلالة Bacillus pumilus حديثة تُظهر فعالية مضادة للفطر لكن ليست فعالية مضادة للبكتيريا.

تبين براءة اختراع امريكية لليو ومعاونية Bacillus megaterium ATCC 55000 وطريقة لضبط الممرض الفطري للنبات Rhizoctonia solani. بين في الزجاج تضاد B. megaterium مع Drechslera oryzae، Alternaria alternate ، و Fusarium roseum كان أكثر المكونات فعالية في رشاحة الاستنبات جزءاً خاصاً ذواباً في ماء وميثانول من مضاد حيوي ثبت انه بيتيد شحمي يشبه متعدد اكسين.

جزيئات العصويات معروفة منذ زمن انها تنتج متعضيات ثانوية مضادة للفطر والبكتيريا. تم تحديد المركب المبيد للفطريات روترميسين-A والمركب كانوسامين الناتج عن جزيئات عصويات Bacillus sp في التقنية السابقة.

مجموعة اخرى من متعضيات عصوية هي ببتيدات شحمية حلقية من صنف إتورين، بعضها عوامل فعالة مبيدة للفطريات. ذكر ان نمط تأثير هذه الببتيدات الشحمية بسبب التفاعلات مع اغشية مبيدة للفطريات، مكونة قنوات خارج الغشاء تسمح بتحرير أيونات حيوية.

دُرست علاقة البنية/الفعالية للإتورينات بصنع عدد من نظائر تختلف في طول سلسلة الحمض الاميني. زادت فعالية الاتورينات مع طول السلسلة الجانبية للحمض الدهني والتفرع الطرفي (Bland et al., "Iturin-A, an antifungal peptide produced by Bacillus subtilis" Proc. Plant Growth Regulation Soc. Am. 22:102-107 (1995)).

مجموعة اخرى من ببتيدات شحمية مفصولة من B. cereus هي plipastatins. عُينت هذه المركبات في الاصل في دراسة مثبطات فسفولیباز بنكرياس خنزيري A2، لكن بحثاً حديثاً وجد انها تثبط ايضاً فطريات ممرضة للنبات بما يشمل Botrytis Pyricularia Alternaria (Yamada et al., "Biological activity of antifungal substances produced by Bacillus subtilis" J. Pesticide Sci. 15(1):95-96 (1990)). ذكر يامادا ايضاً تأثيرات تعاونية مرصودة بين إثورين-A والبليباستاتينات، المنتجين بنفس سلالة للعصوية الرقيقة.

ببتيد شحمي حلقي منتج بعصوية رقيقة هو سرفاكيتن الذي يمتلك فعالية سطحية استثنائية. ينتج المتعضي الصغرى الحديث B. subtilis AQ713 اتورينات A، بلباستاتينات وسرفاكتينات. انتاج هذه التوليفة من ببتيدات شحمية هو مفتاح استخدامها على شكل عامل تحكم حيوي.

Sclerotinia sclerotiorum فطر تربة هام ممرِّض للنبات يسبب خسارة اقتصادية في الخس، البطاطا، الحبوب وعدد كبير من محاصيل اخرى هامة. تتفاوت اشارات واعراض ناتجة عن S. sclerotiorum اعتماداً على المضيف. مع ذلك، الاشارة الواضحة جداً هي نمو أفاطير زغبية بيضاء تنتج فيما بعد سكلروتيا. ينقل الفطر المرض وينتج أفطورة على قاعدة النبات تتحرك اخيراً إلى اعلى الجذع مؤدية إلى عفنه، سكلروتيا عبارة عن كتلة متماسكة من افطورة فطرية مقسّاه تحوي احتياطيات طعامية، وأحد ادوارها ان تبقى حيّة في بيئة صعبة، متحكمة لتحدي هذا المرض.

في غياب تحكم، يمكن ان تسبب سكلروتينيا خسارة لا تقل عن 60٪ تحت ظروف مناسبة للمرض، ضبط واستئصال الممرض صعب لان سكلروتيا تبقى حية في التربة لسنوات في غياب أي مضيف أو ظروف مناسبة للنمو. شملت طرق التحكم الكيماوية الاولية تدخين التربة. لكن هذه المركبات (مثل بروميد مثيل) تكون تحت ضغط نظامي مفرط بسبب سميته العالية والتأثيرات المعادية المحتملة للبيئة والمتعضيات غير المستهدفة. ذكر انه حتى مع استخدام طرق تحكم فعالة، قد تبقى سكلروتيا كافية لتسبب مرضاً. اظهرت دراسات لتقييم احتمالية انواع عصوية لسكلروتينيا ان النتائج تعتمد كثيراً على نضحات الجذر الناتجة عن مضيف النبات.

وصف الاختراع

يشمل المصطلح "بكتيريا" أو "بكتيرية" أي متعض بدائي النواة لا يحوي نواة مميزة.

يشمل المصطلح "فطرة" أو "فطر" مجموعة منوعة واسعة من متعضيات تحمل بوغاً منوّى تخلو من الكلوروفيل. تشمل امثلتها خميرة، افاطيرة صغيرة، نوعاً من الفطر، صدأ وكمأه.

"مبيد الفطر" يعني مقدرة مادة على زيادة في معدل وفاة أو تثبيط معدل نمو فطريات.

"مادة مضادة" تشمل أي مادة قادرة على قتل أو تثبيط متعض صغري. قد تنتج مواد مضادة بمتعض صغري أو عملية صنعية أو عملية شبة صنعية. يشمل المصطلح مواداً تثبط أو تقتل فطريات مثل زوترميسين-A أو كانومسامين.

يشمل "مضاد الفطور" مادة قادرة على قتل أو تثبيط نمو فطريات.

يشمل "مضاد بكتيريا" أي مادة قادرة على قتل أو تثبيط نمو بكتيريا.

يشير مصطلح "زرْع" إلى انتشار متعضيات على أو في اوساط مختلفة الانواع.

يشير "استنبات مرق زرعي كامل" إلى استنبات سائل يحوي كلاً من خلايا اوساط.

يشير "عائم" إلى مرق زرعي سائل باقٍ عندما تُزال خلايا نامية في المرق الزرعي بانتباذ، ترشيح، ترسيب أو وسيلة اخرى معروفة في التقنية.

يشمل المصطلح "مذيب" أي سائل يحوي مادة اخرى في المحلول. يشير "مذيب قابل للاستخلاص" إلى أي مركب يذوب في مذيب يُفصل بعد ذلك من المذيب.

تجسيد مفضل للاختراع هو سلالة لعصوية رقيقة مودعة بتاريخ 2012/12/18 وفقاً لمجموعة المستنبتات الاسبانية، موضوعة على Parc Cientific Universitat de Valéncia, Catedr6tico Agustin Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia, Spain) by the depositor Symborg, S.L., sited at Edificio Ceeim, Campus Universitario, S/N, 30100 Murcia (Spain)).

عُينت سلالة للعصوية رقيقة من قبل المودع بالاشارة إلى SB0003، واستقبلت رقم قبول CECT: CECT number 8258 بعد اعلان سلطة الايداع الدولية السلالة على شكل عيوش.

عُينت السلالة بناءً على استخدام تمييز جزيئي، دراسة فسيولوجية وبروتينية. بيَّن رصد مجهري ان السلالة مكونة من عصيات ايجابية الغرام، قادرة على تبوُّغ، لذا تنتمي إلى نوع العصوية. بُذرت العينة باستخدام اوساط سائلة وصلبة مختلفة، حيث حصل النمو بعد حضن بين 30 و 37°م. ثم أُخضعت مستعمرات مفصولة للسلالات لاختبارات كيماوية حيوية، نتائجها مجدولة في الجدول ادناه. اجري تمييز اكثر شمولاً لـ CECT 8258 بواسطة CECT.

مفصولة مقدمة على شكل: سلالة انواع عصوية SB0003.

تعيين ناتج فصل: باستخدام اشرطة API، بشكل خاص API 50CHE، متبعاً تعليمات الصناع التي تنصح باستخدام جاليري 20E لتكملة جاليري API 50CH، وحضن عند 37°م. اخذت قراءات باتباع حضن 24 و 48 ساعة عند درجة حرارة النمو المثالية للسلالة تحت ظروف هوائية.

الشكل الخلوي: وجدت الخلايا المتحركة افرادية، مع بوغين داخليين مشكلين على منطقة شبة طرفية. وسمت الخلايا بشكل منتظم "غرام ايجابي".

شكل المستعمرة: المستعمرات معتمة وكلها بارتفاع محدب منخفض، لامعة ومظهر ناعم، الحواف بيضاء ومنتظمة.

الجدول 1 نتائج جاليري API 50CHE:

عصيات	+	مستعمرة بالكامل	+
عصيات مستقيمة	+	مستعمرة مشرشرة	–
عصيات منحنية	–	مستعمرة مفصصة	–

خلية إفرادية	+	مستعمرة دائرية	–
اطراف مستدقة	–	مستعمرة غير منتظمة	–
اطراف مدورة	+	مستعمرة جذرانية	–
اطراف مربعة	–	مستعمرة قليلة التحدب	+
بوغ داخلي مشكل	+	مستعمرة عالية التحدب	–
مباغ منتفخ	–	مستعمرة منبسطة	–
بوغ واحد/خلية	–	مستعمرة مرفوعة	–
بوغ مستدير	–	مستعمرة متألقة	+
بوغ اسطواني	+	مستعمرة كليلة	–
بوغ إهليلجي	–	مستعمرة جافة	–
Spore central	–	Colony smooth	+
Spore terminal	–	Colony rough	–
Spore subterminal	+	Catalase	+
Gram positive	+	Insoluble Brown pigment	–
Gram negative	–	Insoluble Black pigment	–
Gram variable	–	Insoluble yellow pigment	–
Gram stained	+	Insoluble orange pigment	–
Vacuoles present	–	Insoluble red pigment	–
Colony translucent	–	Soluble Brown pigment	–
Colony Transparent	–	Soluble Black pigment	–
Cells motile	+	Soluble yellow pigment	–
Growth at 150 C	+	Oxidase	+
Growth at 260 C	+	Aerobe	+
Growth at 300 C	+	Facultative	–
Growth at 370 C	+	Microaerophile	+
Growth at 450 C	+	Anaerobe	–
Growth at 500 C	+	Growth at pH 4.5	+
Growth at 550 C	–	Growth at pH 6.5	+
Growth at 550 C	–	Growth at pH 9	+
Growth at 600 C	–	Growth at 2 % NaCI	+
Starch Hidrolysis	+	Growth at 5 % NaCI	+
Colony opaque	+	Growth at 10 % NaCI	+

جدول 2- نتائج جاليري API 20E

48 ساعة	24 ساعة	وظيفة انزيم	مادة اساس	انبوب
+	+	13-galactosidase	2-nitro-feni1-8D غلاكتوسيداز	ONPG
-	-	Arginine dihidrolase	L-arginine	ADH
-	-	Lysine decarboxylase	L-lysine	LDC
-	-	Ornithine decarboxylase	L-ornithine	DC
+	d	Citrate utilization	Trisodium Citrate	CIT
-	-	H2S Production	Sodium thiosulfate	H2S
-	-	Urease	Urea	URE
-	-	Tryptophane deaminase	L- Tryptophane	TDA
-	-	Indole Production	L- Tryptophane	IND
+	-	Acetoine Production	Sodium piruvate	VP
+	+	Gelatinase	Bovine gelatine	GEL
-	+	Oxidation/Fermentation	D-Glucose	GLU

حدد تحليل اضافي للبروتينات وفقاً للبروتوكول الموصى به من قبل Bruker Daltroniks باستخلاص ايثانول/حمض فورميك. اظهر مخطط الطيف علاقة وثيقة بين هذه السلالة وسلالات للعصوية الرقيقة المعروفة.

اخيراً- أكمل التسلسل الوراثي لسلالة العصوية الرقيقة CECT 8258، وجد انها تطابق أكبر من 99٪ من التشابه مع اكثر من 40 سلالة عصوية رقيقة مختلفة. بناءً على هذا التحليل، استنتج ان سلالة CECT 8258 عضو عصوية رقيقة. بالاضافة إلى ذلك، بصمة الببتيد لسلالة CECT 8258 إلى رَحَلان كهربائي 2D تختلف من انواع اخرى بالنسبة إلى محتوى البروتين الموجود في بنك بيانات NCBI.

بناءً على جميع البيانات الفسيولوجية والكيماوية الحيوية المتوفرة، تشابه السلالة CECT 8258 بشكل وثيق عصوية رقيقة.

في مظهر آخر، يشمل الاختراع طريقة لحماية أو معالجة نباتات، اجزاء نباتية، جذور نباتية أو بذور نباتية من اجتياحات فطرية وبكتيرية، تشمل استخدام:

مركب يشمل سلالة للعصوية الرقيقة مودعة برقم ايداع CECT 8258.

مادة طافية يحصل عليها من استنبات سلالة للعصوية الرقيقة مودعة برقم ايداع CECT 8258.

إلى النباتات المذكورة، اجزاء نبات، جذور نبات أو بذور نبات.

مرفقاً بهذا طريقة الاختراع.

تجسيد خاص عبارة عن طريقة الاختراع، حيث الاحتياجات الفطرية المذكورة تنتج عن عدد من عائلة سكليروتنياسي.

تجسيد خاص عبارة عن طريقة الاختراع، حيث الاحتياجات الفطرية أو البكتيرية المذكورة ناتجة عن فطريات أو بكتيريا مختارة من المجموعة المكونة من قبل Erwinia amylovora, Macrophomina phaseolina and Botrytis cinerea.

تجسيد مفضل عبارة عن طريقة الاختراع، حيث الاحتياجات الفطرية المذكورة ناتجة عن ممرضات فطريقة ورقية تهاجم ورق النبات.

تجسيد معين عبارة عن طريقة الاختراع، حيث الاحتياجات الفطرية المذكورة ناتجة عن فطريات فطرية للتربة تهاجم جذور النبات.

يمكن دمج سلالات الاختراع مع مبيدات حشرات معروفة اخرى. هكذا، تجسيد خاص عبارة عن طريقة الاختراع، حيث مبيد حشرات حيوي أو كيماوي يستخدم ايضاً مع النبات المذكور، اجزاء النبات، جذور النبات أو بذور النبات.

تجسيد خاص عبارة عن طريقة الاختراع، حيث سلالة للعصوية الرقيقة مودعة برقم ايداع CECT 8258 تستخدم على شكل مسحوق مبلل، حبيبات، معلقات مائية، نواتج تركيز قابلة للاستحلاب ومعلقات مائية، تركيبات مناسبة اخرى معروفة لدى اولئك المتمرسين في التقنية.

شرح مختصر للرسوم

الشكل 1: يمثل التأثير المقدر على نباتات خس معالجة وغير معالجة مع 70 يوماً بمبيد فطر حيوي لمعالجة شافية.

الشكل 2: يمثل التأثير المقدر على نباتات خس معالجة وغير معالجة مع 70 يوماً بمبيد فطر حيوي لمعالجة وقائية.

الشكل 3: يمثل تأثير سلالة للعصوية الرقيقة وفقاً لمجموعة المستنبتات الاسبانية على تطوير مرض إروينيا أميلوفورا في دراسة بعد معالجة ورق وتربة.

أمثلة الاختراع

مثال 1-: فعالية في الزجاج للعصوية الرقيقة وفقاً لمجموعة المستنبتات الاسبانية ضد سكلروتينيا سكاروتيوم وماكروفومينا فيزولينا.

طُوِّر معلق بكتيري لسلالة CECT 8258 في وسط استنبات وعوير بفوتومتر طيفي (A = 1.002 عند $\lambda = 623$) لاستنبات 24 و 48 ساعة. بهدف تقييم مستقلبات مفرزة بوسط الاستنبات البكتيري، عُقمت محاليل من اوقات مختارة لفترة 40 دقيقة عند 120°م، متأكدين بذلك من إزالة كاملة لخلايا وأبواغ نباتية ميكروبية.

لتقييم الفعالية التثبيطية للمستقبلات ضد سكاروتينيا وماكروفومينا اختبرت 4 تركيزات لمستقبلات في الأوساط (صفر٪ (ضابط)، 5٪، 15٪، 20٪) عند 24 ساعة و 48 ساعة استنبات في وسط أغارد كستروز بطاطا (PDA). وُضعت اقراص غزل فطري (5 ملم قطراً) في مركز لوح سكلروتينيا سكروتيوم وماكروفوميا فيزيولفيا وحضنتْ في حجرة باردة عند 20°م للأول، و 30°م للثاني. قيم نمو الغزل الفطري عند 24، 48 و 72 ساعة حضن.

الجدول 3- فعالية بيولوجية لمستقبلات سلالات CECT 8258 على تطور استعمار فطري لسكلروتينيا سكلروتيوم على صحاف بتري (أو أطباق بتري).

مستقبلات من 24 ساعة تخمير			
معالجات	قطر (24 ساعة) ملم	قطر (48 ساعة) ملم	قطر (72 ساعة) ملم
ضابط	a 7,5	a 17,75	a28,8
٪5	a 7,6	a 15,5	b 20,3
٪15	b 15,41	b 13,75	c 18,6
٪20	b 5	c 11,25	d 12,3
Es x	*0,2	**0,3	*0,5
مستقبلات من 48 ساعة تخمير			
معالجات	قطر (24 ساعة) ملم	قطر (48 ساعة) ملم	قطر (72 ساعة) ملم
ضابط	a 7,5	a 17,75	a 30,4
٪5	b 5	a 15,5	b 18,6
٪15	b 5	c 9,25	c 11,2
٪20	b 5	c 9,25	c 10,4
Es x	**0,3	*0,4	**0,4

جدول 4- فعالية حيوية لمستقبلات سلالات CECT 8258 على تطوير استعمار فطري لماكروفومينا فيزيولينا على صحاف بتري

مستقبلات من 24 ساعة تخمير			
معالجات	قطر (24 ساعة) ملم	قطر (48 ساعة) ملم	قطر (72 ساعة) ملم
ضابط	a 11,25	a 24,5	a 33,6
٪5	a 7,7	b 20	b 21,3
٪15	b 7,625	b 21	b 23
٪20	b 8	c 16,25	c 19,5
Es x	*0,45	*0,5	**0,9
مستقبلات من 48 ساعة تخمير			

معالجات	قطر (24 ساعة) ملم	قطر (48 ساعة) ملم	قطر (72 ساعة) ملم
ضابط	a 11,875	a 24	a 38
٪5	b 6,875	b 10,75	b 14
٪15	b 5,875	bc 7,25	c 8
٪20	b 5	c 5	c 8
Es x	**0,3	*0,4	**0,35

لوحظت فروق هامة في تطوير مستعمرات فطرية مع كلا النوعين. مع زيادة جرعة المستقلبات، زاد تثبيط الفطور الفطري. حُضنت مستقلبات من وسط استنبات لفترة 48 ساعة نتيجة تثبيط كبير في كلا النوعين.

مثال 2- فعالية في الحي لعصوية رقيقة CECT 8258 ضد سكلروتينيا سكلروتيورم في خس.

كانت انواع النبات التي درست لاكتوكاساتيفا L من نوع "ركام جليدي"، دورة تشذيب 90 يوماً. أُنجز الغرس بزراعة في أوعية "قدور" 75سم x 15سم x 15سم حجماً، مع 3 بادرات/قدر، تحوي تربة طينية مناسبة لعدوى بسكلروتينيا سكلروتيورم.

دُرست حالتان لتقييم ضبط المرض، حالة توقيت استخدام وقائي أو شافي. قيم كلا الحالين 3 جرعات استخدام ومعالجة تحكم غير معالج، لمجموع 8 معالجات. هنا الاشكال المختلفة مدروسة.

T1: ضابط غير معالج؛ T2: ha/31؛ T3: ha/41؛ T4: ha/01.

اخيراً في حالة ظرف وقائي، في معالجات حيث يستخدم مبيد فطر حيوي، استخدمت جرعة ha/21، مستخدمةً 20 يوماً بعد الجرعة الاولى لحالة الشفاء، مستخدمةً جرعتان ha/21 كل ثالث يوم بعد التقليح الاول.

قيم ورق جديد ووزن جاف(FDW، RFW) بعد استنبات 90 يوماً، 10 نبتات لكل معالجة وفصلت إلى اعضاء مختلفين ووزنت على ميزان من طراز سارتوريس. للحصول على وزن جاف، وضعت العينات في فرن عند 80°م إلى وزن ثابت. حسبت النسب بين الكتل الحيوية الورقية والجافة.

حسبت النسبة المئوية للوفيات وتضمُّن المرض وعينات تربة مجال جذري من كل نبات ومعالجة، محاليل مخففة تسلسلية لتحديد العدد الاعظم احتمالاً لمتعضيات صغرية، تركيزات البكتيريا والمجال الجذري الفطري. لوسط نمو بكتيري مستخدم وأغار مغذي لوردية البنغال الفطرية.

جدول 5- وزن ورق طازج (FFW)غم، وزن ورق جاف (FDW)غم لنباتات خس معالجة وغير معالجة مع مبيد فطر حيوي لمعالجة 70 يوماً

معالجة	FFW	FDW
ضابط	20,38 ± 177,26	23,04 ± 71,4
3 لتر/Ha	17,21 ± 399,4	8,97 ± 71,7
4 لتر/Ha	30 ± 354,88	13,89 ± 100,8
5 لتر/Ha	19,2 ± 266,2	10,92 ± 37,6

جدول 6- وزن ورق طازج (FFW)غم، وزن ورق جاف (FDW)غم لنباتات خس معالجة وغير معالجة مع مبيد فطر حيوي لمعالجة 70 يوماً

معالجة	FFW	FDW
ضابط	13,58 ±193,57	14,01 ±69,83
3 لتر/Ha	9,50 ±312,93	15,57 ±135,28
4 لتر/Ha	12,09 ±321,89	8,81 ± 119,55
5 لتر/Ha	18,82 ±309,29	11,84 ± 97,31

خفضت جميع الاوزان الثلاثة لعصوية رقيقة CECT 8258 عدوى المرض عند استخدامها على شكل معالجة شفائية (الشكل 1). أدى وزن 3 لتر/ ha إلى وقاية ممتازة مع < 20٪ من العدوى عند نهائية الدراسة مقارنة مع الضابط غير المعالج مع > 80٪ من العدوى، عند استخدامها كمعالجة وقائية، خفضت الاوزان الثلاثة المرض ثانية مع معالجات 3 لتر/ ha و 4 لتر/ ha مزودتين وقاية ممتازة (<20٪ عدوى) مقارنة مع الضابط غير المعالج مع 90٪عدوى (الشكل 2).

مثال 3- فعالية في الحي لعصوية رقيقة CECT 8258 ضد إروينيا أميلوفورا في دراق

أجري ما مجموعه 5 تجارب في الحقل باستخدام 3 انواع دراق-إركوليني، كاستل وإتروسكان-لتقييم أداء سلالة لعصوية رقيقة CECT 8258 ضد آفة زراعية نارية لمرض بكتيري ناتج عن إروبينا أميلوفورا. في جميع مواقع التجربة، اجريت تطبيقات عندما كانت الاشجار عند إزهار 30٪ وكان المرض موجوداً في الاشجار.

كانت المعالجات المستخدمة في الدراسات:

1-نباتات غير معالجة 2-معالجة اوراق مع 3 لتر/ ha 3- معالجة اوراق وتربة عند 3 لتر/ ha لكل منهما.

بعد التطبيق، عُدَّ عدد الفروع المصابة. حُسب التغير المئوي في عدد الفروع المصابة بالعدوى مع أروبينا اميلوفورا وقورن بغير المعالج. تُظهر النتائج أنه مع جميع الانواع الثلاثة، خُفِّض عدد الفروع المصابة بمقدار 50٪ على الاقل مقارنة بالضابط. لوحظت هذه النزعة تحت

ضغط مرض منخفض وضغط مرض عال جداً. أظهرت الاشجار المستقبلة لكل من معالجة تربة وأوراق التخفيض الاكبر في زيادة نسبة مئوية في عدوى إروبينا أميلوفورا. في بعض حالات حيث كان ضغط المرض منخفضاً، شملت الاشجار المستقبلة لكل من معالجة تربة وأوراق انخفاضاً في نسبة العدوى المئوية، دالة على فعالية شفائية.

يمكن ان ترى مقارنة تغير النسبة المئوية لفروع مصابة للمعالجات الثلاثية في الشكل 3.

المثال 4– فعالية CECT 8258 ضد ممرضات نبات في استنبات في الزجاج (طبق أو لوح له 96 عيناً).

لتحديد إن كانت CECT 8258 فعالة ضد الفطريات، Phytophthora infestans، Sclerotinia minor، Alternaria solani، و Pythium sp وإروبنيا أميلوفورا البكتيرية. نُمّيتْ CECT 8258 سابقاً في وسط معين: نُمّي لقاح عصوية رقيقة في اوساط استنبات معينة تحوي 5٪ من دبس السكر، 3٪ من جزء خميرة مستخلص، 30٪ من مستخلصات كربوهيدرات، و 0,5٪ $MgSO_4 \times 7H_2O$ واملاح (نترات كالسيوم (1 جزيئي)، كلوريد منغنيز (10 ملي جزيئي)، كبريتات حديد (1 ملي جزيئي)). استخدمت استنباتات مخططة عمرها يوم واحد لتلقيح قوارير رَجّ حارفة سعة 250 مل. رُجَّت القوارير بمعدل 130 دورة في الدقيقة عند 37°م لفترة 36 ساعة.

عندما اصبح المحلول جاهزاً للاستخدام، انجزت التجارب التالية. مُلِئَت الواح لها 96 عيناً (منبسطة القاع، 40 ميكرولتر لكل عين) بأغار دكتروز بطاطا. نميت مستنبتات فيتوفثورا إنفستانز لثلاثة ايام في أوساط سائلة وسط YPG (0,4٪ خميرة، 0,1٪ KH_2PO_4، 0,5٪ $MgSO_4 \times 7 H_2O$، 1,5٪ غلوكوز) وإروبنيا أميلوفورا على شكل نمو في محلول مغذٍ لفترة 48 ساعة. بالنسبة للفطر الآخر، كان نمواً في وسط PDA وتمَّ التخلص من أبواغ فطرية من سطح أطباق بتري ونشر 0,1–0,2 مل من عينات واقية لماء منزوع الايونات ومعلق بوغي (تركيز يقارب 2×10^6 بوغ/مل) لممرض على الاغار.

للحصول على مواد طافية، ينبذ بالطرد المركزي كامل مستنبت المحلول عند 5000 دورة في الدقيقة لفترة 30 دقيقة. استخدمت سحاحة مع ممرضات النبات الميكروبية على الاطباق ذات 96 عيناً (8 عيون/ممرض). سجل وجود وعدم وجود نمو ميكروبي لكل 8 عيون. اضيف حوالي 35 µL (ميكرولتراً) من مادة طافية CECT 8258 أو 35 µL من كامل المحلول لكل عين. علامة "1" تعني تثبيط كامل لنمو ميكروبي. علامة "4" تعني بدون تثبيط نمو ميكروبي. النتائج مجدولة في جدول 7.

جدول 7- تثبيط في الزجاج لنمو فطري (طبق ذو 96 عيناً)

ممرضات ميكروبية	علامات مادة طافية	علامة وسط محلول كامل
Phytophthora infestans	1	1
Collectotrichum geosporoide	1	1
Botrytis cinerea	1	1
Sclerotinia sclerotiorum	1	1
Sclerotinia minor	1	1
Alternaria solani	3	1
Phytium sp	2	1
Erwinia amylovora	1	1

عناصر الحماية

1-1 سلالة لعصوية رقيقة مودعة برقم ايداع 8258 وفقاً لمجموعة المستنبتات الاسبانية (CECT).

1-2 طريقة لوقاية أو معالجة نباتات، اجزاء نبات، جذور نبات أو بذور نبات من اجتياحات فطرية أو بكتيرية، تشمل استخدام:

- مركب يحوي سلالة للعصوية الرقيقة مودعة برقم ايداع وفقاً لمجموعة المستنبتات الاسبانية CECT 8258 أو
- مادة طافية محرزة من مستنبت سلالة للعصوية الرقيقة مودعة وفقاً لمجموعة المستنبتات الاسبانية CECT 8258 أو
- جزء مستخلص من سلالة للعصوية الرقيقة مودعة وفقاً لمجموعة المستنبتات الاسبانية CECT 8258

مع النباتات المذكورة، اجزاء النبات، جذور النبات أو بذور النبات.

1-3 الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 2، تتميز في ان الاحتياجات الفطرية المذكورة ناتجة عن عضو عائلة سكلروتنياسي.

1-4 الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 1 أو 2، تتميز في أن الاحتياجات الفطرية أو البكتيرية ناتجة عن فطريات أو بكتيريا مختارة من المجموعة المكونة من إروبنيا أميلوفورا، ماكروفومينا فيزيولينا وبوتريتس سينيريا.

1-5 الطريقة وفقاً لأي من عناصر الحماية 2 أو 3، تتميز في أن الاحتياجات الفطرية ناتجة عن ممرضات فطرية ورقية تهاجم أوراق النبات.

1-6 الطريقة وفقاً لأي من عناصر الحماية 2 إلى 3، تتميز في أن الاحتياجات الفطرية ناتجة عن ممرضات فطرية للتربة تهاجم جذور النبات.

7- الطريقة وفقاً لأي من عناصر الحماية 2 إلى 6، تتميز في أن مبيد آفات حيوي أو كيماوي يستخدم ايضاً مع النباتات المذكورة، اجزاء النبات، جذور النبات أو بذور النبات.

8- الطريقة وفقاً لأي من عناصر الحماية 2 إلى 7، تتميز في أن سلالة العصوية الرقيقة مودعة برقم ايداع 8258 وفقاً لمجموعة المستنبتات الاسبانية CECT تستخدم على شكل مستنبت محلول كامل.

9- الطريقة وفقاً لأي من عناصر الحماية 2 إلى 8، تتتميز في ان سلالة للعصوية الرقيقة مودعة برقم ايداع 8258 وفقاً لمجموعة المستنبتات الاسبانية CECT تستخدم مع التربة المحيطة بجذور النبات.

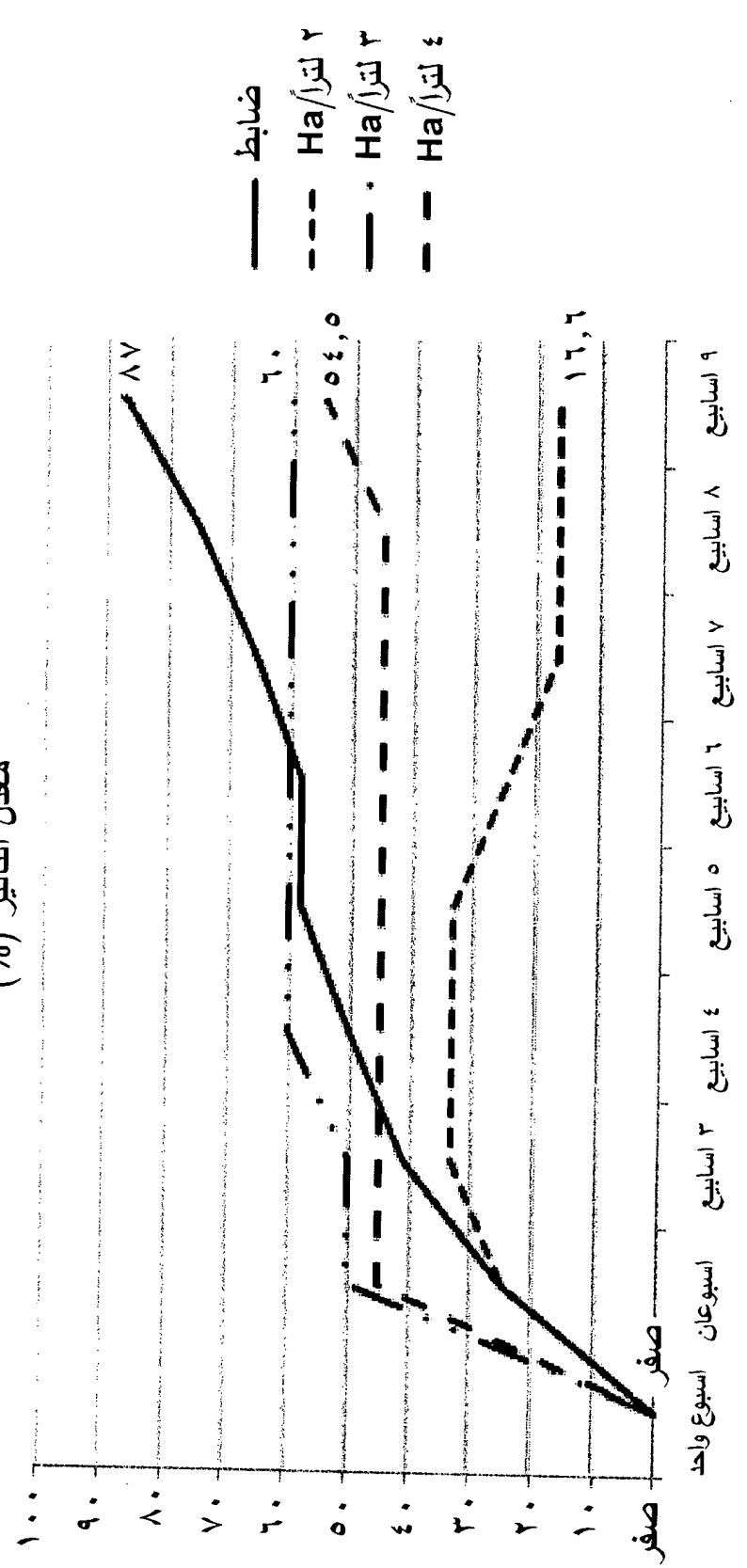
10- الطريقة وفقاً لاي من عناصر الحماية 2 إلى 9، تتميز في ان سلالة للعصوية الرقيقة مودعة برقم ايداع 8258 وفقاً لمجموعة المستنبتات الاسبانية CECT تستخدم على شكل مساحيق مبللة، حبيبات، معلقات مائية، نواتج تركيز قابلة لاستحلاب أو تغليف صغري.

سلالة للعصوية الرقيقة مودعة برقم ايداع ٨٢٥٨ وفقاً للمجموعة المستنبتات الاسبانية (CECT)
لآفة زراعية نارية في الدراق
غير معالج
ورقي
اوراق + تربة
٤٠٠
٣٥٠
٣٠٠
٢٥٠
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
صفر
٥٠ –
١٠٠ –
إركولييني رقم ١
كاستل
إركولييني رقم ٢
إتروسكا
إركولييني رقم ٣
تجربة وتشكيلة منوعة

الشكل ٣

معدل التأثير (%)
٩١
٤١,٦
١٦,٦
٩,٠٩
صفر
صفر — ضابط
اسبوع واحد
اسبوعان
٣ أسابيع
٤ أسابيع
٥ أسابيع
٦ أسابيع
٧ أسابيع
٨ أسابيع
٩ أسابيع
٢ لتراً/Ha
٣ لتراً/Ha
٤ لتراً/Ha

الشكل ٢


معدل التأثير (%)
١٠٠
٩٠
٨٠
٧٠
٦٠
٥٠
٤٠
٣٠
٢٠
١٠
صفر
صفر
اسبوع واحد
اسبوعان
٣ اسابيع
٤ اسابيع
٥ اسابيع
٦ اسابيع
٧ اسابيع
٨ اسابيع
٩ اسابيع
٨٧
٦٠
٥٤,٥
١٦,٦
ضابط
٢ لترا/Ha
٣ لترا/Ha
٤ لترا/Ha

الشكل ١

MA 39024A1

ROYAUME DU MAROC
****
OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE
****

المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية و التجارية

RAPPORT DE RECHERCHE AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE

(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 39024	Date de dépôt : 09/05/2016 Date d'entrée en phase nationale : 09/05/2016
Déposant : SYMBORG S.L.	Date de priorité: 08/11/2013
Intitulé de l'invention : SOUCHE DE BACILLUS SUBTILIS DÉPOSÉE SOUS LE NUMÉRO DE DÉPÔT CECT 8258 ET PROCÉDÉ DE PROTECTION OU DE TRAITEMENT DE PLANTES	

Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site http://worldwide.espacenet.com, et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.

Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :

Partie 1 : Considérations générales
- ☒ Cadre 1 : Base du présent rapport
- ☐ Cadre 2 : Priorité
- ☐ Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés

Partie 2 : Rapport de recherche

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité
- ☐ Cadre 4 : Remarques de forme et de clarté
- ☐ Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention
- ☒ Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité
- ☐ Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle

Examinateur: Fatima Zahra LAHCHIMI	**Date d'établissement du rapport** : 19/08/2019
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	ROYAUME DU MAROC OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE CASABLANCA

Partie 1 : Considérations générales

Cadre 1 : base du présent rapport

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description
  13 Pages
- Revendications
  10
- Planches de dessin
  3 Pages

Partie 2 : Rapport de recherche

Classement de l'objet de la demande :

CIB : A01N63/00, A01N63/02, C07K7/56, C12R1/125
CPC : A01N63/00, A01N63/02, C07K7/06, C12N1/20, C12R1/125

Plateformes et bases de données électroniques de recherche :

EPOQUENET, WPI, ScienceDirect, ORBIT

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
X	US5753222, MARRONE PAMEIA GAll [US] ET Al, 19/05/1998 Résumé 2-10 ; Exemple 5 ; Revendications 1, 5	1-10
X	Genetic and functional characterization of a Bacillus sp. Strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds, SOUTO GI ET AL; JOURNAL OF APPLI EO MICROBIOLOGY, vol. 97, no. 6, 2004, pages 1247-1256, XP002718227,ISSN: 1364-5072 Résumé 2-10; Page 1250 - 1251	1-10
X	Phytohormones and Antibiotics Produced by Bacillussubtilis and their Effects on Seed Pathogenic Fungi and on Soybean Root Development; WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS; 01/12/2005; vol. 21. No. 8-9.1639-1645. ; XP019271697.ISSN: 1573-0972	1-10
X	Activity and efficacy of Bacillus subtilis strain NJ-18 against rice sheath blight and Sclerotinia stem rot of rape; YANG D ET AL; BIOLOGICAL CONTROL. SANDIEGO. CA. US; 01/10/2009; vol. 51. No. 1; XP026499745.ISSN: 1049-9644.	1-10

***Catégories spéciales de documents cités :**

-« **X** » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
-« **Y** » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
-« **A** » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
-« **P** » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs
-« **E** » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité

Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle

Nouveauté	Revendications 1-10 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive	Revendications aucune Revendications 1-10	Oui Non
Application Industrielle	Revendications 1-10 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 : US 5753222
D2 : Genetic and functional characterization of a Bacillus sp. Strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds
D3 : Phytohormones and Antibiotics Produced by Bacillus subtilis and their Effects on Seed Pathogenic Fungi and on Soybean Root Development
D4 : Activity and efficacy of Bacillus subtilis strain NJ-18 against rice sheath blight and Sclerotinia stem rot of rape

1. Nouveauté

Aucun des documents cités ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques des revendications 1-10, d'où l'objet desdites revendications est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive

Le document D1 qui est considéré comme l'art antérieur le plus proche de l'objet des revendications 1-10, décrit un procédé de protection et de traitement des plantes contre les infections fongiques et bactériennes comprenant l'application d'une quantité efficace de la souche ATCC 55614 de Bacillus subtilis, un procédé de production d'une composition comprenant la culture de ladite souche et le procédé pour isoler un extrait bioactif produit par ladite souche.
L'objet de la présente invention diffère du D1 par la souche de Bacillus subtilis utilisée pour la prévention et le traitement des plantes contre les infections fongiques et bactériennes.
Le problème technique que la présente demande se propose de résoudre est considéré comme

la fourniture de biopesticides alternatifs.
La solution ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive pour les raisons suivantes :

- La revendication 1 fait référence à une souche de Bacillus subtilus déposés sous le numéro de dépôt 8258 (CECT) qui ne présente aucune caractéristique technique supplémentaire par rapport aux autre souches de Bacillus subtilus divulgué dans l'art antérieur notamment D1 dans le contexte de biopesticide destiné à la prévention et le traitement des plantes contre les infections fongiques et bactériennes.
- Dans les revendications 2-10 qui concernent l'utilisation d'un extrait isolé de la souche de Bacillus subtilus ainsi qu'un surnagent obtenu à partir d'une culture de ladite souche, les composantes de l'extrait et celui du surnagent ne sont pas divulgués. Par conséquent, on ne peut pas supposer que l'extrait comprend nécessairement un composé utilisé comme un pesticide et que le surnagent obtenu à partir de la culture résout le problème technique cité ci-dessous.

A la lumière de ce qui précède, l'objet des revendications 1-10 ne peut être considéré comme impliquant une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

3. Application industrielle

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.