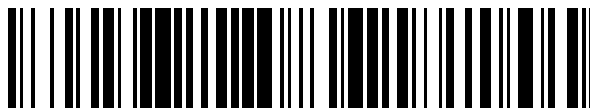


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 666**

21 Número de solicitud: 201231240

51 Int. Cl.:

C12N 1/14

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

31.07.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.09.2012

Fecha de la concesión:

14.01.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

24.01.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
(100.0%)**

**C/ Ramiro de Maeztu, 7
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

JIMÉNEZ AGUILAR, M^a DE LA CONSOLACIÓN

74 Agente/Representante:

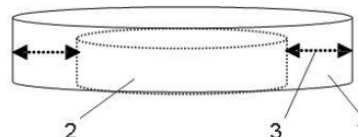
CARVAJAL Y URQUIJO, ISABEL

54 Título: **Procedimiento para la obtención a gran escala de inóculo miceliar de basidiomicetos mejorado**

57 Resumen:

Adición a la patente de invención P200930246, que describe la aplicación del procedimiento patentado a la producción de Ascomicetos. La producción a gran escala de Ascomicetos resulta de gran interés comercial, y en particular de importantes especies pertenecientes a los géneros Tuber, Terfezia o Morchella, como son, entre otras, Tuber melanosporum trufa negra o trufa de Périgord, Tuber magnatum trufa blanca del Piamonte, Terfezia arenaria trufa del desierto o Morchella esculenta colmenilla.

Figura 1



ES 2 387 666 B2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención a gran escala de inóculo miceliar de basidiomicetos mejorado.

5 **Campo Técnico de la Invención**

La presente invención pertenece al campo técnico de la Agrobiotecnología, y en concreto a la producción a gran escala de micelio en cultivo puro de especies de hongos superiores de la división Ascomycetos.

10 **Antecedentes**

Hasta el momento no hay referencias acerca de la producción a gran escala de inóculo micelial de especies fúngicas pertenecientes a la división Ascomycetos; muchas de ellas sin embargo de gran importancia por ser las especies más demandadas y que alcanzan los precios más elevados en el mercado.

15

Existía gran interés en encontrar un procedimiento sencillo, rápido y económico de obtención de micelio en cultivo puro de las citadas especies, para su utilización en la micorrización de plantas, con certificación de origen, destinadas a la producción en vivero o plantación, así como a la recuperación de la producción micológica en zonas naturales.

20

Así pues, la presente solicitud de Patente de Adición pretende solventar la ausencia de la patente parental de esta otra gran división de los hongos superiores, ya que, Ascomycetos y Basidiomicetos son las dos divisiones de hongos superiores pertenecientes al subreino Neomycota del reino Fungi.

25

En principio, las divisiones de hongos a los que se podría aplicar un procedimiento para la obtención a gran escala de inóculo miceliar similar al recogido por la patente de invención P200930246 para los Basidiomicetos tendrían que presentar una organización miceliar similar, circunstancia que se cumple en la familia de los Ascomycetos, aunque sin los estudios experimentales este hecho no constituiría *a priori* una garantía de éxito.

30

Descripción

La presente invención proporciona un procedimiento para la obtención *in vitro* de micelio fúngico en cultivo puro, aislado, tanto de los cuerpos fructíferos de especies fúngicas de interés, como de secciones de raicillas de plantas micorrizadas con dichas especies fúngicas.

La invención es una adición a la Patente de Invención P200930246 por "Procedimiento para la Obtención a Gran Escala de Inóculo Miceliar de Basidiomicetos", que comprende las etapas: aislamiento del micelio fúngico de especies de hongos Ascomicetos, preferiblemente de los géneros *Tuber*, *Terfezia*, o *Morchella* y más preferiblemente a partir de cuerpos fructíferos de los hongos; inoculación del micelio aislado en la etapa anterior en un medio de cultivo sólido de avena modificado (MOM); purificación del micelio en medio de cultivo sólido de avena modificado (MOM); desarrollo del micelio purificado en la etapa anterior en un medio de cultivo Biotina-Aneurina-Ácido Fólico (BAF) modificado y obtención del micelio fúngico purificado.

En una realización preferible de la invención, dicho hongo del género *Tuber* es *Tuber melanosporum*, y en otra realización preferible dicho hongo del género *Terfezia* es *Terfezia arenaria*. En una realización preferible más de la invención dicho medio líquido BAF modificado presenta un pH de 6,5.

Los resultados de los ejemplos muestran un extraordinario desarrollo y una gran cantidad de micelio obtenido. A los 5 días de cultivo se obtuvo por término medio un crecimiento de 1:103 del micelio en cultivo puro, ya dispuesto para la inoculación de las plantas a micorrizar.

Descripción de las figuras

Las figuras muestran dos perspectivas diferentes del sistema utilizado para la purificación del micelio fúngico.

30

La figura 1 corresponde a una placa de Petri de un diámetro de 9 cm (1) en cuyo fondo se coloca de forma centrada una placa (2) de 5 cm de diámetro, que se muestra con trazo discontinuo. Como resultado de esta configuración entre ambas placas se

crea un espacio circular de 2 cm de ancho (3) en el que se deposita el medio de cultivo fundido.

5 **La figura 2** muestra el espacio central (4) que queda cuando, una vez enfriado el medio, se retira la placa interpuesta. En dicho espacio vacío central es donde se sitúa el inóculo del micelio, que se desarrolla hasta alcanzar la sección periférica (3) donde se encuentra el medio para la purificación, liberándose así de la posible presencia de bacterias, las cuales quedan retenidas en la sección central de las placas, al no poder desarrollarse por ausencia de nutrientes.

10

Ejemplos

Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

15 **Ejemplo 1: Preparación del inóculo miceliar de *Tuber melanosporum*, *Terfezia arenaria* y *Morchella esculenta*.**

Se aislaron en cámara de flujo laminar pequeñas secciones de la parte más interna del himenio del píleo de carpóforos maduros de cada especie por separado, a los que se les había eliminado previamente la pellis. Seguidamente, se inocularon dichas secciones en condiciones de máxima asepsia en cámara de flujo laminar en placas Petri de plástico de 5 cm de diámetro, previamente esterilizadas en autoclave. A estas placas Petri se les había adicionado con anterioridad medio de cultivo sólido de avena modificado (MOM) con composición/litro de medio de 0,5 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de PO_4KH_2 ; 0,1 g de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1g de KCl; 5,0 g de sacarosa; 3,5 g de avena en polvo; 0,1 g de extracto de levadura y 8,0 g de agar. Las placas inoculadas se mantuvieron en cámara a 20°C hasta que el micelio se desarrolló llegando a ocupar toda la superficie de la placa. Posteriormente, el micelio obtenido en ambos casos se sometió a un proceso de purificación con objeto de eliminar la posibilidad de existencia de contaminación bacteriana, utilizando para ello placas Petri de 9 cm de diámetro en las que el medio de cultivo MOM tal cual anteriormente descrito se dispuso solamente en una sección circular periférica de 2 cm (placas de 5 cm de diámetro introducidas dentro de las placas Petri de 9 cm). En la parte central de estas placas se colocaron secciones de 1x1cm del medio sólido de crecimiento MOM conteniendo el micelio fúngico. Estas placas se mantuvieron en cámara a 20°C hasta que el micelio se desarrolló ocupando toda la superficie de la placa.

20

25

30

35

Ejemplo 2: Cultivo del inóculo miceliar

Una vez purificado el micelio de cada especie según el Ejemplo 1 se transfirió una pequeña porción para su desarrollo a gran escala a medio de cultivo líquido BAF modificado. En todos los experimentos se partió de un inóculo micelial de tamaño similar con un peso medio de unos 10 mg, que se incubó en matraces erlenmeyer conteniendo medio de cultivo líquido BAF modificado con una composición/litro de medio: 0,1 g de Cl_2Ca ; 0,5 g de PO_4KH_2 ; 0,5 g de $\text{SO}_4\text{Mg } 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005 g de SO_4Mn ; 0,001 g de SO_4Zn ; 0,01 g de $\text{Cl}_3\text{Fe } 7\text{H}_2\text{O}$; 2,0 g de peptona; 0,0005 g de tiamina; 0,00001 g de biotina; 0,05 g de inositol; 0,0001 g de ácido fólico; 5,0-20,0 g de glucosa, y 0,2 g de extracto de levadura; el cultivo se mantuvo bajo condiciones controladas: 25 °C, oscuridad, pH 6,5 y agitación constante a 120 rpm durante todos los días del cultivo ininterrumpidamente.

Ejemplo 3: Obtención de micelio de *Tuber melanosporum* en cultivo puro

Los resultados del crecimiento miceliar en medio nutritivo líquido BAF de la especie *Tuber melanosporum* durante catorce días sin nuevos aportes de medio nutritivo, se muestran en la tabla I. El crecimiento se mantiene hasta el día 14 en que, a causa del agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo, se observa un cierto descenso del mismo, que evidencia el inicio de procesos de lisis celular. Por ello, después de estos 14 días se requirió un nuevo aporte de medio nutritivo para la reanudación del crecimiento del micelio.

Tabla I

Especie	Peso medio del micelio (gr)					
	día 0	día 3	día 5	día 8	día 12	día 14
<i>T. melanosporum</i>	0,0081	5,1681	7,9722	10,9754	12,1732	11,7312

De estos datos se deduce que a los cinco días el crecimiento del micelio en cultivo puro fue de $1:10^3$, lo que se corresponde con una producción a gran escala.

Ejemplo 4: Obtención de micelio de *Terfezia arenaria* en cultivo puro

El crecimiento miceliar en medio nutritivo líquido BAF de la especie *Terfezia arenaria* durante catorce días sin nuevos aportes de medio nutritivo, se muestra en la tabla II.

En este ejemplo también se mantiene el crecimiento constante hasta el día 14 en que se observa un cierto descenso del mismo, que evidencia el inicio de los procesos de lisis celular. A partir de los 14 días se requirió un nuevo aporte de medio nutritivo para la reanudación del crecimiento del micelio.

5

Tabla II

	Peso medio del micelio (gr)					
Especie	día 0	día 3	día 5	día 8	día 12	día 14
<i>T.arenaria</i>	0,0111	4,9051	7,6351	9,2431	10,3065	10,0271

Al igual que en la especie anterior, de los datos expuestos en la tabla se deduce que a los cinco días el crecimiento fue de $1:7 \times 10^2$, lo que indica también un extraordinario desarrollo, si bien, un poco menor que en el ejemplo anterior.

10

Ejemplo 5: Obtención de micelio de *Morchella esculenta* en cultivo puro

El crecimiento miceliar en medio nutritivo líquido BAF de la especie *Morchella esculenta*. El crecimiento se mantiene, asimismo, hasta el día 14 en que se observa un cierto descenso del mismo, que evidencia el inicio de procesos de lisis celular. Después de estos 14 días se requirió, igualmente, un nuevo aporte de medio nutritivo para la reanudación del crecimiento del micelio.

15

Tabla III

	Peso medio del micelio (gr)					
Especie	día 0	día 3	día 5	día 8	día 12	día 14
<i>M.esculenta</i>	0,0078	4,6273	7,6895	10,7395	12,6912	12,0161

De los datos expuestos en la tabla se deduce que a los cinco días el crecimiento fue de $1:10^3$, lo que se corresponde igualmente con una producción a gran escala similar a la del Ejemplo 3.

20

Reivindicaciones

1. Adición a la Patente de Invención P200930246 por “Procedimiento para la Obtención a Gran Escala de Inóculo Miceliar de Basidiomicetos”, que comprende las etapas:
 - a) aislamiento del micelio fúngico de especies de hongos ascomicetos,
 - b) inoculación del micelio aislado en la etapa a) en un medio de cultivo sólido de avena modificado (MOM),
 - c) purificación del micelio en medio de cultivo sólido de avena modificado (MOM),
 - d) desarrollo del micelio purificado en la etapa c) en un medio de cultivo Biotina-Aneurina-Ácido Fólico (BAF) modificado, y
 - e) obtención del micelio fúngico purificado.
2. Adición a la Patente de Invención P200930246 según la reivindicación 1, caracterizada por que dicho aislamiento del micelio fúngico de la etapa a) se realiza a partir de cuerpos fructíferos de hongos.
3. Adición a la Patente de Invención P200930246 según la reivindicación 2, caracterizado por que el hongo de ascomicetos a partir del cual se obtiene el micelio es de los géneros *Tuber*, *Terfezia*, o *Morchella*.
4. Adición a la Patente de Invención P200930246 según la reivindicación 3, caracterizado por que dicho hongo del género *Tuber* es *Tuber melanosporum*.
5. Adición a la Patente de Invención P200930246 según la reivindicación 3, caracterizado por que dicho hongo del género *Terfezia* es *Terfezia arenaria*.
6. Adición a la Patente de Invención P200930246 según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho medio líquido BAF modificado de la etapa d) presenta un pH de 6,5.

Figura 1

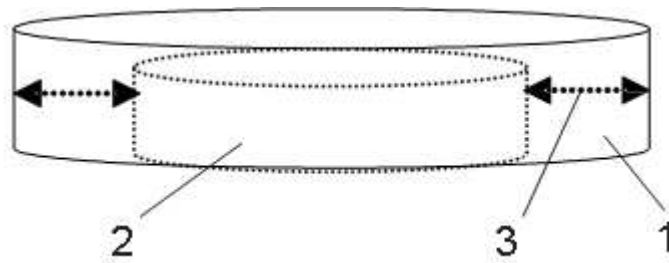
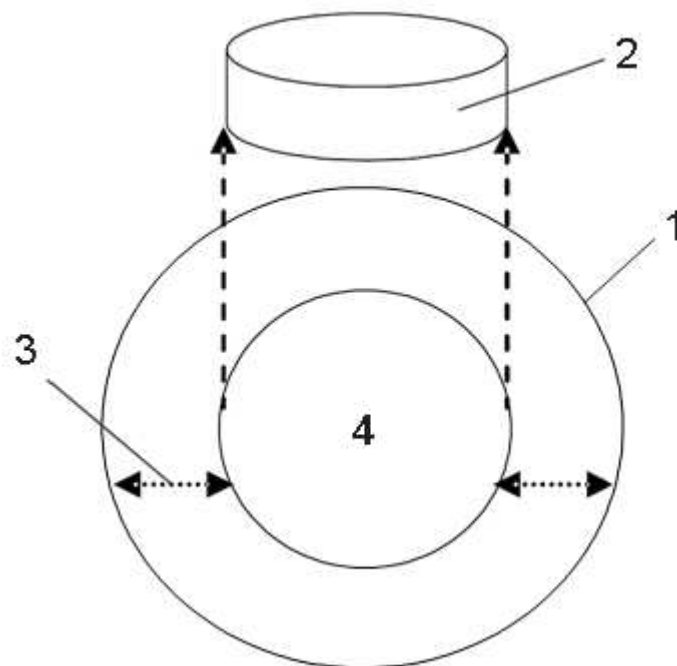


Figura 2





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201231240

②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.07.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/14** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	VÁZQUEZ-GARCÍA, A. et al. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. Anales del Instituto de Biología, Universidad Autónoma de México. Serie Botánica. 2002. Volumen 73. Número 1. Páginas 1-15. ISSN 0185-254X.	1-6
A	KIBAR, B. et al. Nutritional and environmental requirements for vegetative growth of edible ectomycorrhizal mushroom <i>Tricholoma terreum</i> . Zemdirbystė=Agriculture. 2011. Volumen 98. N° 4. Páginas 409-414. ISSN 1392-3196.	1-6
A	ZETTLER, L. W. et al. Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (<i>Epidendrum nocturnum</i>) with a mycorrhizal fungus. HortScience. Febrero, 2007. Vol. 2, N° 1, páginas 135-139. ISSN 0018-5345.	1-6
A	KAMAL, S. et al. Effect of nutrient sources and plant hormones on mycelial morphology of the black perigord truffle <i>Tuber melanosporum</i> . Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. 2011. Páginas 509-515.	1-6
A	NAVARRO-RÓDENAS, A. et al. Effect of water stress on in vitro mycelium cultures of two mycorrhizal desert truffles. Mycorrhiza. Mayo, 2011. Volumen 21, N° 4. Páginas 247-253. ISSN 1432-1890. doi:10.1007/s00572-010-0329-z	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
14.09.2012

Examinador
E. M. Ulloa Calvo

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, AGRICOLA, SCISEARCH, NPL, XPTK, XPOAC, HCAPLUS, CROPU, CABA, FSTA, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.09.2012

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-6
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-6
Reivindicaciones

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	VÁZQUEZ-GARCÍA, A. et al. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorizógenos.	2002
D02	KIBAR, B. et al. Nutritional and environmental requirements for vegetative growth of edible ectomycorrhizal mushroom <i>Tricholoma terreum</i> .	2011
D03	ZETTLER, L. W. et al. Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (<i>Epidendrum n octurnum</i>) with a mycorrhizal fungus.	2007
D04	KAMAL, S. et al. Effect of nutrient sources and plant hormones on mycelial morphology of the black perigord truffle <i>Tuber melanosporum</i> .	2011
D05	NAVARRO-RÓDENAS, A. et al. Effect of water stress on in vitro mycelium cultures of two mycorrhizal desert truffles..	2011

La solicitud describe un procedimiento de obtención in vitro de micelio fúngico de ascomicetos en cultivo puro.

El documento D01 relata la influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorizógenos, incluyendo el crecimiento de *Terfezia* en medio BAF.

El documento D02 anticipa el cultivo puro de hongos ectomicorizógenos en distintos medios de cultivo: BAF, PDA, ME, MMN, MM40.

El documento D03 se refiere a un medio de obtención de orquídeas con hongos micorrizados. Compara el uso de medio avena modificado frente al empleo de medio avena estándar.

El documento D04 determina el crecimiento de *Tuber melanosporum* in vitro, en distintos medios de cultivo.

El documento D05 establece la tolerancia de distintos hongos ectomicorizógenos ascomicetos (*Terfezia*, *Tuber*) al estrés hídrico, mediante su crecimiento in vitro en medio MNN modificado.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 L.P.)

El objeto principal de la invención es la obtención in vitro de un micelio fúngico en cultivo puro de hongos ascomicetos. Este objeto se consigue por las características establecidas en la presente reivindicación 1, con especificaciones más detalladas en sus dependientes. Realiza un cultivo mediante un procedimiento en varias etapas empleando dos medios de cultivo diferentes, por un lado MOM (medio sólido de avena modificado), y tras la purificación mediante placas Petri, el desarrollo del micelio en medio BAF modificado (medio Biotin-Aneurin- ácido fólico modificado).

El estado de la técnica más cercano respecto al empleo del medio MOM modificado no está enfocado a la obtención de un cultivo puro, si no al desarrollo in vitro de orquídeas micorrizadas con hongos. El empleo de este medio posibilita el crecimiento de la orquídea en simbiosis con el hongo. Un ejemplo de ello es el documento D03.

Si nos centramos en el empleo del medio BAF, son conocidos en el estado de la técnica distintos procedimientos in vitro de cultivo puro de hongos que lo emplean. Documentos que divulgan estos casos son, por ejemplo, D01 y D02.

Por otro lado, los documentos D04 y D05 anticipan el cultivo puro de hongos ascomicetos (*Tuber melanosporum*, *Terfezia*) en medios de cultivo distintos a los mencionados en la primera reivindicación.

No se ha encontrado ningún documento del estado de la técnica que realice un procedimiento tal y como indica la reivindicación independiente 1, en el que combina el uso de un medio MOM modificado y posterior desarrollo en medio BAF modificado para el cultivo puro de micelio fúngico de ascomicetos.

Por tanto, las reivindicaciones 1-6 cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.L.P) y actividad inventiva (Art. 8.1 L.P).