



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 332 031**

⑫ Número de solicitud: 200930246

⑤① Int. Cl.:
A01G 1/04 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

④② Fecha de presentación: **02.06.2009**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **22.01.2010**

④③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
22.01.2010

⑦① Solicitante/s: **Universidad Politécnica de Madrid
c/ Ramiro de Maeztu, 7
28040 Madrid, ES**

⑦② Inventor/es:
**Jiménez Aguilar, María de la Consolación y
Pérez Lecuona, Ernesto**

⑦④ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

⑤⑦ Resumen:

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

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.

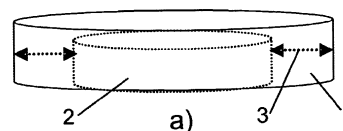
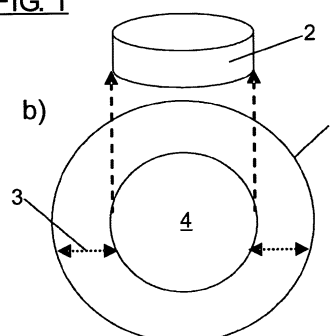


FIG. 1



ES 2 332 031 A1

DESCRIPCIÓN

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

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo general de agrobiotecnología y en particular se refiere a la producción a gran escala de inóculo micelial de especies fúngicas.

10 **Estado de la técnica**

Hasta el presente, no hay referencias acerca de la producción a gran escala de inóculo micelial de las especies fúngicas *Amanita caesarea* y *Boletus aereus*. Existe pues un gran interés en encontrar un procedimiento sencillo, rápido y económico para la obtención de micelio en cultivo puro de dichas especies, para su utilización en la producción en vivero de plantas micorrizadas de especies forestales de interés comercial, con fines de restauración forestal y recuperación de la producción micológica en las zonas naturales, así como, para la producción controlada, en vivero-plantación, de hongos comestibles de gran importancia comercial.

20 **Objeto de de la invención**

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.

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de micelio fúngico en cultivo puro que comprende las siguientes etapas:

- a) Aislamiento del micelio fúngico a partir de cuerpos fructíferos de hongos y/o secciones de raicillas de plantas micorrizadas,
- b) Inoculación del micelio aislado en la etapa a) en un medio de cultivo sólido de avena modificado (MOM),
- c) Purificación del micelio,
- d) Desarrollo del micelio purificado en la etapa c) en un medio de cultivo líquido BAF modificado,
- e) Obtención del inóculo miceliar

En un aspecto más particular de la presente invención, el aislamiento del micelio fúngico se realiza a partir de cuerpos fructíferos; en un aspecto más en particular, el hongo a partir del cual se obtiene el micelio es seleccionado de la Clase Basidiomicetos, en particular es seleccionado de entre los géneros *Amanita* y *Boletus*. En otro aspecto más en particular, el hongo a partir del cual se obtiene el micelio es *Amanita caesarea*. En otro aspecto particular, el otro hongo a partir del cual se obtiene el micelio es *Boletus aereus*.

En otro aspecto más en particular de la presente invención, el aislamiento del micelio fúngico se realiza a partir de secciones de raicillas de plantas micorrizadas, en un aspecto más en particular, el micelio es seleccionado de entre los géneros *Quercus* y *Cistus*.

En otro aspecto más en particular de la presente invención, el medio de cultivo sólido MOM de la etapa b) contiene como nutrientes calcio, nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, cloro, azufre, sacarosa, levadura y agar. En un aspecto más en particular, el medio de cultivo sólido de avena modificado de la etapa b) contiene 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 $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g 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.

En otro aspecto más en particular de la presente invención, la purificación de la etapa c) se realiza en una placa Petri (1) que contiene otra placa Petri (2) de menor diámetro en su interior dejando un espacio entre ellas (3) en la que se deposita el medio de cultivo MOM, que una vez solidificado el medio se retira la placa Petri (2) de menor tamaño dejando un espacio central (4) donde se deposita el inóculo de micelio.

En un aspecto más en particular de la presente invención el medio BAF modificado de la etapa d) contiene como nutrientes calcio, fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, hierro, cloro, azufre, peptona, tiamina, biotina, inositol, ácido fólico, glucosa y levadura. En un aspecto más en particular, el medio BAF modificado de la etapa d) contiene 0,1 g de Cl_2Ca ; 0,5 g de PO_4KH_2 ; 0,5 g de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005 g de SO_4Mn ; 0,001 g de SO_4Zn ; 0,01 g de $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 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. En un aspecto más en particular, el medio BAF modificado de la etapa d) tiene un pH comprendido entre 5-6.5.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra dos perspectivas diferentes 1a y 1b del sistema utilizado para la purificación del micelio fúngico.

La figura 1a 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.

La figura 1b 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.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención *in vitro* de micelio en cultivo puro, aislado, tanto de los cuerpos fructíferos de especies fúngicas, como de secciones de raicillas de plantas de alcornoque (*Quercus suber*) y de jara pingosa (*Cistus ladanifer*) micorrizadas con hongos.

En la presente invención cuando nos referimos a especies fúngicas de interés comercial nos referimos en general a especies fúngicas de Basidiomicetos como *Clytocybe sp.* o *Macrolepiota sp.*, y en particular a *Amanita caesarea* y *Boletus aereus*.

El proceso se inició aislando, en cámara de flujo laminar, pequeñas secciones de la parte más interna del himenio del píleo de carpóforos maduros de *Amanita caesarea* y de *Boletus aereus*, por separado, a los que se les había eliminado previamente la pellis. Seguidamente, se procedió a la inoculación de 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 las que se adicionó con anterioridad el medio nutritivo a utilizar: medio de cultivo sólido de avena modificado (MOM) cuya composición/litro de medio fue: 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 $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g 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. Estas placas se mantuvieron en cámara a 20°C hasta que el micelio se desarrolló, llegando a ocupar toda la superficie de la placa.

El proceso anteriormente descrito se realizó igualmente utilizando como inóculo, secciones de raicillas aisladas de ejemplares de las citadas especies vegetales que previamente habían sido micorrizadas con *Amanita caesarea* y *Boletus aereus*, y en las que mediante examen al microscopio óptico se había comprobado la existencia de micorrizas de dichos hongos.

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, utilizándose para ello placas Petri de 9 cm de diámetro en las que el medio de cultivo (el medio MOM anteriormente descrito) se dispuso solamente en una sección circular periférica de 2 cm (placas preparadas con la ayuda de placas de 5 cm de diámetro, tal como se muestra en la figura 1). En la parte central de estas placas se colocaron secciones de 1x1 cm 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.

Una vez purificado el micelio se transfirió una pequeña porción de éste, para su desarrollo a gran escala, a 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 $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005 g de SO_4Mn ; 0,001 g de SO_4Zn ; 0,01 g de $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 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 y agitación constante a 120 rpm.

En 5 días se obtuvo un crecimiento masivo ($1:10^6$) del micelio en cultivo puro dispuesto para la inoculación de las plantas a micorrizar.

Este proceso es susceptible de desarrollarse fácilmente en biorreactores de tipo industrial para una rápida producción, en condiciones controladas, de grandes cantidades de inóculo micelial purificado.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención *in vitro* de micelio fúngico en cultivo puro que comprende las siguientes etapas:

- a) Aislamiento del micelio fúngico,
- b) Inoculación del micelio aislado en la etapa a) en un medio de cultivo sólido de avena modificado (MOM)
- c) Purificación del micelio,
- d) Desarrollo del micelio purificado en la etapa c) en un medio de cultivo Biotina-Aneurina-Ácido Fólico (BAF) modificado,
- e) Obtención del micelio fúngico

2. Procedimiento de obtención de micelio fúngico según la reivindicación 1, donde el aislamiento del micelio se realiza a partir de cuerpos fructíferos de hongos.

3. Procedimiento de obtención de micelio fúngico según la reivindicación 2, donde el hongo a partir del cual se obtiene el micelio es seleccionado de entre los géneros *Boletus* y *Amanita*.

4. Procedimiento de obtención de micelio fúngico según la reivindicación 3, donde el hongo a partir del cual se obtiene el micelio es *Amanita caesarea*.

5. Procedimiento de obtención de micelio fúngico según la reivindicación 3, donde el hongo a partir del cual se obtiene el micelio es *Boletus aereus*.

6. Procedimiento de obtención de micelio fúngico según la reivindicación 1, donde el aislamiento del micelio se realiza a partir de secciones de raicillas de plantas micorrizadas.

7. Procedimiento de obtención de micelio fúngico según la reivindicación 6, donde las plantas a partir de las cuales es obtenido el micelio es seleccionado de entre los géneros *Quercus*, o *Cistus*.

8. Procedimiento de obtención de micelio fúngico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el medio de cultivo sólido de avena modificada (MOM) de la etapa b) contiene como nutrientes calcio, nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, cloro, azufre, sacarosa, levadura y agar.

9. Procedimiento de obtención de micelio fúngico según la reivindicación 8, donde el medio de cultivo sólido de avena modificado de la etapa b) contiene entre 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 $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g 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.

10. Procedimiento de obtención de micelio fúngico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la purificación de la etapa c) se realiza en una placa Petri (1) que contiene otra placa Petri (2) de menor diámetro en su interior dejando un espacio entre ellas (3) en el que se deposita el medio de cultivo MOM que una vez solidificado el medio se retira la placa Petri (2) de menor tamaño dejando un espacio circular (4) donde se deposita el inóculo de micelio.

11. Procedimiento de obtención de micelio fúngico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el medio líquido BAF modificado de la etapa d) contiene como nutrientes calcio, fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, hierro, cloro, azufre, peptona, tiamina, biotina, inositol, ácido fólico, glucosa y levadura.

12. Procedimiento de obtención de micelio fúngico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el medio BAF modificado de la etapa d) contiene 0,1 g de Cl_2Ca ; 0,5 g de PO_4KH_2 ; 0,5 g de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005 g de SO_4Mn ; 0,001 g de SO_4Zn ; 0,01 g de $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 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,

13. Procedimiento de obtención de micelio fúngico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el medio líquido BAF modificado de la etapa d) tiene un pH comprendido entre 5-6,5.

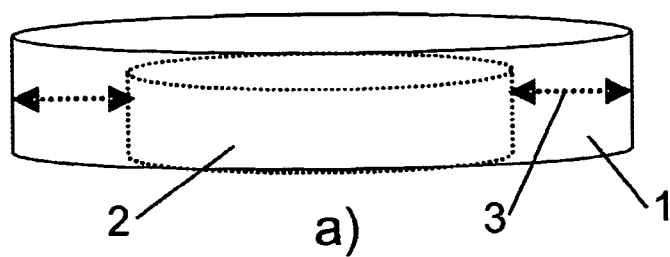
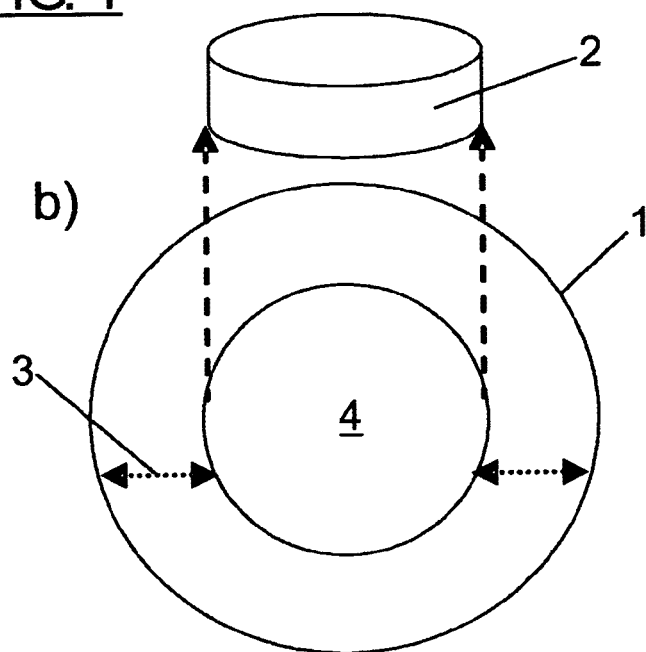


FIG. 1





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 332 031

⑫ Nº de solicitud: 200930246

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 02.06.2009

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **A01G 1/04** (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
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. 42, Nº 1, páginas 135- 139. ISSN 0018-5345.	1,8,9
A	OCHORA, J. et al. Symbiotic seed germination in twelve Kenyan orchid species. Systematics and Geography of Plants. 2001. Vol. 71, Nº 2, páginas 585-593, especialmente página 585. ISSN 1374-7886.	1,8,9
A	SANCHEZ, F. et al. Características culturales de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. Revista Iberoamericana de Micología. Diciembre, 2000. Vol. 17, Nº 4, páginas 127-134, especialmente páginas 127 y 128. ISSN 1130-1406.	1-4,6,11, 13
A	SANTIAGO-MARTÍNEZ, G. et al. Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis in vitro de una cepa de <i>Laccaria bicolor</i> . Agrociencia. Noviembre-diciembre 2003. Vol. 37, Nº 6, páginas 575-584. ISSN 1405-3195.	1,2,11,12
A	PEREIRA, G. et al. Efecto del pH sobre el crecimiento in vitro de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de <i>Pinus radiata</i> . Bosque. 2007. Vol. 28, Nº 3, páginas 215-219. ISSN 0304-8799.	1,2,11-13
A	TORRES, P.; HONRUBIA, M. Descripción de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. Boletín Sociedad Micológica de Madrid. 1993. Nº 18, páginas 163-170, especialmente páginas 163 y 164. ISSN: 0214-140X.	1-7

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

30.12.2009

Examinador

E. Ulloa Calvo

Página

1/6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 332 031

⑫ Nº de solicitud: 200930246

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 02.06.2009

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **A01G 1/04** (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MOLINA, R.; PALMER, J.G. Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. Methods and Principles of Mycorrhizal Research. N.C. Schenck, Universidad de Florida. 1982. Páginas 115-129. ISBN-10: 1890540462. ISBN-13: 978-0890540466.	1-6
A	ROYO, P. et al. Síntesis micorrícica de Lactarius deliciosus Fr. y Pinus sylvestris L. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales. 1998. Vol. 7, Nº 1 y 2, páginas 85-94. ISSN 1131-7965.	1

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
30.12.2009

Examinador
E. Ulloa Calvo

Página
2/6

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

A01G, 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, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, AGRICOLA, SCISEARCH, NPL, XPTK, XPOAC, HCAPLUS, CROPU, CABA, FSTA, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.12.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-13	SÍ
	Reivindicaciones	_____	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-13	SÍ
	Reivindicaciones	_____	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 ha sido publicada.

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	ZETTLER, L.W. et al. HortScience. Febrero, 2007. Vol. 42, N°1, páginas 135-139.	2007
D02	OCHORA, J. et al. Systematics and Geography of Plants. 2001. Vol. 71, N°2, páginas 585-593, especialmente página 585.	2001
D03	SANCHEZ, F. et al. Revista Iberoamericana de Micología. Diciembre, 2000. Vol.17, N° 4, páginas 127-134, especialmente páginas 127 y 128.	2000
D04	SANTIAGO-MARTÍNEZ, G. et al. Agrociencia. Noviembre-diciembre 2003. Vol. 37, N° 6, páginas 575-584.	2003
D05	PEREIRA, G. et al. Bosque. 2007. Vol.28, N° 3, páginas 215-219.	2007
D06	TORRES, P.; HONRUBIA, M. Boletín Sociedad Micológica de Madrid. 1993. N°18, páginas 163-170, especialmente páginas 163 y 164.	1993
D07	MOLINA, R.; PALMER, J.G. Methods and Principles of Mycorrhizal Research. N.C. Schenck, Universidad de Florida. 1982. Páginas 115-129.	1982
D08	ROYO, P. et al. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales. 1998. Vol. 7, N° 1 y 2, páginas 85-94.	1998

Observaciones sobre documentos:

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

Se hace referencia a los siguientes documentos citados en el IET:

D01 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.

D02 divulga un proceso de germinación in vitro de orquídeas en simbiosis con hongos. Determina que el empleo de medio avena suplementado con glucosa y nitrógeno es el más óptimo para ello.

D03 relaciona las características culturales de algunos hongos ectomicorrícicos (Amanita entre ellos). Realiza un cultivo de distintas cepas de hongos en medio MMN y BAF a pH ácido para ver cómo responden. La elección del medio depende del tipo de hongo a cultivar.

D04 describe el crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis in vitro de una cepa de Laccaria bicolor. Entre los medios empleados está el BAF, que resulta ser uno de los más efectivos.

D05 divulga el efecto del pH sobre el crecimiento in vitro de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de Pinus radiata. El crecimiento fúngico es en medio BAF con pH modificado.

D06 realiza una descripción de algunos hongos ectomicorrícicos obtenidos en cultivo puro, entre ellos del género Boletus o Amanita, recolectados de bosques de Pinus o Quercus. El medio de cultivo empleado para su obtención es MMN o BAF.

D07 relaciona una forma de aislar y mantener in vitro un cultivo puro de hongos ectomicorrícicos.

D08 describe la síntesis micorrícica de Lactarius deliciosus Fr. y Pinus sylvestris L. en cultivo puro.

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

Hoja adicional

El objeto principal de la invención es la obtención in vitro de un micelio fúngico en cultivo puro. Este objeto se consigue por las características establecidas en la parte caracterizadora de la 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, sino 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. Ejemplos de ello son los documentos D01 y D02.

Si nos centramos en el empleo del medio BAF, es conocido en el estado de la técnica distintos procedimientos in vitro de cultivo puro de hongos que lo emplean, o incluso que estudian si es o no el más adecuado comparándolo con otros medios posibles y teniendo en cuenta sobre qué cepa se quiere obtener el cultivo puro. Documentos que divulgan estos casos son D03-D06.

El documento D07 es representativo en cuanto a que explica detalladamente cómo aislar un hongo para obtener el cultivo puro, pero emplea otro medio de cultivo distinto al de la solicitud.

Por otro lado, D08 describe el cultivo de hongos en diferentes medios (distintos a lo mencionados en la primera reivindicación), determinando que existe una gran especificidad entre el medio de cultivo a emplear y la cepa que quiero hacer crecer.

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.

Por tanto, las reivindicaciones 1-13 cumplen con el requisito de novedad (Art.6.L.P) y actividad inventiva (Art. 8.1 L.P).