

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ N.º de publicación: **ES 2 088 363**

⑫ Número de solicitud: 9402430

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>: A01G 1/04

C12N 1/14

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **25.11.94**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.96**

⑫③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.08.96**

⑦① Solicitante/s: **Universidad de Murcia**  
**Avda. Teniente Flomesta, s/n**  
**Edf. Convalecencia, 3 pta.**  
**30003 Murcia, ES**

⑦② Inventor/es: **Morte Gómez, María Asunción y**  
**Honrubia García, Mario**

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤④ Título: **Método para la micorrización in vitro de plántulas micropropagadas de *Helianthemum* con micelio de *Terfezia clavervyi*.**

⑤⑦ Resumen:

Método para la micorrización in vitro de plántulas micropropagadas de *Helianthemum* con micelio de *Terfezia clavervyi*.

Comprende realizar la micorrización en un sistema *in vitro* de tubos de ensayo con un medio de cultivo y con agar como sustrato, introduciendo plantas de *Helianthemum almeriense* ya enraizadas junto con trocitos de agar conteniendo micelio de *Terfezia clavervyi*, en los tubos conteniendo dicho medio.

Dicho medio contiene:

KNO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K, NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub>, SO<sub>4</sub>Fe.7H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>EDTA, SO<sub>4</sub>Mn.4H<sub>2</sub>O, SO<sub>4</sub>Zn.7H<sub>2</sub>O, SO<sub>4</sub>Cu.5H<sub>2</sub>O, Cl<sub>2</sub>Co.6H<sub>2</sub>O, KI, BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub>, MoO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, tiamina.HCl, ácido nicotínico, piridoxina HCl, m-Inositol, Sacarosa, Agar.

Aplicación en el mercado industrial de la trufa del desierto.

ES 2 088 363 A1

## DESCRIPCION

Método para la micorrización *in vitro* de plántulas micropropagadas de *Helianthemum* con micelio de *Terfezia clavervyi*.

**Campo técnico de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la micorrización *in vitro* de plántulas de *Helianthemum almeriense* (Cistaceae).

Más concretamente, la presente invención se refiere a un método para la micorrización *in vitro* de plántulas micropropagadas de *Helianthemum almeriense* (Cistaceae) con micelio *Terfezia clavervyi* (turma o trufa del desierto), en un medio de cultivo que permite el rápido crecimiento del micelio del hongo y buen desarrollo *in vitro* de las plántulas micropropagadas, a la vez que el establecimiento de su simbiosis micorrícica.

**Estado de la técnica anterior a la invención**

El género *Terfezia*, junto con *Balsamia*, son los hongos hipogeos denominados trufas del desierto o turmas. Establecen simbiosis micorrícica con plantas vasculares de la familia Cistáceas, especialmente de los géneros *Helianthemum* y *Cistus*. Estas plantas arbustivas están bien adaptadas a condiciones semi-áridas, y algunas especies se desarrollan además en suelos salinos, con altas concentraciones de yesos.

*Terfezia clavervyi*, que es la especie más frecuente en suelos calizos-margoyesíferos del semi-árido mediterráneo occidental, aparece ligada a diversas especies del género *Helianthemum*, anuales y perennes [(1) Honrubia, M., Cano, A. and Molina-Niñirola, C.1992. Hypogeus fungi from southern Spanish semi-arid lands. Personia 14: 647-653]. Los ecotipos del hongo y de las plantas simbiosis responden a condiciones xerofíticas bien marcadas.

El mercado de la trufa del desierto se extiende a todos los países ribereños del Mediterráneo y del Golfo Pérsico. Según referencias del solicitante Arabia Saudi y Kuwait son los principales consumidores; pero también Turquía, Egipto, Italia y por supuesto Marruecos. El consumo en España se centra fundamentalmente a nivel familiar, en la zona comprendida entre Murcia-Almería -Granada, y en Andalucía occidental y Extremadura, dependiendo de la especie fúngica. El valor culinario y comercial no parece variar entre las especies de turmas. En los mercados del Sur peninsular y los centrales de Barcelona pueden encontrarse a precios que superan los alcanzados por otros hongos tan conocidos como los níscalos; alrededor de unas 3.000-5.000 Ptas/kilo dependiendo de la temporada y el año.

Por otro lado, la micropropagación de *Helianthemum almeriense* [(2) Morte, M.A. and Honrubia, M. 1992. *In vitro* propagation of *Helianthemum almeriense* Pau (Cistaceae). Agronomie 12 (10) 807-809] ha permitido obtener un gran número de plantas seleccionadas en un corto período de tiempo, a la vez que un conocimiento de la fisiología nutricional de dicha planta.

La micorrización *in vivo* plantea la desventaja de que no se pueden controlar totalmente las condiciones reales que imperan en el suelo (pH, cantidad de nutrientes disponibles, etc), lo cual puede

limitar el crecimiento de algunos de los simbiontes o bien el producto final de su micorrización.

Por el contrario, la micorrización *in vitro* permite controlar las condiciones óptimas de crecimiento y simbiosis de las especies vegetal y fúngica, así como seleccionar las cepas de hongos y explantes de vegetal más adecuadas a unas condiciones de cultivo en campo determinadas. El medio de cultivo (MORTE-HONRUBIA, MH) objeto de esta solicitud de patente, resuelve estos problemas ya que sufragar los requerimientos nutricionales para que ambos simbiontes crezcan debidamente, a la vez que se crea un equilibrio nutricional que permite su asociación micorrícica de forma segura.

Los inventores han realizado previamente la síntesis micorrícica *in vitro* entre plantas micropropagadas de *H. almeriense* y *T. clavervyi*, en medios MMN modificado [(3) Morte, M.A. Cano, A., Honrubia, M. and Torres, P. *In vitro* mycorrhization of micropropagated *Helianthemum almeriense* plantlets with *Terfezia clavervyi* (desert truffle). Agricultural Science of Finland en prensa]. Aunque se obtuvo un elevado porcentaje de micorrización, la mayoría de las plántulas se necrotizaron y no sobrevivieron *in vitro*. Esto fue debido al medio de cultivo utilizado, el cual no proporcionó los requerimientos nutricionales necesarios para la planta.

Son varios los trabajos realizados sobre la síntesis micorrícica entre varias especies de *Terfezia* y *Helianthemum*, pero la mayoría en condiciones semiestériles [(4) Awamed, M.; Alsheikh, A. and Ghawas, S. 1979. Mycorrhizal synthesis between *Helianthemum ledifolium*, *H. salicifolium* and four species of the genera *Terfezia* and *Tirmania* using ascospores and mycelial cultures obtained from ascospores germination. Proc. 4th North Amer.Conf.on Myc., Fort Collins, Colorado U.S.A. (5) Awamed, M.S. 1981. The response of *Helianthemum salicifolium* and *H. ledifolium* to infection by the desert truffle *Terfezia boudieri*. Mush. Sc. 11:843-853. (6) Chevalier, G.; Rioussset, L.; Dexheimer, J. and Dupre, C. 1984. Synthèse mycorrhizienne entre *Terfezia leptoderma* Tul. et diverses Cistacées. Agronomie 4:210-211]. Sin embargo, los trabajos sobre síntesis *in vitro* son muy escasos.

Hay estudios [(7) Fortas, Z. 1990. Etude de trois espèces de Terfez: caractères cultureux et cytologie du mycelium isolé et associé à *Helianthemum guttatum*. Doctoral Thesis. (8) Fortas, Z. and Chevalier, G. 1992. Effect des conditions de culture sur la mycorrhization de l'*Helianthemum guttatum* par trois espèces de terfez des genres *Terfezia* et *Tirmania* d'Algérie. Can. J. Bot. 70:2453-2460] sobre las condiciones de cultivo para la micorrización de plántulas de *H. guttatum* con *T. arenaria*, *T. clavervyi* y *Tirmania pinoy*. Estas síntesis se realizaron en condiciones estériles, en perlita regada con una solución nutritiva que previamente habían utilizado para síntesis micorrícicas con *Tuber melanosporum* [(9) Chevalier, G. and Desmas, C. 1977a. Mycorrhization par *Tuber melanosporum* de plants de *Quercus pubescens* en milieu fortement fertilisé. Ann. Phytopathol. 9:93. (10) Chevalier, G. and Desmas, C. 1977b. Mycorrhization par *Tuber mela-*

*nosporum* de plants de *Quercus pubescens* en culture hydroponique *sensu stricto*. Ann. Phytopathol. 9:532] y como inóculo emplearon fragmentos de micelio. También lo realizaron en condiciones semiestériles en sustratos naturales y con suspensiones de esporas. Después de dos meses obtuvieron micorrización en ambos casos, independientemente del método de síntesis.

Por otro lado, hay un estudio [(11) Rothbergerano, N., Livne, D. and Kagan-Zur. 1990. *Helianthemum Terfezia* relations in different growth media. New Phytologist 114:235-238] sobre la síntesis micorrízica *in vitro* entre plántulas de *H. sessiliflorum* y *T. leonis*. En este trabajo utilizaron como medio de cultivo la solución de Hoagland [(12) Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. 1950. The water culture method for plants without soil. Circular 374, University of California, Agriculture Experimental Station, Berkeley], conteniendo solo sales inorgánicas, solidificada con 0,8% de agar Difco y con 0,05% (w/v) de carbón activo. El efecto estimulador del carbón activo lo relacionaron a su carácter de adsorción de nutrientes del medio de cultivo, lo cual hizo bajar el valor nutricional de dicho medio, permitiendo la micorrización.

La micorrización de plantas micropropagadas presenta, además, una problemática diferente. Muchos autores apoyan la conveniencia de introducir la micorrización en las últimas etapas *in vitro* de la micropropagación, ya que la simbiosis ayudaría a la planta a adaptarse mejor a las condiciones *post vitro*, así como aseguraría la salida de plántulas perfectamente micorrizadas. De este modo son numerosos los estudios que hay realizados sobre este tema, aunque no se ha encontrado ninguno sobre plántulas micropropagadas de *Helianthemum* micorrizadas con *Terfezia*. Existen trabajos, con diferentes especies vegetales micropropagadas y fúngicas, que describen la micorrización *in vitro* en sustratos como perlita embebida de solución nutritiva donde creció previamente el hongo [(13) Rancillac, M. 1982. Multiplication végétative *in vitro* et synthèse mycorrhizienne: Pin maritime-Hebelome, Pisolithus. In: Les Mycorrhizes: biologie et utilisation. Ed. INRA Publ. (Les Colloques de l'INRA, n° 13)] o una mezcla de perlita y turba humedecida con solución nutritiva MMN [Modified Melin-Norkrans (14) Marx, D.H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of ectomycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 59:153-163] [(15) Grellier, B.; Letouze, R. and Strullu, D.G. 1984. Micropropagation of birch and mycorrhizal formation *in vitro*. New Phytol. 97:591-599], o una mezcla de turba y vermiculita regada con una solución MMN [(16) Lei, J. and Dexheimer, J. 1987. Résultats préliminaires concernant la mycorrhization contrôlée de vitroplants de chêne (*Quercus robur* L.). Ann. Sci. For., 1987, 44 (3) 315-324]. También se ha utilizado una mezcla de perlita y turba pero humedecida con una disolución diseñada por Strullu y colaboradores [(17) Strullu, D.G.; Grellier, B.; Marciniak, D. and Letouze, R. 1986. Micropropagation of chestnut and conditions of mycorrhizal syntheses *in vitro*. New

Phytol. 102:95-101] para el enraizamiento de los explantes pero que además fue favorable para el crecimiento del hongo.

Sin embargo, un menor número de autores ha utilizado agar como sustrato para la micorrización *in vitro* de plántulas micropropagadas. Se ha realizado con *Eucalyptus camadulensis* [(18) Malajczuk, N. and Hartney, V.J. 1986. Procedure for inoculation of micropropagated plantlets of *Eucalyptus camadulensis* with Ectomycorrhizal fungi, and comparison with seedling inoculation using inoculum contained in a peat/vermiculite carrier. Aust. J. Bot. 34: 199-206] y con *E. marginata* [(19) Tonkin, C.M.; Malajczuk, N. and McComb, J.A. 1989. Ectomycorrhizal formation by micropropagated clones of *Eucalyptus marginata* inoculated with isolates of *Pisolithus tinctorius*. New Phytol. 111:209-214] utilizando, en ambos casos, los medios de enraizamiento para las respectivas especies solidificados con agar.

Algunos autores [(13), (20) Douglas, G.C. Heslin, M.C. and Reid, C. 1989. Isolation of *Oidiodendron maius* from *Rhododendron* and ultrastructural characterization of synthesized mycorrhizas. Can. J. Bot. 67: 2206-2212] consideran el agar como un sustrato que no favorece la síntesis micorrízica, por producir una falta de aireación necesaria para dicha simbiosis. Por el contrario, el medio que se describe en esta patente, está diseñado con agar porque además de permitir la obtención de un elevado porcentaje de micorrización, tiene la ventaja de que se puede observar el crecimiento del micelio sobre la raíz y así visualizar el inicio de la micorrización, además de resultar más fácilmente manejable que cualquier otro tipo de sustrato, de los anteriormente mencionados.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se expresa en su enunciado, se refiere a un método para la micorrización *in vitro* de plántulas micropropagadas de *Helianthemum* con micelio de *Terfezia clavari*.

Dicho método se caracteriza porque une, en un sistema de micorrización *in vitro*, basado en tubos de ensayo conteniendo el medio de cultivo MH (Morte y Honrubia) diseñado por los inventores, a los dos simbiontes (a saber, *Terfezia clavari* y *Helianthemum almeriense*) que, a su vez, han sido cultivados *in vitro* por vía diferente.

El medio de cultivo MH empleado en el método de la presente invención, tiene la siguiente composición:

Medio MH:

| Macronutrientes                      | mg/l        |
|--------------------------------------|-------------|
| KNO <sub>3</sub>                     | 400-500     |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 100-120     |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 90-100      |
| PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K     | 40-43       |
| NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub>      | 390-415     |
| Micronutrientes                      |             |
| SO <sub>4</sub> Fe.7H <sub>2</sub> O | 6-7,5       |
| Na <sub>2</sub> EDTA                 | 8-9,5       |
| SO <sub>4</sub> Mn.4H <sub>2</sub> O | 4,5-6       |
| SO <sub>4</sub> Zn.7H <sub>2</sub> O | 2-2,5       |
| SO <sub>4</sub> Cu.5H <sub>2</sub> O | 0,005-0,007 |

MicronutrientesCl<sub>2</sub>Co.6H<sub>2</sub>O 0,005-0,007

Kl 0,19-0,22

BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub> 1-1,65MoO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,04-0,07Vitaminas

Tiamina HCl 0,08-0,15

Ac. Nicotínico 0,45-0,55

Piridoxina HCl 0,45-0,55

m-Inositol 80-200

Sacarosa 10-20 g/l

Agar 6-8 g/l

pH... 5,8-7,0-7,6

Como se ha indicado anteriormente, cada uno de los simbiontes se obtiene previamente por separado. Por un lado, el hongo *T. claveryi*, se aísla de tejidos del carpóforo y se cultiva en placa Petri con medio MMN a pH 8,0. Por otro lado, las plántulas de *H. almeriense* proceden de semillas esterilizadas en superficie y germinadas *in vitro*, tras un proceso de multiplicación y enraizamiento *in vitro* en medio de Murashige y Skoog (MS) [(21) Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497].

Tras la unión, se introduce la plántula ya enraizada, procedente del medio de enraizamiento, en el referido medio de cultivo MH junto con unos trocitos de agar con micelio de *T. claveryi*, procedente de los cultivos en placa sobre medio MMN.

El micelio crece desde la superficie de los trozos de agar, que sirven como inóculo, hacia el interior del medio de cultivo del tubo de ensayo, en tan solo dos semanas, lo que representa la mitad de tiempo que en un medio MMN modificado [(22) Morte, M.A., Cano, A., Honrubia, M. and Torres, P. *In vitro* mycorrhization of micropropagated *Helianthemum almeriense* plantlets with *Terfezia claveryi* (desert truffle). *Agricultural Science of Finland*. En prensa]. Por esta razón, el medio MH, aquí descrito, podría ser igualmente adecuado para la producción de micelio, ya que su tasa de crecimiento en medio MMN es bastante baja. El crecimiento del hongo hacia el interior del tubo permite al micelio colonizar perfectamente todo el sistema radical de la plántula. El porcentaje de micorrización que se obtiene varía entre 61-75%, después de dos meses en cultivo. Este porcentaje es muy similar al obtenido en medio MMN modificado (22). Sin embargo, contrariamente a la micorrización en medio MMN modificado, en el medio MH de la invención no surgen problemas de supervivencia *in vitro* de las plántulas durante el tiempo que tardan en micorrizarse. Esto se debe a que su composición es más similar a la del medio de micropropagación MS y con mayor número de nutrientes que el medio MMN. Además, el pH un poco más bajo en este medio (pH 7) en comparación con el medio MMN modificado (pH 8) permite un mejor desarrollo vegetal *in vitro* ya que los pH por encima de 7 generalmente detienen el crecimiento vegetal *in vitro* [(23) Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. 65 p.

and 207 p. 2nd ed. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht].

La asociación *in vitro* de las plántulas micropropagadas de *H. almeriense* con el micelio de *T. claveryi* produce una estimulación del crecimiento de las plántulas y, en comparación con las plántulas control no micorrizadas, el incremento de altura de las plantas micorrizadas es de prácticamente el doble (véase Figura 1). Esta estimulación puede atribuirse a la formación de micorrizas [(24) Harley, J.L. and Smith, S.E. 1983. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London, New York].

La micorrización en este medio presenta una ventaja sobre la micorrización en medio con solución Hoagland [(25) Roth-Bejerano, N. Livne, D. and Kagan-Zur. 1990. *Helianthemum-Terfezia* relations in different growth media. *New Phytologist* 114:235-238] debido a que no es necesaria la adición de carbón activo para la adsorción del exceso de nutrientes que impiden la micorrización, ya que en este medio el balance nutricional está perfectamente conseguido.

Por lo tanto, de acuerdo con lo anterior, el método para la micorrización *in vitro* de plántulas micropropagadas de *Helianthemum* con micelio de *Terfezia claveryi* se caracteriza porque comprende llevar a cabo la micorrización en un sistema *in vitro* de tubos de ensayo con un medio de cultivo MH y empleando agar como sustrato, introduciendo las plantas de *Helianthemum almeriense* ya enraizadas junto con pequeños trozos de agar conteniendo micelio de *Terfezia claveryi*, en los tubos de ensayo conteniendo el medio MH anteriormente definido, durante unos dos meses a temperatura ambiente para conseguir un 75% de micorrización, aproximadamente.

**Breve descripción de la figura**

La figura 1 es una representación gráfica del efecto de la inoculación *in vitro* con micelio de *T. claveryi* sobre la altura (cm) del tallo de las plántulas micropropagadas de *H. almeriense* en medio con agar, a las 4, 8 y 12 semanas después de la inoculación. Con "C" se representa a las plántulas de control no-micorrizadas y con "M" se representa a las plántulas micorrizadas.

Las barras representan la desviación típica de las medias.

**Modos de realización de la invención**

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente Ejemplo, el cual no pretende ser limitativo de su alcance.

**Ejemplo****1.- Material vegetal**

Las plantas *H. almeriense* se micropropagaron según el método de Morte y Honrubia [(26) Morte, M.A. and Honrubia, M. 1992. *In vitro* propagation of *Helianthemum almeriense* Pau (Cistaceae). *Agronomie* 12 (10) 807-809]. Las plántulas para los procesos de micorrización se recogieron del medio de enraizamiento (MS con macronutrientes diluidos 1/4 y sin hormonas) una vez habían enraizado las plántulas, aproximadamente después de 4 semanas.

En el momento de la inoculación, cada plántula enraizada tenía una longitud de tallo aproximada de 3 cm y 4 ó 5 segmentos nodales, con dos hojas cada uno. El número medio

de raíces por plántula fue de 3 y muy poco ramificadas; la longitud de las raíces en el momento de la inoculación fue entre 1-1,5 cm.

Si no se dispone de material vegetal micropropagado, se puede obtener simplemente de plántulas directamente germinadas *in vitro* en medio MS, tras una suave esterilización en superficie de las semillas siguiendo el método de Morte y Honrubia (26).

Durante todo el proceso de micropropagación las condiciones de cultivo fueron de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura, 2.000 lux de luz fluorescente Growlux y 16-h de fotoperíodo. Estas condiciones de cultivo también se mantuvieron durante los siguientes experimentos de síntesis micorrízica.

## 2.- Material fúngico

Los aislamientos de *T. claveryi* se hicieron de tejidos de carpóforos. El mejor medio de cultivo para el crecimiento de este hongo fue el Modified Melin-Norkrans (MMN) [(27) Marx, D.H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of ectomycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 59: 153-163] (en  $\text{mg.l}^{-1}$ ; ClCa 50; ClNa 25;  $\text{PO}_4\text{KH}_2$  500;  $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$  250;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  150;  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  1%; tiamina-HCl 100) con 10  $\text{g.l}^{-1}$  de glucosa, 3  $\text{g.l}^{-1}$  de malta y solidificado con 15  $\text{g.l}^{-1}$  de agar Panreac y pH 8.0.

## 3.- Condiciones para la síntesis micorrízica

El medio MH detallado a continuación:

| Macronutrientes                                     | mg/l  |
|-----------------------------------------------------|-------|
| $\text{KNO}_3$                                      | 475   |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$           | 110   |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           | 92,5  |
| $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$                     | 42,5  |
| $\text{NO}_3\text{NH}_4$                            | 412,5 |
| Micronutrientes                                     |       |
| $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$    | 6,96  |
| $\text{Na}_2\text{EDTA}$                            | 9,31  |
| $\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$    | 5,57  |
| $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$    | 2,15  |
| $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$    | 0,006 |
| $\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$    | 0,006 |
| KI                                                  | 0,21  |
| $\text{BO}_3\text{H}_3$                             | 1,55  |
| $\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,06  |
| Vitaminas                                           |       |
| Tiamina HCl                                         | 0.1   |
| Ac. Nicotínico                                      | 0.5   |
| Piridoxina HCl                                      | 0.5   |
| m-Inositol                                          | 100   |
| Sacarosa                                            | 15g/l |

## Vitaminas

Agar 7g/l

junto con 7  $\text{g.l}^{-1}$  de agar Panreac y con el pH ajustado a 7.0 se calentó a baño maría, con el fin de fundir el agar. Una vez fundido, se vertió en tubos de 2,5 cm de diámetro y 20 cm de longitud; en cada tubo se pusieron 25 ml de medio.

Seguidamente se autoclavó a  $120^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. Una vez solidificado, en la cámara de flujo laminar, se introducen las plántulas enraizadas en los tubos, con cuidado de no romper las raíces. Seguidamente se cortan dos trocitos, de  $0,25 \text{ cm}^2$ , del micelio crecido en placa, de la parte más externa de la colonia. Estos trozos (2 por tubo) se introducen dentro del tubo y se colocan de forma que la cara que tiene el micelio contacte con la superficie del agar del tubo y lo más cerca posible de donde se encuentran las raíces.

Estos cultivos se mantienen en las mismas condiciones de cámara de crecimiento que las descritas anteriormente.

## 4.- Cálculo del porcentaje de micorrización

La colonización fúngica se visualizó tiñendo las raíces en azul tripán, según el método de Phillips y Hayman [(28) Phillips, J.M. and Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55: 158-161]. El porcentaje de raíces micorrizadas se estimó según el método de Gionvanetti y Mosse [(29) Gionvanetti, M. and Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist 84: 227-230].

## 5.- Transferencia de las plántulas micorrizadas a tierra

Cuando se detectó la micorrización (aproximadamente a los dos meses de la inoculación), se sacaron las plántulas micorrizadas del tubo, se les quitó la parte de agar que no contenía raíces ni micelio y se introdujeron en macetas. Las macetas contenían un sustrato mezcla de turba - vermiculita-arena (1: 1, v/ v) y pH ajustado a 6,5-7, previamente esterilizado mediante tres autoclavados a vapor fluyente, en días alternos, de 1 hora cada uno a  $100^\circ\text{C}$ . Las macetas con las plántulas se recubrieron con bolsas de plástico, saturadas de humedad, y en condiciones de invernadero. A la semana se abrieron pequeños agujeros en las bolsas de plástico, de forma que la humedad relativa fue disminuyendo paulatinamente, hasta que se eliminó totalmente la bolsa de plástico. Esto permitió obtener plántulas perfectamente aclimatadas a los 15-20 días.

## REIVINDICACIONES

1. Método para la micorrización in vitro de plántulas micropropagadas de *Helianthemum* con micelio de *Terfezia clavaryi*, **caracterizado** porque comprende llevar a cabo la micorrización en un sistema in vitro de tubos de ensayo con un medio de cultivo y empleando agar como sustrato, introduciendo plantas de *Helianthemum almeriense* ya enraizadas junto con pequeños trozos de agar conteniendo micelio de *Terfezia clavaryi*, en los tubos de ensayo conteniendo dicho medio el cual tiene la siguiente composición y pH:

| <u>Macronutrientes</u>               | <u>mg/l</u> |
|--------------------------------------|-------------|
| KNO <sub>3</sub>                     | 400-500     |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 100-120     |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 90-100      |
| PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K     | 40-43       |
| NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub>      | 390-415     |
| <u>Micronutrientes</u>               |             |
| SO <sub>4</sub> Fe.7H <sub>2</sub> O | 6-7,5       |
| Na <sub>2</sub> EDTA                 | 8-9,5       |
| SO <sub>4</sub> Mn.4H <sub>2</sub> O | 4,5-6       |

Micronutrientes

|                                                     |             |
|-----------------------------------------------------|-------------|
| SO <sub>4</sub> Zn.7H <sub>2</sub> O                | 2-2,5       |
| SO <sub>4</sub> Cu.5H <sub>2</sub> O                | 0,005-0,007 |
| Cl <sub>2</sub> Co.6H <sub>2</sub> O                | 0,005-0,007 |
| KI                                                  | 0,19-0,22   |
| BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>                      | 1-1,65      |
| MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,04-0,07   |

Vitaminas

|                |           |
|----------------|-----------|
| Tiamina HCl    | 0,08-0,15 |
| Ac. Nicotínico | 0,45-0,55 |
| Piridoxina HCl | 0,45-0,55 |
| m-Inositol     | 80-200    |
| Sacarosa       | 10-20 g/l |
| Agar           | 6-8 g/l   |

pH... 5,8-7,0-7,6

durante unos 2 meses aproximadamente a temperatura ambiente, para conseguir un 75% de la micorrización, aproximadamente.

2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las condiciones de cultivo son: 23 ± 2°C de temperatura, 2.000 lux de luz fluorescente y 16 horas de fotoperíodo.

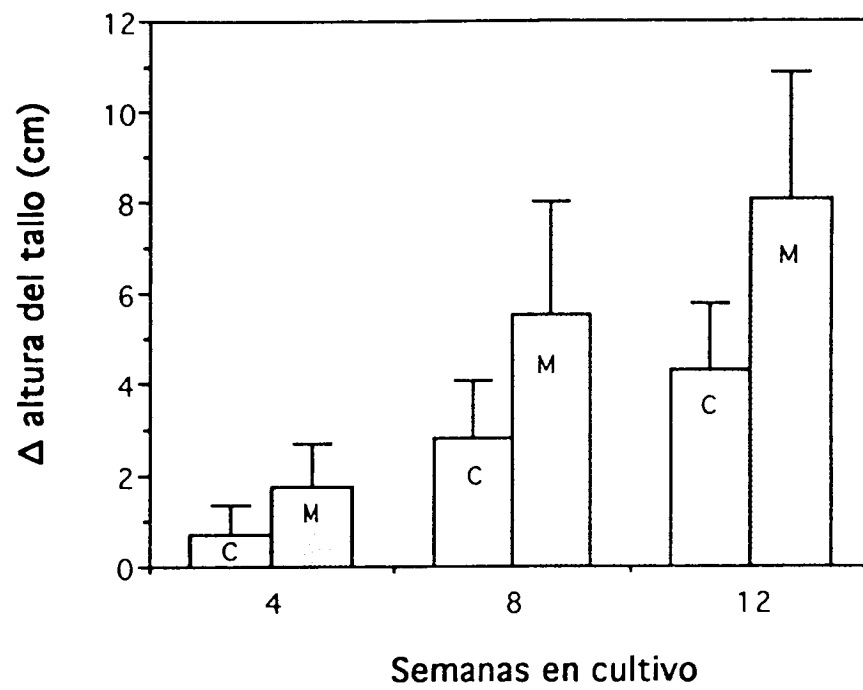


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 088 363  
⑫ N.º solicitud: 9402430  
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 25.11.94  
⑭ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.<sup>6</sup>: A01G 1/04, C12N 1/14

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados                                                                                                                                                                                                                                            | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| A         | MORTE, M.A. et al. In vitro mycorrhization of micropropagated <i>Helianthemum almeriense</i> plantlets with <i>Terfezia clavaryi</i> (desert truffle). Agricultural Science in Finland. 1994, volumen 3, número 3, páginas 309-314                            | 1,2                        |
| A         | FORTAS, Z. & CHEVALIER, G. Effect des conditions de culture sur la mycorrhization de l' <i>Helianthemum guttatum</i> par trois espèces de Terfezia des genres <i>Terfezia</i> et <i>Tirmania</i> d'Algerie. Can. J. Bot., 1992, volumen 70, páginas 2453-2460 | 1,2                        |
| A         | WO-9211752-A (JANERETTE) 23.07.92<br>* Página 3, líneas 18-28; página 4, líneas 1-12; ejemplos *                                                                                                                                                              | 1,2                        |

#### 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 n.º:

|                                              |                                     |               |
|----------------------------------------------|-------------------------------------|---------------|
| Fecha de realización del informe<br>03.07.96 | Examinador<br>Fco. J. Haering Pérez | Página<br>1/1 |
|----------------------------------------------|-------------------------------------|---------------|