

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 999 373**

51 Int. Cl.:

A01H 15/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2015** **PCT/US2015/016815**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015** **WO15127202**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2015** **E 15752886 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2024** **EP 3107376**

54 Título: **Línea de champiñones B12998-s39 y métodos y usos para la misma**

30 Prioridad:

21.02.2014 US 201414186531

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:

25.02.2025

73 Titular/es:

SYLVAN AMERICA, INC. (100.00%)
198 Nolte Drive
Kittanning, PA 16201, US

72 Inventor/es:

KERRIGAN, RICHARD;
WACH, MARK y
SCHULTZ, MICHELLE

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 999 373 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Línea de champiñones B12998-s39 y métodos y usos para la misma

5 **Campo técnico**

[0001] Esta invención se refiere en general al campo del desarrollo de cepas de microorganismos y más particularmente, al desarrollo de una línea homocariota de hongos champiñones. Más específicamente, la presente invención se refiere al desarrollo de un cultivo de hongos del champiñón *Agaricus bisporus* designado línea B12998-s39 y a cultivos descendientes, o derivados de cualquier otra manera, de la línea B12998-s39.

Listado de secuencias

[0002] El archivo de listado de secuencias SYL.P.PC0015 Sequence Listing_ST25.txt que tiene un tamaño de 2073 bytes y fecha de creación del 20 de febrero de 2015 se presentó electrónicamente con la solicitud de patente.

Antecedentes de la invención

[0003] El champiñón comestible *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach var. *bisporus*, un microorganismo perteneciente a los hongos basidiomicetos, se cultiva ampliamente en todo el mundo. En consecuencia, el desarrollo de nuevas cepas o líneas de champiñones híbridos de este hongo champiñón se considera muy deseable para la industria de los champiñones cultivados, en particular si esas nuevas cepas o líneas pueden desarrollarse para proporcionar diversos rasgos deseables dentro de una sola cepa, cultivo, híbrido o línea.

[0004] Por lo tanto, diversas entidades dentro de la industria de los champiñones, incluyendo Sylvan America, Inc., han establecido programas de desarrollo de cepas de champiñones. El objetivo de un programa de desarrollo de cepas de champiñones es combinar, en una sola cepa, cultivo, híbrido o línea, varios rasgos deseables. Las cepas actualmente disponibles para la industria de los champiñones permiten a los productores producir cosechas de champiñones de manera exitosa y rentable. Existen varios factores que influyen en el grado de éxito y rentabilidad alcanzado. Las características de las cepas que son factores que pueden mejorar la rentabilidad del productor incluyen productividad aumentada (mayor rendimiento o tiempo de ciclo más corto), captura acelerada de ingresos (cosecha más temprana), costes reducidos (por ejemplo, mayor facilidad y velocidad de cosecha), mermas reducidas (pérdida de peso antes de la venta), sobrepeso reducido del producto en los paquetes (peso adicional del producto envasado, debido a tamaños particulares de champiñones individuales), consistencia mejorada de las respuestas del rendimiento del cultivo a las variaciones en las materias primas, condiciones y prácticas de crecimiento, rendimiento superior del cultivo en instalaciones particulares, regiones, etc., pérdidas reducidas por enfermedades incluyendo agentes de enfermedad víricos, bacterianos y fúngicos y/o pérdidas reducidas por plagas de insectos y nematodos del cultivo. También existen propiedades mejorables del producto de champiñones que aumentan la demanda en la cadena de distribución y, por lo tanto, el volumen de ventas y/o el precio de venta, tal como un atractivo visual mejorado (coloración, forma, tamaño o textura de la superficie más deseables), características de sabor mejoradas o distintivas, cualidades de conservación mejoradas (mayor persistencia de los atributos visuales deseables), etc. Aún otras mejoras pueden aumentar la idoneidad del cultivo de champiñones para la cosecha mecánica, el enlatado y/o el procesamiento de alimentos. Por lo tanto, hay muchas características por las cuales una nueva cepa podría ser juzgada como superior en una instalación de producción o mercado de ventas particular, o en la industria a nivel regional o global. Todas estas características pueden evaluarse usando técnicas bien conocidas en la materia.

[0005] Las cepas nuevas se desarrollan lo más preferible y exitosamente a partir de hibridaciones únicas entre líneas homocariotas, incluyendo líneas nuevas. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de nuevas líneas que puedan usarse para producir nuevas cepas híbridas de cultivos de champiñón *Agaricus bisporus* y microorganismos que proporcionan características mejoradas para la rentabilidad del productor y para obtener productos de champiñones mejorados en comparación con otras cepas anteriores de *Agaricus bisporus*.

[0006] También existe la necesidad de cepas de *A. bisporus* comercialmente aceptables con genotipos diferentes, con respecto a los de otras cepas marrones comerciales actualmente disponibles y grupos de linajes derivados, particularmente aquellos del grupo Old Fashioned Brown (OFB) y la cepa Heirloom, por dos razones. En primer lugar, se sabe que el uso de cepas incompatibles con cepas de las cepas comerciales comunes y sus grupos de linajes derivados retarda la propagación de enfermedades víricas entre cultivos de diferentes cepas. El fenotipo de incompatibilidad puede evaluarse usando técnicas bien conocidas en la materia. En segundo lugar, se entiende bien que cuando una industria de cultivos agrícolas depende en gran medida de un solo linaje genético (es decir, crea un monocultivo comercial como el que existe actualmente para el linaje U1 de sombrero blanco de *A. bisporus*, y que pueden existir para la cepa Heirloom de sombrero marrón), existe un mayor riesgo de fallos impredecibles y catastróficos de los cultivos a escala de toda la instalación o incluso de toda la industria. Por lo tanto, desde una perspectiva de gestión de riesgos y seguridad alimentaria, es altamente deseable proporcionar simultáneamente diversificación genética y características y rendimiento de los cultivos comercialmente aceptables. El uso de líneas

novedosas que incorporan ADN de cepas no cultivadas proporciona una importante diversificación genética del conjunto de cepas usadas para producir cultivos de champiñones *A. bisporus* cultivados.

[0007] Los cultivos son el medio por el cual los desarrolladores de cepas de champiñones preparan, mantienen y propagan sus microorganismos. Los cultivos de *Agaricus*, al igual que los de otros microorganismos, se preparan, se mantienen, se propagan y se almacenan en medios estériles usando diversos métodos y técnicas de laboratorio microbiológico. Se usan herramientas estériles y técnicas asépticas en salas limpias o campanas de transferencia estériles para manipular células de cultivos puros para diversos fines incluyendo la propagación clonal y para el desarrollo de nuevas cepas usando diversas técnicas. Los inóculos de cultivos comerciales que incluyen “inóculos” de champiñones e “inóculos de revestimiento” también se preparan usando métodos de producción microbiológica a gran escala y se proporcionan al usuario final como cultivos puros contenidos en envases estériles.

[0008] Uno de los usos de dichos cultivos es la producción de champiñones. Los champiñones se cultivan comercialmente dentro de estructuras construidas especialmente en granjas especializadas. Si bien existen muchas variaciones en los métodos, la siguiente descripción es típica. El compost preparado a partir de material lignocelulósico tal como paja, aumentado con material nitrogenado, se termina y se pasteuriza en una instalación adecuada. El inóculo del champiñón, que comprende un “sustrato portador” friable esterilizado sobre el cual se ha incorporado asépticamente un cultivo puro de una cepa de champiñones a través de un inóculo y después se ha propagado, se mezcla con el compost pasteurizado y se incuba durante aproximadamente 13 a aproximadamente 19 días a una temperatura controlada, tiempo durante el cual el micelio del cultivo del champiñón coloniza toda la masa de compost y comienza a digerirlo. Después se coloca una “capa de revestimiento” no nutritiva de material tal como turba sobre el compost hasta una profundidad de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2 pulgadas). Puede incorporarse a la capa de revestimiento un “inóculo de revestimiento” adicional que incorpore el mismo cultivo de champiñones para acelerar la formación y la cosecha de champiñones y mejorar la uniformidad de la distribución del micelio y los champiñones dentro y sobre la superficie del revestimiento. Las condiciones ambientales, incluyendo la temperatura y la humedad, en las instalaciones de cultivo se gestionan después cuidadosamente para promover y controlar la transición del cultivo del crecimiento vegetativo al reproductivo en la interfaz revestimiento/aire. En unos aproximadamente 13 a aproximadamente 18 días adicionales después del revestimiento, los champiñones se habrán desarrollado hasta la etapa correcta para su cosecha y venta. Se recolectará una cosecha de champiñones que comprenda el cultivo original durante un período de 3 a 4 días. Aparecen nuevas descargas de champiñones a intervalos de aproximadamente una semana. Comercialmente, se producen y se cosechan dos o tres descargas de champiñones antes de retirar el compost y reemplazarlo en la instalación de cultivo.

[0009] *Agaricus bisporus* tiene un síndrome reproductivo conocido como anfitalismo, en el cual dos ciclos de vida distintos funcionan simultáneamente. Como en otros hongos, el propágulo reproductivo es una espora. *Agaricus* produce esporas meióticamente, en un meiosporangio conocido como un basidio. En un primer ciclo de vida, las esporas de *A. bisporus* reciben cada una un único núcleo postmeiótico haploide; estas esporas son competentes para el cruzamiento pero no son competentes para producir champiñones. Estas esporas haploides germinan para producir descendencia o líneas homocariotas que pueden cruzarse con otros homocariotas compatibles para producir nuevos heterocariotas híbridos que son competentes para producir champiñones. Los heterocariotes generalmente presentan mucha menos capacidad para cruzarse que los homocariotes. Este primer ciclo de vida se llama heteromixis o, más comúnmente, exogamia. Este ciclo de vida funciona pero normalmente no predomina en cepas de *Agaricus bisporus* var. *bisporus*.

[0010] Un segundo ciclo de vida endogámico llamado intramixis predomina en la mayoría de cepas de *Agaricus bisporus* var. *bisporus*. La mayoría de las esporas reciben dos núcleos postmeióticos y la mayoría de estos pares de núcleos consisten en pares nucleares no hermanos (NSNP, por sus siglas en inglés) que tienen un genotipo heteroalélico en la mayoría o en todos los locus ligados centroméricos incluyendo el locus MAT. Ese genotipo MAT determina el fenotipo heterocariota de esta descendencia, que son reproductivamente competentes y pueden producir una cosecha de champiñones. De manera inusual entre los eucariotas, se ha observado que ha ocurrido relativamente poco entrecruzamiento cromosómico en la descendencia postmeiótica de *Agaricus bisporus*; empíricamente, se pierde muy poco heteroalelismo (análogo a la heterocigosidad) entre la descendencia heterocariota de una cepa heterocariota. En consecuencia, los genotipos y fenotipos heterocariotas precursores y de la descendencia tienden a parecerse mucho entre sí, como se señaló anteriormente. Por esta razón, la derivación esencial, por ejemplo, la producción de variedades esencialmente derivadas (EDV, por sus siglas en inglés), es una técnica de desarrollo de cepas familiar entre los productores comerciales de inóculo de champiñones.

[0011] Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevas líneas de *Agaricus bisporus* que cumplan las necesidades y los deseos de los productores, comercializadores y consumidores de champiñones.

Resumen de la invención

[0012] La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Cualquier referencia a un “aspecto o aspectos de la descripción” indica que la descripción a la que se hace referencia no forma parte de la invención reivindicada. La presente invención está dirigida en general a una línea homocariota de *Agaricus bisporus* nueva y distinta designada B12998-s39 y a procesos para usar la línea designada B12998-s39. Un depósito de un cultivo de la línea B12998-s39 de *Agaricus bisporus*, según se describe en la presente memoria, se ha realizado con la Colección de Cultivos de Servicios de Investigación Agrícola (NRRL) 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604 EE.UU. La fecha de

depósito fue el 7 de febrero de 2014. El cultivo depositado fue tomado del mismo cultivo mantenido por Sylvan America, Inc., Kittanning, Pennsylvania, EE.UU., el cesionario registrado, desde antes de la fecha de presentación de esta solicitud. Se han eliminado todas las restricciones sobre el depósito, y el depósito tiene previsto cumplir con todos los requisitos de depósito de la Oficina de Patentes y Marcas de los EE.UU., incluyendo 37 C.F.R. Sec. 1.801-1.809, y todos los requisitos de depósito bajo el Tratado de Budapest. El número de registro de NRRL es 50899. El depositado se mantendrá en el depósito durante un período de 30 años, o 5 años después de la última solicitud, o durante la vida efectiva de la patente, lo que sea mayor, y se reemplazará según sea necesario durante ese período. El cultivo se pondrá a disposición del público de manera irrevocable y sin restricciones ni condiciones al momento de la presentación de la solicitud de patente o al momento de la emisión de una patente, según lo exijan las leyes de patentes aplicables.

[0013] Los usos del cultivo de la línea de champiñones B12998-s39 incluyen, entre muchas otras cosas, la producción de cultivos de champiñones híbridos que incorporan la línea B12998-s39, la producción de champiñones a partir de cultivos que incorporan la línea B12998-s39, la producción de partes de champiñones a partir de cultivos que incorporan la línea B12998-s39. Otros usos incluyen procesos para elaborar un cultivo de champiñones que comprende el cruce de *Agaricus bisporus* línea B12998-s39 homocariota con otro cultivo de champiñones y procesos para elaborar un cultivo de champiñones que contenga en su material genético uno o más rasgos introgresados en la línea B12998-s39 a través de conversión o transformación introgresiva de rasgos, y a los cultivos de champiñones, champiñones y partes de champiñones producidos por dicha introgresión. Además, la invención puede incluir un cultivo de champiñones, champiñón, parte de champiñón, que incluye una espora, o una parte de cultivo híbridos producidos mediante el cruce de la línea homocariota B12998-s39, o una conversión de rasgos introgresados de la línea B12998-s39, con otro cultivo de champiñones. Otros usos de la presente invención incluyen la producción de líneas de champiñones homocariotas derivadas de la línea de champiñones B12998-s39, así como los procesos para producir otras líneas de champiñones homocariotas derivadas de la línea de champiñones B12998-s39, y la producción de líneas de champiñones endogámicas y sus partes derivadas mediante el uso de esos procesos.

[0014] Con respecto a las esporas, las esporas vivas son heterocariontes u homocariontes en estado latente. Las esporas son una parte del organismo champiñón. Otras partes incluyen células (definidas como compartimentos hifales que incorporan núcleos, mitocondrias, citoplasma, una membrana celular y una pared celular que incluye paredes transversales), hifas y micelio. Las esporas pueden recolectarse asépticamente en material estéril, suspenderse en agua estéril en diversas diluciones y sembrarse en medios de crecimiento de agar estéril para producir esporas germinadas y cultivos incorporados dentro de las esporas. Una técnica preferida es tener dentro de la placa de Petri encerrada un cultivo vivo de *Agaricus* que pueda estimular la germinación de las esporas mediante la difusión de una feromona volátil. Las esporas germinadas pueden aislarse bajo un microscopio usando microherramientas estériles tales como agujas de acero, sobre placas de agar nutritivo fresco. Usando este método, pueden obtenerse descendientes heterocariotas y homocariotas de una cepa heterocariota que comprende las esporas y los cultivos incorporados dentro de las esporas de la cepa heterocariota.

[0015] El desarrollo de nuevas variedades híbridas mediante heteromixis comprende la asociación controlada y el cruce de dos cultivos compatibles para obtener un nuevo cultivo de heterocariontes. Los homocariontes (=líneas) son los cultivos iniciales preferidos para realizar cruces ya que tienen la máxima capacidad de anastomosarse y lograr plasmogamia con otros cultivos. También pueden confrontarse heterocariontes pero con probabilidades irrazonablemente bajas comercialmente de que un cruce dé como resultado la formación exitosa de un nuevo heterocarionte. La compatibilidad está determinada por el genotipo en el locus MAT; dos homocariontes con el mismo alelo MAT no pueden establecer un heterocarionte después de la anastomosis. En un programa de cruce definido, se obtienen líneas homocariotas y se asocian en combinaciones de pares predeterminadas. En un método, los pares de homocariontes pueden colocarse muy cerca en la superficie de un medio de agar nutritivo en una placa de Petri y dejarse crecer juntos (en una asociación física), momento en el cual se producen anastomosis entre los dos cultivos. Un resultado exitoso es un cruce. El nuevo heterocarionte híbrido puede obtenerse transfiriendo micelio desde la zona de fusión de la placa. Este método de cruce por pares se usó para desarrollar cepas heterocariotas híbridas a partir de la línea B12998-s39.

[0016] Por el contrario, las Variedades Esencialmente Derivadas (EDV) suelen derivar directamente de un único cultivo inicial (por ejemplo, cepa); todas estas derivaciones producen EDV. No existe una definición universalmente aceptada de EDV; un ejemplo de una definición aplicable a las variedades vegetales lo proporciona la Ley de Protección de Variedades Vegetales de los Estados Unidos (edición revisada, febrero de 2006). La definición empleada en la presente memoria es congruente con el término como se entiende ampliamente. Los métodos de 'derivación esencial' para obtener cultivos que son, por definición, EDV de un único cultivo inicial de *A. bisporus* incluyen selección somática, selección mediante cultivo de tejidos, germinación de esporas únicas, germinación de esporas múltiples, autofecundación, cruce repetido con el cultivo inicial, mutagénesis y transformación, para proporcionar algunos ejemplos. La transformación mediada por ADN de *A. bisporus* se ha informado por Velcko, A. J. Jr., Kerrigan, R. W., MacDonald, L. A., Wach, M. P., Schlagnhaufer, C. y Romaine, C. P. 2004, Expression of novel genes in *Agaricus bisporus* using an *Agrobacterium-mediated* transformation technique. Mush. Sci. 16: 591-597 y las referencias en el mismo. La transformación puede introducir un solo gen o alelo nuevo en el genoma de un cultivo inicial.

[0017] Las EDV se reconocen inequívocamente por su genotipo, que será total o predominantemente un subconjunto de aquel cultivo inicial único. Los porcentajes del genotipo inicial que estará presente en *Agaricus bisporus* las EDV varían desde casi el 100 % en el caso de selecciones somáticas, hasta el 99,x % en el caso de

cepas modificadas por transformación mediada por ADN, hasta el 90-99,x % en el caso de selecciones de esporas simples o múltiples o alguna mutagénesis, hasta un promedio de aproximadamente el 75 a aproximadamente el 85 % en el caso de cruces entre hermanos descendientes (= autofecundación), hasta el 75 % en promedio en un retrocruzamiento de primera generación. Pueden emplearse muchos métodos de determinación del genotipo, incluyendo métodos descritos a continuación y otros bien conocidos en la técnica, para determinar el porcentaje de ADN de un cultivo inicial que está presente en otro cultivo. En la presente invención, las EDV tienen al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo de la cepa B12998-s39.

[0018] Finalmente, se entenderá que “derivación” no incluye “descendencia por cruce” y que “derivación” y “descendencia” son dos conceptos completamente diferentes que no deben confundirse. Además, una EDV debe, axiomáticamente, tal cual se entiende bien en la técnica, solo obtenerse con posterioridad en el tiempo y en la ejecución del proceso a la variedad o cepa inicial.

[0019] Las huellas genotípicas son descripciones del genotipo en locus definidos, donde se registra la presencia de alelos caracterizados. Estas huellas dactilares proporcionan técnicas poderosas y efectivas para reconocer clones y todo tipo de EDV de una cepa inicial, así como para reconocer la ascendencia dentro de linajes exogámicos. Existen muchas técnicas disponibles para definir y caracterizar locus y alelos en el genotipo. El enfoque más detallado lo proporciona la secuenciación del genoma completo (WGS), que permite la caracterización directa y la comparación de secuencias de ADN a lo largo de todo el genoma. Usando este enfoque para generar huellas genotípicas robustas que incorporan un gran número de locus marcadores, es posible establecer la naturaleza de la relación entre dos cepas, incluyendo cepas relacionadas por descendencia genealógica a lo largo de varias generaciones. Sylvan America, Inc. ha rastreado marcadores genéticos a lo largo de cuatro a seis generaciones de sus pedigrís de reproducción. Si hay una cantidad suficiente de marcadores raros en una cepa o línea inicial, será posible identificar la descendencia de una cepa o línea inicial después de varias generaciones exogámicas sin experimentación indebida. En un ejemplo hipotético, la expectativa media de representación genómica de una línea haploide inicial después de 4 generaciones exogámicas es del 3,1 % en un híbrido F4, lo que corresponde a aproximadamente 1 Mb del ADN genómico nuclear de *A. bisporus*. Basándose en los análisis de Sylvan America, esa cantidad de ADN de cada una de dos cepas no relacionadas de *A. bisporus* puede contener de forma típica entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 20.000 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), cualquiera de los cuales puede proporcionar un marcador distintivo que vincule el híbrido F4 con la línea inicial. Al usar múltiples marcadores independientes, pueden identificarse los ancestros de una cepa con una probabilidad muy alta de éxito y con alta confianza.

[0020] Las ventajas de la presente invención sobre la técnica anterior existente relacionada con los champiñones y cultivos de *Agaricus bisporus*, que se desprenderán de la descripción que sigue se consiguen mediante la invención tal como se describe y se reivindica a continuación.

[0021] Uno o más aspectos de la presente invención pueden proporcionarse por un cultivo de champiñones *Agaricus bisporus* que incluye al menos un conjunto de cromosomas de una línea B12998-s39 de *Agaricus bisporus*, habiéndose depositado el cultivo de la línea B12998-s39 bajo el Número de Registro de NRRL 50899, en donde dichos cromosomas comprenden todos los alelos de la línea B12998-s39 en los locus marcadores caracterizados por secuencia que figuran en la Tabla I a continuación. En una realización, el cultivo puede ser el de la propia línea B12998-s39. En otras realizaciones, el cultivo anterior puede ser un cultivo de champiñones *Agaricus bisporus* híbrido F1 producido cruzando el cultivo de la línea B12998-s39 con un cultivo de *Agaricus bisporus* diferente, o un cultivo que tenga al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo de dicho cultivo híbrido F1. Por lo tanto, se apreciará que, en una realización, una parte del cultivo de la línea B12998-s39 anterior puede seleccionarse del grupo que consiste en hifas, esporas y células, estando cada parte presente en el micelio vegetativo del cultivo o en champiñones producidos por el cultivo, o en ambos. En uno o más aspectos de la descripción, una parte del cultivo de champiñones híbrido o EDV puede seleccionarse del grupo que consiste en ADN, ARN y proteínas, en donde el ADN incluye los mismos caracteres alélicos que están presentes en la línea B12998-s39 como se describe para los alelos en los locus marcadores ITS, p1n150-G3-2, MFPC-1-ELF, AN, AS y FF y en una columna etiquetada B12998-s39 de la Tabla I a continuación en la presente memoria, en donde un cultivo de la línea B12998-s39 se depositó bajo el Número de Registro de NRRL 50899, y en donde dicho ARN y proteínas han expresado caracteres de secuencia correspondientes a y determinados por los caracteres alélicos del ADN.

[0022] Además, en otras realizaciones, el cultivo de la línea B12998-s39 anterior puede incorporarse en productos seleccionados de micelio, prole, inóculo, inóculo de revestimiento, champiñones frescos, champiñones procesados, trozos de champiñones y sustratos colonizados que incluyen grano, compost y materia particulada friable. En otras realizaciones, el cultivo de champiñones híbridos F1 o el cultivo que tiene al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo de *Agaricus bisporus* anterior puede procesarse en uno o más productos seleccionados del grupo que consiste en micelio, prole, inóculo, inóculo de revestimiento, champiñones frescos, champiñones procesados, trozos de champiñones y sustratos colonizados que incluyen grano, compost y materia particulada friable. En otras realizaciones, puede producirse un champiñón cultivando una cosecha de champiñones a partir del cultivo de champiñones híbridos F1 mencionado anteriormente. En otras realizaciones, se produce un cultivo que tiene al menos un conjunto de cromosomas que comprende un conjunto de alelos que son total o predominantemente un subconjunto de los de la línea B12998-s39, como se

detalla en las Tablas I y II a continuación. En otras realizaciones adicionales, se produce un cultivo que tiene al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo del cultivo de la línea B12998-s39. En otras realizaciones más, se produce un cultivo que tiene al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo del cultivo de champiñones híbrido F1 anterior. Como se señala en las definiciones, la Variedad Esencialmente Derivada (EDV) tiene al menos el 99 % del genoma o genotipo que está presente en el genoma o genotipo del cultivo inicial. Como se establece en esta invención, las realizaciones del cultivo inicial pueden incluir (a) la línea B12998-s39, (b) el cultivo híbrido F1 que incorpora la línea B12998-s39, (c) un cultivo que tiene al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo de la línea B12998-s39 o (d) un cultivo que tiene al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo del cultivo híbrido F1 que incorpora la línea B12998-s39, en donde un cultivo de la línea B12998-s39 se ha depositado bajo el Número de Registro de NRRL 50899. En otras realizaciones, el cultivo que tiene al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo es un cultivo derivado de (1) un único cultivo inicial de la línea B12998-s39, (2) un cultivo que tiene al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo de un único cultivo inicial de la línea B12998-s39, (3) el híbrido F1 de (1) o (2), o (4) un cultivo que tiene al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo de (1), (2) o (3), en donde un cultivo de la línea B12998-s39 se ha depositado con el Número de Registro de NRRL 50899.

[0023] Uno o más aspectos diferentes de la presente invención pueden proporcionarse mediante un proceso para introducir un rasgo deseado en un cultivo de *Agaricus bisporus* línea B12998-s39. Un proceso tal puede iniciarse (1) cruzando el cultivo de la línea B12998-s39 con un segundo cultivo de *Agaricus bisporus* que tenga el rasgo deseado, para producir un híbrido. El proceso avanza además (2) obteniendo una descendencia que lleva al menos un gen que determina el rasgo deseado del híbrido producido anteriormente. El proceso incluye además (3) cruzar la descendencia del híbrido con el cultivo de la línea B12998-s39 para producir un nuevo híbrido y (4) repetir las etapas de (2) obtener y (3) cruzar al menos una vez para producir un híbrido posterior. Es decir, la etapa (4) puede repetirse hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 veces. En otras realizaciones, la repetición de las etapas (2) y (3) puede ocurrir más de 10 veces. Al completar la etapa (4), el proceso proporciona después (5) la obtención de una línea homocariota que lleva al menos un gen que determina el rasgo deseado y comprende al menos el 75 % de los alelos de la línea B12998-s39 en los locus marcadores caracterizados por secuencia descritos en la Tabla I, a partir del híbrido posterior de la etapa (4). En una realización, la línea homocariota obtenida puede comprender el 80 % de los alelos de la línea B12998-s39 en los locus marcadores caracterizados por secuencia descritos en la Tabla I. En otras realizaciones, la línea homocariota obtenida puede comprender el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o puede comprender esencialmente el 100 % de los alelos de la línea B12998-s39 en los locus marcadores caracterizados por secuencia descritos en la Tabla I.

[0024] Uno o más aspectos adicionales de la presente invención pueden proporcionarse mediante un proceso de producción de un cultivo de champiñones híbridos. El proceso incluye cruzar un primer cultivo de champiñones con un segundo cultivo de champiñones, en donde al menos uno del primer y segundo cultivo de champiñones es un cultivo de *Agaricus bisporus* designado como línea B12998-s39 o un cultivo que tiene al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo de la línea B12998-s39, en donde el cultivo de dicha línea B12998-s39 se depositó bajo el Número de Registro de NRRL 50899. En una realización, se produce un cultivo híbrido mediante este proceso. En otra realización, al menos uno del primer y el segundo cultivos de champiñones es un cultivo de *Agaricus bisporus* designado línea B12998-s39, en donde el cultivo de dicha línea B12998-s39 se depositó bajo el Número de Registro de NRRL 50899. En otra realización más, un champiñón híbrido, o sus partes, pueden producirse cultivando una cosecha de champiñones a partir del cultivo híbrido anterior. En otra realización más, una parte del cultivo híbrido anterior puede seleccionarse del grupo que consiste en hifas, champiñones, esporas y células. En otras realizaciones, el cultivo híbrido de *Agaricus bisporus* anterior puede incorporarse en uno o más productos seleccionados del grupo que consiste en micelio, prole, inóculo, inóculo de revestimiento, champiñones frescos, champiñones procesados, trozos de champiñones y sustratos colonizados que incluyen grano, compost y materia particulada friable.

[0025] Aún uno o más aspectos adicionales de la presente invención pueden ser proporcionados por un cultivo de *Agaricus bisporus* que tiene las características fisiológicas y morfológicas esenciales de la línea B12998-s39, en donde el cultivo de dicha línea B12998-s39 fue depositado bajo el Número de Registro de NRRL 50899. En una realización, el cultivo puede tener todas las características fisiológicas y morfológicas de la línea B12998-s39 o un cultivo que tiene al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo de la línea B12998-s39. En otras realizaciones, el cultivo puede incluir un perfil de marcador según el perfil de marcador de la línea B12998-s39 que se muestra en la Tabla I. En una o más realizaciones, el cultivo anterior proporciona una célula. En una o más realizaciones, la célula anterior puede incluir un perfil de marcador según el perfil de la línea B12998-s39 que se muestra en la Tabla I. En otras realizaciones, una espora puede comprender la célula anterior. En otras realizaciones, el cultivo híbrido anterior puede definirse además como aquel que tiene un genoma que incluye una conversión de rasgo de un solo locus. En otras realizaciones, el locus anterior puede seleccionarse del grupo que consiste en un alelo dominante y un alelo recesivo. En una o más de otras realizaciones, el locus anterior puede conferir un rasgo seleccionado del grupo que consiste en tamaño del champiñón, forma del champiñón, redondez del sombrero del champiñón, grosor de la pulpa del champiñón, color del champiñón, textura de la superficie del champiñón, suavidad del sombrero del champiñón, densidad del tejido, firmeza del tejido, maduración retardada, número de esporas basiales mayor que dos, ausencia de esporas, contenido aumentado de materia seca, período de validez aumentado, abolladura reducida, rendimiento aumentado, distribución modificada del rendimiento a lo largo del tiempo, intervalo disminuido entre inóculo y recolección, resistencia a la infección por síntomas o

transmisión de enfermedades bacterianas, víricas o fúngicas, resistencia a insectos, resistencia a nematodos, facilidad de manejo del cultivo, idoneidad del cultivo para cosecha mecánica, enlatado y/o procesamiento, respuesta conductual deseada a las condiciones ambientales, a los factores estresantes, a la composición del sustrato de nutrientes, a las influencias estacionales y a las prácticas agrícolas.

[0026] Uno o más aspectos adicionales de la presente invención pueden proporcionarse mediante un método de producción de un cultivo de champiñones. El método incluye (a) hacer crecer un cultivo de descendencia producido mediante el cruce de un primer cultivo de la línea B12998-s39, en donde el cultivo de dicha línea B12998-s39 se depositó bajo el Número de Registro de NRRL 50899, con un segundo cultivo de *Agaricus bisporus*; (b) cruzar el cultivo de descendencia consigo mismo o con un cultivo diferente para producir un cultivo de descendencia de una generación posterior; (c) cultivar un cultivo de descendencia de una generación posterior y cruzar el cultivo de descendencia de una generación posterior consigo mismo o con un cultivo diferente; y (d) repetir las etapas (b) y (c) durante 0, 1, 2, 3, 4 o 5 (es decir, 0-5) generaciones adicionales para producir un cultivo de champiñones. En una realización, el primer cultivo tiene todas las características fisiológicas y morfológicas de la línea B12998-s39. En otra realización, el método incluye cruzar un cultivo de la línea B12998-s39 con un cultivo de una segunda línea homocariota. En otras realizaciones más, el cultivo de champiñones producido anteriormente es un cultivo endogámico. En una o más realizaciones adicionales, el método anterior puede incluir además la etapa de cruzar el cultivo endogámico con un segundo cultivo distinto para producir un cultivo híbrido F1.

[0027] Uno o más aspectos adicionales más de la presente invención pueden proporcionarse mediante un método para desarrollar un segundo cultivo en un programa de desarrollo de cepas de champiñones. Un método tal incluye la aplicación de técnicas de desarrollo de cepas de champiñones a un primer cultivo de champiñones, o partes del mismo, en donde el primer cultivo de champiñones es un cultivo de la línea B12998-s39 o un cultivo que tiene al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo de la línea B12998-s39 que tiene las características fisiológicas y morfológicas esenciales de la línea B12988-s39, en donde el cultivo de dicha línea B12998-s39 fue depositado bajo el Número de Registro de NRRL 50899. En una realización, el cultivo es el de la propia línea B12998-s39. En otra realización, el cultivo de la línea B12998-s39 o un cultivo que tiene al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo de la línea B12998-s39 que tiene todas las características fisiológicas y morfológicas de la línea B12988-s39. Es la aplicación de las técnicas de desarrollo de cepas de champiñones lo que da como resultado el desarrollo del segundo cultivo. Estas técnicas conocidas de desarrollo de cepas de champiñones se seleccionan del grupo que consiste en endogamia, exogamia, autofecundación, conversiones de rasgos introgresivos, derivación esencial, reproducción asistida por pedigrí, selección asistida por marcadores y transformación.

[0028] Finalmente, otro aspecto de la presente invención puede proporcionarse mediante un método de desarrollo de cepas de champiñones. Este método incluye la obtención de un perfil de marcador molecular de la línea de champiñones *Agaricus bisporus* B12998-s39, cuyo cultivo fue depositado bajo el número de Registro de NRRL 50899. Otra etapa del método incluye la obtención de un cultivo híbrido F1, para lo cual el cultivo de champiñones depositado de la línea de champiñones *Agaricus bisporus* B12998-s39 es un precursor. Una vez obtenido el cultivo híbrido F1, se emplea una etapa adicional de cruce de un cultivo obtenido del cultivo híbrido F1 con un cultivo de champiñones diferente. Una vez hecho esto, puede realizarse la selección de la descendencia que posea características del perfil de marcadores moleculares de la línea B12998-s39 como se indicó anteriormente para completar el método usando técnicas conocidas.

Descripción detallada de la invención

[0029] Inicialmente, con el fin de proporcionar una comprensión clara y consistente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluyendo el alcance que debe darse a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

[0030] Alelo: Una unidad hereditaria del genoma en un locus definido, identificado en última instancia por su secuencia de ADN (o por otros medios); en un genotipo, un carácter alélico.

[0031] Anfitalismo: Un síndrome reproductivo en el cual tanto la heteromixis como la intramixis están activas.

[0032] Anastomosis: Fusión de dos o más hifas que logra continuidad citoplasmática.

[0033] Basidiomiceto: Un grupo monofilético de hongos que producen meiosporas en basidios; un miembro de una subdivisión correspondiente de Fungi como los Basidiomycetales o Basidiomycotina.

[0034] Basidio: La célula meiosporangial, en la cual se producen la cariogamia y la meiosis, y tras la que se forman las basidiosporas.

[0035] Bioeficiencia: Para los cultivos de champiñones, el peso fresco neto del cultivo cosechado dividido por el peso seco del sustrato de compost en el momento del inóculo, para cualquier área de cultivo muestreada o peso de compost.

[0036] Reproducción: Desarrollo de cepas, líneas o variedades usando métodos que enfatizan el cruce sexual; véase Descendiente.

[0037] Cepa híbrida tipo BW: Una categoría de cepas iniciales (y sus grupos de linaje derivados) obtenidas por hibridación de una línea precursora de sombrero blanco y una línea precursora de sombrero marrón (es decir, las dos líneas llevan alelos que determinan el color del sombrero blanco o marrón, respectivamente, en el locus *PPC1*), ejemplificado por SC-600, Broncoh, 4x29, J10259, J10261, J10263 y B12998; híbrido tipo BW, cepa BW, BW.

[0038] Sombrero: Píleo; parte del champiñón, la estructura que contiene las laminillas.

[0039] Redondez del sombrero: Estrictamente, una relación entre la distancia máxima entre las partes superior e inferior del sombrero, dividida por la distancia máxima a través del sombrero, medida en un champiñón dividido longitudinalmente; generalmente promediado sobre muchos especímenes; subjetivamente, una propiedad “redondeada” de la forma del sombrero.

[0040] Sustrato portador: Un medio que tiene propiedades físicas y nutricionales adecuadas para lograr tanto el crecimiento como la dispersión de un cultivo.

[0041] Capa de revestimiento, revestimiento: Una capa de material no nutritivo tal como turba o suelo, que se aplica a la superficie superior de una masa de compost colonizado para permitir el desarrollo del cultivo de champiñones.

[0042] Inóculo de revestimiento (CI): Una formulación de material de inóculo que incorpora un cultivo de champiñones, de forma típica de una cepa heterocariota definida, adecuado para mezclar en la capa de revestimiento.

[0043] Clonación: Propagación somática sin selección.

[0044] Capacidad de combinación: La capacidad de un individuo para transmitir rasgos o un rendimiento superior a su descendencia (los métodos de evaluación conocidos y disponibles varían según el rasgo).

[0045] Compatibilidad: Véase *compatibilidad de heterocarionte*.

[0046] Cultivo: El organismo vivo tangible; el organismo se propaga en diversos medios de crecimiento y sustratos; una instancia de una cepa física, línea, homocariote o heterocarionte; la suma de todas las partes del cultivo, incluyendo hifas, champiñones, esporas, células, protoplastos, núcleos, mitocondrias, citoplasma, ADN, ARN y proteínas, membranas celulares y paredes celulares.

[0047] Derivación: Desarrollo de una cepa o cultivo a partir de una única cepa inicial, o predominantemente a partir de una única cepa inicial, en contraste con la descendencia mediante cruce sexual entre dos cepas parentales; véase variedad esencialmente derivada (EDV).

[0048] Grupo de linaje derivado: Una cepa o variedad inicial y el conjunto de EDV derivadas de esa única cepa o variedad inicial.

[0049] Descendiente: La producción de descendencia de dos padres, y/o cuatro abuelos, y/o progenitores adicionales, a través de cruce sexual; en contraste con la derivación de una única cepa inicial.

[0050] Diploide: Que tiene dos complementos cromosómicos haploides dentro de una sola envuelta nuclear.

[0051] Derivación esencial: Un proceso mediante el cual una Variedad esencialmente derivada se obtiene a partir de una variedad o cepa inicial o de una VED de una variedad o cepa inicial; modificación de un cultivo inicial usando métodos que incluyen selección somática, selección por cultivo de tejidos, autofecundación incluyendo reproducción intramítica a través de esporas individuales y esporas múltiples y cruce de líneas de descendencia hermanas, cruce retroactivo con la variedad inicial o mutagénesis y/o transformación genética de la variedad inicial para producir un cultivo distinto en el cual el genotipo del cultivo resultante es predominantemente el del cultivo inicial.

[0052] Variedad esencialmente derivada (VDE): (Nota: Las definiciones de EDV, por ejemplo, como se aplican a las plantas en la PVPA de EE.UU., incorporan elementos de (1) parentesco, (2) métodos de derivación y (3) pruebas empíricas). Una variedad que tiene del 75 % al 99,99999 % de identidad genética con una cepa o variedad inicial, o hasta el 100 % en un heterocarionte con reasociación internuclear de cromosomas. En la presente invención, las EDV tienen al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo de la cepa B12998-s39. En general, una variedad que deriva total o predominantemente de una variedad inicial o de una EDV de una variedad inicial, y que se conforma a características específicas o “esenciales” de la variedad inicial excepto por diferencias distintivas resultantes del acto de derivación, es una EDV de la variedad inicial. En la técnica del desarrollo de cepas de champiñones, una cepa o cultivo derivado predominante o enteramente de una única cepa o cultivo inicial, teniendo por lo tanto la mayor parte o la totalidad, pero al menos el 75 %, de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo de la cepa o cultivo inicial; una cepa o cultivo obtenido a partir de una cepa o cultivo inicial mediante selección somática, selección de cultivo de tejidos, autofecundación incluyendo cruce de líneas de descendientes hermanos y reproducción intramítica mediante esporas simples o múltiples, cruce retroactivo con la cepa o cultivo inicial, o mutagénesis y/o transformación genética de la cepa o cultivo inicial; una cepa o cultivo reconstituido a partir de

neohaplontes derivados de una cepa o cultivo inicial, independientemente de si las líneas haploides se han transmitido a otros heterocariontes o han salido de ellos; una cepa o cultivo con el mismo fenotipo esencial que el de una cepa o cultivo inicial; en contraste con el descendiente (a través del cruce sexual entre dos cepas parentales).

- 5 **[0053]** Grosor de la carne: Una relación entre la distancia máxima entre la parte superior del tallo y la parte más superior del sombrero, dividida por la distancia máxima a través del sombrero, medida en un champiñón dividido longitudinalmente; generalmente promediado sobre muchos especímenes; llamado subjetivamente “carnosidad”.
- 10 **[0054]** Descarga: Un período de producción de champiñones dentro de un ciclo de cultivo, separado por intervalos de no producción; el término descarga engloba los términos “brote” y “oleada” y puede leerse como cualquiera de esos términos.
- [0055]** Hongo: Un organismo clasificado como miembro del Reino Fungi.
- 15 **[0056]** Descendencia genealógica: Descendencia de progenitores, incluyendo los padres, a lo largo de un número limitado (por ejemplo, 10 o menos) de generaciones cruzadas de forma típica; en contraste con la derivación de una única cepa inicial.
- 20 **[0057]** Huella genotípica: Una descripción del genotipo en un conjunto definido de locus marcadores; el genotipo conocido.
- [0058]** Laminilla: Lamela; parte del champiñón, estructura que contiene el himenóforo y el basidio.
- 25 **[0059]** Haploide: Que tiene solo un único complemento de cromosomas nucleares; véase *homocarionte*.
- [0060]** Heteroalélico: Que tiene dos alelos diferentes en un locus; análogo a heterocigoto.
- [0061]** Heteroalelismo: Diferencias entre cromosomas homólogos en un genotipo heterocariota; análogo a heterocigosidad.
- 30 **[0062]** Heterocarionte: Como un término técnico esto se refiere a un heterocarionte sexual: un cultivo que tiene dos tipos complementarios (es decir, necesariamente heteroalélicos en el locus MAT) de núcleos haploides en un citoplasma común y es, por lo tanto, funcional y fisiológicamente análogo a un individuo diploide (pero representado citogenéticamente como N+N en lugar de 2N), y que es potencialmente competente desde el punto de vista reproductivo, y que exhibe reacciones de incompatibilidad propia/no propia con otros heterocariontes; también llamado una cepa o estirpe en el contexto de la reproducción.
- 35 **[0063]** Compatibilidad de heterocarionte: La ausencia de antagonismo observada durante la proximidad física o el contacto entre dos heterocariontes que no son genéticamente idénticos; véase Incompatibilidad de heterocarionte.
- 40 **[0064]** Incompatibilidad de heterocarionte: El fenómeno de antagonismo observado durante la proximidad física o el contacto entre dos heterocariontes que no son genéticamente idénticos; un sistema de reconocimiento propio/no propio de múltiples locus que funciona en heterocariontes basidiomicetos.
- 45 **[0065]** Heterocariota: Que tiene el carácter de un heterocarionte.
- [0066]** Heteromixis: Ciclo de vida que implica el cruce entre dos individuos o gametos haploides diferentes y no hermanos; exogamia.
- 50 **[0067]** Homoalélico: Que no tiene más de un alelo en un locus. El término equivalente en un organismo diploide es “homocigoto”. Las líneas haploides son por definición completamente homoalélicas en todos los locus no duplicados.
- [0068]** Homocarionte: Un cultivo haploide con un único tipo (o linaje somático) de núcleo haploide (citogenéticamente representado como N), y que normalmente es reproductivamente incompetente, y que no exhibe reacciones típicas de incompatibilidad propia/no propia con heterocariontes, y que puede funcionar como un gameto en anastomosis sexualmente complementarias; una “línea” que, al igual que una línea vegetal endogámica, transmite un genotipo uniforme a la descendencia; una línea predominantemente homoalélica que se cruza bien y fructifica mal es un homocarionte putativo para fines de desarrollo de cepas; véase el análisis a continuación.
- 55 **[0069]** Homocariota: Que tiene el carácter de un homocarionte; haploide.
- [0070]** Cepa híbrida tipo HW: Una categoría de cepas obtenidas por hibridación de cepas precursoras, y que tienen un color de sombrero blanco, que también comprende cualquier grupo de linaje derivado que incluya una cepa inicial que también sea una cepa híbrida de tipo HW y sus EDV, ilustradas por las cepas U1, A-15, S-130, AS 2796, AS3003, B7970, J9277, B9798, J10102, J10117, J10165, J11500 y otras; Cepa Hybrid White, híbrido tipo HW, cepa HW, HW.
- 65

[0071] Híbrido: De origen biparental, usualmente se aplica a cepas y cultivos heterocariotas producidos en cruces controlados.

[0072] Hibridación: Asociación física, por ejemplo en una placa de Petri que contiene un medio nutritivo estéril a base de agar, de dos cultivos, usualmente homocariotes, en un intento de lograr anastomosis, plasmogamia y formación de un heterocarionte sexual (= cruce); teniendo éxito en lo anterior.

[0073] Hifas: Elementos filiformes del micelio, compuestos por compartimentos similares a células.

[0074] Endogamia: cruces que incluyen cruces entre líneas hermanas, cruces retrospectivos con líneas o cepas parentales e intramixis; reproducción que involucra a padres que están genéticamente relacionados.

[0075] Incompatibilidad: Véase *incompatibilidad de heterocarionte*.

[0076] Inóculo: Un cultivo en una forma que permite la transmisión y la propagación del cultivo, por ejemplo, a través de nuevos medios; los tipos comerciales especializados de inóculo incluyen micelio y CI; plural, inóculos.

[0077] Intramixis: Un ciclo de vida sexual uniparental que implica la formación de un par de núcleos posmeióticos complementarios “acoplados” dentro del basidio o espóra individual.

[0078] Conversión de rasgos introgresivos: cruce de la descendencia de un híbrido con una línea o cepa parental de tal manera que un rasgo deseado de una cepa se introduce en un trasfondo genético predominante de la otra línea o cepa parental.

[0079] Lamela: véase “laminilla”.

[0080] Línea: Un cultivo usado en cruces para producir una cepa híbrida; ordinariamente un homocarionte que es, por lo tanto, homoalélico, de lo contrario un cultivo no heterocariota (no NSNPP) que es altamente homoalélico; prácticamente, un cultivo funcionalmente homocariota y total o predominantemente homoalélico; análogo a la reproducción de plantas a una línea endogámica que es predominante o totalmente homocigótica.

[0081] Grupo de linaje: véase “grupo de linaje derivado”. El conjunto de EDV derivadas de una única cepa o variedad inicial.

[0082] Locus: Una parte contigua definida del genoma, homóloga aunque a menudo varía entre diferentes genotipos; plural: locus.

[0083] Selección asistida por marcadores: Uso de marcadores genéticos enlazados, incluyendo marcadores moleculares, para rastrear locus de interés que determinan rasgos entre la descendencia y a través de pedigrees.

[0084] MAT: El locus de tipo de cruce, que determina la compatibilidad sexual y el estado heterocariota.

[0085] Cruce: La unión sexual de dos cultivos a través de anastomosis y plasmogamia; los métodos para obtener cruces entre cultivos de champiñones son bien conocidos en la técnica.

[0086] Micelio: El cuerpo vegetativo o talo del organismo champiñón, que comprende hifas filiformes.

[0087] Champiñón: La estructura reproductiva de un hongo agárico; un agárico; un producto alimenticio cultivado del mismo nombre.

[0088] Neohaplonte: Un cultivo o línea haploide obtenido mediante desheterocariotización física (reducción a componentes haploides) de un heterocarionte; un homocarionte obtenido somáticamente.

[0089] OFB: Cepa tipo Old-Fashioned Brown; un grupo de linaje derivado de un cultivar tradicional que se origina a partir de una única cepa silvestre inicial en Europa y que también incluye sus EDV, ejemplificado por las cepas SB-65, SB-295, RWK 2042; cepa OFB, cepa tipo OFB.

[0090] Descendencia: Descendientes, por ejemplo de un heterocarionte progenitor, dentro de una misma generación; usado más frecuentemente para describir cultivos obtenidos a partir de esporas de un champiñón de una cepa.

[0091] Exogamia: cruce entre individuos no emparentados o distantemente emparentados.

[0092] Cepa tipo OW: Una categoría de cepas de cultivares tradicionalmente denominadas cepas “Off-white”, que comprende una cepa inicial y su grupo de linaje derivado, ilustrado por la cepa Somycel 76; cepa OW, OW.

[0093] Precursor: Un progenitor inmediato de un individuo; una cepa parental es un heterocarionte; una línea parental es un homocarionte; un heterocarionte puede ser el progenitor de un heterocarionte F1 a través de una línea precursora intermedia.

5 **[0094]** Reproducción asistida por pedigrí: El uso de información genealógica para identificar combinaciones deseables de líneas en programas de cruce controlado.

[0095] Fenotipo: Características observables de una cepa o línea según se expresan y se manifiestan en un entorno.

10 **[0096]** Plasmogamia: Establecimiento, a través de anastomosis, de la continuidad citoplasmática que conduce a la formación de un heterocarionte sexual.

[0097] Progenitor: Ancestro, incluyendo el precursor (el progenitor directo).

15 **[0098]** Autofecundación: cruce entre líneas hermanas; también intramixis.

[0099] Somático: Del micelio vegetativo.

20 **[0100]** Inóculo (spawn): Un cultivo de champiñones, típicamente un cultivo puro de un heterocarionte, generalmente sobre un sustrato estéril que es materia particulada friable y dispersable, en algunos casos grano de cereal; inóculo comercial para compost; la referencia al inóculo incluye la referencia al cultivo sobre un sustrato.

[0101] Espora: Parte del champiñón, el propágulo reproductivo.

25 **[0102]** Tallo: Estípite; parte del champiñón, la estructura que sostiene el sombrero.

[0103] Medio de crecimiento estéril: Medio nutritivo, esterilizado en autoclave u otros métodos, que soportan el crecimiento del organismo; los ejemplos incluyen medio nutritivo sólido a base de agar tal como el Agar patata dextrosa (PDA), caldo nutritivo y muchos otros materiales.

30 **[0104]** Estípite: véase “tallo”.

[0105] Cepa: Un heterocarionte con características definidas o una identidad o ascendencia específica; equivalente a una variedad.

35 **[0106]** Cepa tipo SW: Una categoría de cepas de cultivares tradicionalmente denominadas cepas “Smooth-white”, que comprende una cepa inicial y su grupo de linaje derivado, ilustrado por la cepa Somycel 53; cepa SW, SW.

[0107] Cultivo de tejido: Un micelio vegetativo desdiferenciado obtenido a partir de un tejido diferenciado del champiñón.

40 **[0108]** Conversión de rasgos: Introducción selectiva de los determinantes genéticos de uno (conversión de un solo locus) o más rasgos deseables en el trasfondo genético de una cepa inicial, conservando la mayor parte del trasfondo genético de la cepa inicial. Véase “Conversión de rasgos introgresivos” y “Transformación”.

45 **[0109]** Transformación: Proceso mediante el cual el material genético transportado por una célula individual se altera mediante la incorporación de ADN extraño (exógeno) a su genoma; un método para obtener una conversión de rasgos que incluye una conversión de un solo locus.

50 **[0110]** Brote de virus: Uso de múltiples cepas incompatibles, es decir, cepas que presentan incompatibilidad de heterocarionte, sucesivamente en un programa de rotación de cepas planificada dentro de una instalación de producción de champiñones para reducir la transmisión del virus desde los reservorios del virus en el sitio a los cultivos recién plantados.

55 **[0111]** Rendimiento: El peso fresco neto del cultivo cosechado, normalmente expresado en kilos por centímetro cuadrado (libras por pie cuadrado).

[0112] Patrón de rendimiento: La distribución del rendimiento dentro de cada descarga y entre todas las descargas; influye en el tamaño, la calidad, los costos de recolección y la presión relativa de las enfermedades sobre el cultivo y el producto.

60 **[0113]** Con respecto a la definición de homocarionte anterior, se observa que los homocariontes y las líneas homoalélicas están sujetos a consideraciones técnicas y prácticas: Un homocarionte en términos clásicos es un cultivo haploide que axiomáticamente es completamente homoalélico. En términos prácticos, para fines de desarrollo de cepas fúngicas, la definición se amplía un poco para dar cabida tanto a las limitaciones técnicas como a la variación citológica, tratando todas las líneas predominantemente homoalélicas como homocariontes. Las limitaciones técnicas incluyen el hecho de que los genomas contienen regiones de ADN duplicadas que incluyen elementos repetidos como transposones,

65

y también pueden incluir grandes duplicaciones de segmentos cromosómicos debido a eventos de translocación históricos. Dos genomas diferentes de *A. bisporus* secuenciados por el Joint Genome Institute, una instalación federal de EE.UU., difieren en la longitud estimada en un 4,4 % y en el número de genes en un 8,2 %, lo que sugiere una cantidad considerable de duplicación o reordenamiento del ADN dentro de diferentes cepas de la especie. Ningún genoma disponible actualmente de *A. bisporus* puede explicar completamente la disposición física de dichos elementos y translocaciones, por lo que las secuencias genómicas ensambladas de líneas haploides pueden tener regiones que parecen ser heteroalélicas usando los métodos de genotificación actualmente disponibles. Citológicamente, una descendencia homocariota normalmente será una espora que recibe un núcleo postmeiótico haploide. Sin embargo, una espora que recibe dos núcleos de tercera división del basidio será genéticamente equivalente a un homocariote. Una espora que recibe dos núcleos postmeióticos “hermanos” de segunda división será un homocariote funcional aunque puedan estar presentes algunas “islas” distales de heteroalelismo debido a entrecruzamientos durante la meiosis. También, una meiosis que tiene una separación asimétrica de homólogos puede producir una espora aneuploide, funcionalmente homocariota, en la cual está presente un cromosoma extra, que produce una región de heteroalelismo. Todos estos cultivos son altamente homoalélicos y todos funcionan como homocariotes. Las limitaciones tecnológicas hacen que no sea práctico distinguir entre dichos cultivos y también descartar la duplicación de segmentos de ADN como explicación de regiones limitadas y aisladas del conjunto de secuencias del genoma que parecen ser heteroalélicas. Por lo tanto, en la presente solicitud, el uso del término “homoalélico” para caracterizar una línea incluye líneas total o predominantemente homoalélicas, y los cultivos descritos de esta manera son homocariotes funcionales, son supuestamente homocariotas y todos se definen como homocariotes en la presente solicitud.

[0114] Ahora, con respecto a la invención y como se señaló anteriormente, la presente invención se refiere a una línea homocariota y, más específicamente, a una línea de *Agaricus bisporus* designada B12998-s39, y a métodos para usar la línea designada B12998-s39. Un cultivo de la línea designada B12998-s39 se ha depositado en la Colección de Cultivos de Servicios de Investigación Agrícola (NRRL) 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604 EE.UU. (“NRRL”) como N.º de Registro 50899.

[0115] La línea de champiñones *Agaricus bisporus* B12998-s39 es un cultivo de basidiomiceto filamentosamente haploide que en el crecimiento vegetativo produce una red ramificada de hifas, es decir, un micelio. El crecimiento puede producir una colonia esencialmente bidimensional en la superficie de un medio solidificado (por ejemplo, basado en agar) o una masa tridimensional en material líquido o de matriz sólida. A continuación se presentan las características morfológicas y fisiológicas de la línea B12998-s39 en cultivo en medio PDA de la marca Difco. La línea B12998-s39 que creció en medio PDA en una placa Petri de 10 cm de diámetro produjo una colonia de color marrón amarillento claro o “bronceado” con un contorno general uniforme y aproximadamente circular que aumentó en diámetro en (0,1-0,2-) 0,3-0,4 (-0,5-0,6) mm/día durante el crecimiento en estado de equilibrio dinámico entre los días 24 y 38 después de la inoculación usando un tapón circular de 6,5-7 mm de diámetro del cultivo en PDA como inóculo. Las hifas del cultivo en PDA de Difco eran irregulares y aproximadamente cilíndricas, median (23-) 34-46 (-90) x (1,8-) 3-4 (-5) um y exhibían una amplia gama de ángulos de ramificación de aproximadamente 10 a 90 grados fuera del eje hifal principal.

[0116] La línea B12998-s39 puede usarse para producir cultivos híbridos con productividad, tiempo, aspecto y otras características agronómicas deseables como se requiere de cepas de champiñones comerciales exitosas, al mismo tiempo que proporciona germoplasma no cultivable más diversificado. Se ha descubierto que la línea B12998-s39 tiene un genotipo ventajoso para el cruce y la producción de cepas híbridas comercialmente útiles. Dos cepas útiles han contribuido al genoma de la cepa híbrida B12998 y su línea derivada B12998-s39. Una de ellas es la cepa blanca tradicional europea denominada Somycel 76, ampliamente cultivada durante el siglo veinte. La otra es una cepa americana de color marrón silvestre designada BP- 1. En combinación, se observó que las diversas contribuciones genéticas de estas dos cepas, presentes entre las líneas homocariotas obtenidas del híbrido B12998, se combinaron en la línea B12998-s39 para producir una línea superior con excelente capacidad de combinación en los cruces.

[0117] La línea B12998-s39 es haploide y, por lo tanto, es completamente homoalélica (aunque pueden estar presentes algunas regiones limitadas de ADN duplicado en su genoma). La línea ha mostrado uniformidad y estabilidad en cultivo. La línea se ha aumentado mediante la transferencia de inóculos puros a volúmenes mayores de medios de cultivo estériles. No se han observado ni se esperan rasgos variantes en la línea B12998-s39.

[0118] Los cultivos de champiñones se identifican de manera más confiable por sus genotipos, en parte porque el mercado exige que las cepas de cultivares exitosas se ajusten a un rango fenotípico estrecho. El genotipo puede caracterizarse a través de un perfil de marcadores genéticos, que puede identificar aislamientos (subcultivos) de la misma línea, cepa o variedad, o una variedad relacionada incluyendo una variedad derivada enteramente de una variedad inicial (es decir, una variedad esencialmente derivada), o puede usarse para determinar o validar un pedigrí.

[0119] Los medios para obtener perfiles de marcadores genéticos usando diversas técnicas incluyendo la secuenciación del genoma completo son bien conocidos en la técnica. Sylvan America, Inc. ha obtenido la secuencia genómica completa de la línea B12998-s39 y, en consecuencia, el Cesionario conoce con certeza aproximadamente el 93 %-95 % (aproximadamente 28 Mb) del genotipo completo de la línea B12998-s39. Sylvan conoce cientos de miles de marcadores que distinguen la línea B12998-s39 de otras líneas, basándose en un análisis de software de las secuencias del genoma completo de varias cepas y líneas. En la Tabla I se

ES 2 999 373 T3

proporciona un breve extracto del genotipo de la línea B12998-s39 en numerosos locus marcadores caracterizados por secuencia distribuidos a intervalos a lo largo de cada uno de los 13 cromosomas.

Tabla I

5

	Marcador:		Cultivo:		
	ID de estructura base	Pos. de Ref.	OWNC (H97)	B12998-S39	B14528
10	scaffold_1	101993	GAAGGACAT	GAAG A ACAT	GAAG A ACAT
	scaffold_1	349966	AAGGTGGTT	AAGG C GGTT	AAGG C GGTT
	scaffold_1	660050	TCACCATGA	TCAC A ATGA	TCAC w ATGA
15	scaffold_1	850014	ATTCCTTTT	ATTC T TTTT	ATTC T TTTT
	scaffold_1	1099971	GTCGACACC	GTCGACACC	GTCG r CACC
	scaffold_1	1353901	AGATAACTA	AGAT G ACTA	AGAT G ACTA
	scaffold_1	1599956	AATAAGCGC	AATAAGCGC	AATAr G CGC
	scaffold_1	1850032	CGAGTAATT	CGAG C AATT	CGAG C AATT
20	scaffold_1	2122001	GGCCAGCGC	GGCC T GCGC	GGCC w GCGC
	scaffold_1	2401751	CGGATAAAT	CGGA A AAAT	CGGA w AAAT
	scaffold_1	2635654	TGCGGTTTG	TGCG A TTTG	TGCG A TTTG
	scaffold_1	2859284	AGGATGACT	AGGA C GACT	AGGAC C GACT
	scaffold_1	3167115	GTCACGATT	GTCAT T GATT	GTCAT T GATT
25	scaffold_1	3256057	TATCTGTTT	TCAAC G TTT	TCAAC G TTT
	scaffold_2	128192	TGGACCAGG	TGGA A AAGG	TGGA mm AGG
	scaffold_2	350156	TCGGGGGTG	TCGG A GGTG	TCGG r GGTG
	scaffold_2	600112	ATGTATACG	ATGT G TACG	ATGT r TACG
30	scaffold_2	850338	TGGTGCTAA	TGGT T CTAA	TGGT r CTAA
	scaffold_2	1099413	CCTGACTCA	CCTG G CTCA	CCTG r CTCA
	scaffold_2	1189976	ACGGCCCAA	ACGG T CCAA	ACGG y CCAA
	scaffold_2	1293936	GTGTTTGTT	GTGT G TGTT	GTGT k TGTT
	scaffold_2	1378074	TCCACTTCA	TTAA T TTCA	TCCA y TTCA
35	scaffold_2	1631290	CCACTGTGC	CCAC C GTGC	CCAC C GTGC
	scaffold_2	1643101	CATCTTCTT	CATC G TCTT	CATC s TCTT
	scaffold_2	1901773	ACTCGAATT	ACTC A AATT	ACTC A AATT
	scaffold_2	2150201	GTCGTAGGT	GTCG A AGGT	GTCG w AGGT
40	scaffold_2	2389428	GGATTTCAA	GGAT G TCAA	GGAT G TCAA
	scaffold_2	2400520	ATGTTATTC	ATGT C ATTC	ATGT C ATTC
	scaffold_2	2403216	CGAATGTTT	CGAA C GTTT	CGAA C GTTT
	scaffold_2	2661539	CTGCAATAA	CTGC G ATAA	CTGC G ATAA
45	scaffold_2	2914560	GGAGGAAAG	GGAG A AAAG	GGAG A AAAG
	scaffold_2	3049515	GAAAAGCTT	GAAAG G CTT	GAAAG G CTT
	scaffold_3	175472	CTTTATTTT	CTTT T TTT	CTTT w TTT
50	scaffold_3	379203	ATAGCGGAA	ATAG A GGAA	ATAG m GGAA
	scaffold_3	614937	CAAAATCTG	CAAA T TCTC	CAAA w TCTG
	scaffold_3	800122	ACGAATAAT	ACGA T AAT	ACGA r AAT
	scaffold_3	1126997	TCAAAGGCC	TCAA G GGCG	TCAA r GGCC
	scaffold_3	1296141	ATCGGTCAT	ATCG A TCAT	ATCG r TCAT
55	scaffold_3	1510819	CCACTGATT	CCAC A GATT	CCAC w GATT
	scaffold_3	1533258	ATCACAGTT	ATCA A AGTT	ATCA A AGTT
	scaffold_3	1774892	CCGTATGGG	CCGT G TGGG	CCGT r TGG
	scaffold_3	2008438	AGCATAGCC	AGCA G AGCC	AGCA k AGCC
	scaffold_3	2274053	AAACCAAGA	AAAC T AAGA	AAAC y AAGA
60	scaffold_3	2384173	TGACCAAGC	TGAC T AAGC	TGAC y AAGC
	scaffold_4	126448	GCTGTTGGT	GCTG G TGGT	GCTG k TGGT
	scaffold_4	378550	AATTTAAGC	AAT C AATGC	AAT yw AwGC
65	scaffold_4	460303	TCCTATAAC	TCCT G TAAAC	TCCT r TAAAC
	scaffold_4	649317	GAGGCAATG	GAGG T AATA	GAGG y AATr
	scaffold_4	878923	GTTCTGATC	GTTC C GACC	GTTC y GAYC
	scaffold_4	1163185	CAAGCTACT	CAA a TACT	CAA rm TACT

ES 2 999 373 T3

a continuación

	scaffold_4	1367522	CTCTGATGT	CTCT A ATGT	CTCT r ATGT
	scaffold_4	1607597	AAAAATCAG	AAAAG T CAG	AAAA r TCAG
	scaffold_4	1889549	ACAACAGAA	ACAACAGAA	ACAACAGAA
5	scaffold_4	2151161	GTGAAACAA	GTGAAACAA	GTGA w ACAA
	scaffold_4	2361458	CGGAATTTT	CGGAATTTT	CGGA r TTTT
	scaffold_5	87962	GATTAAGGG	GATTAAGGG	GATT r AGGG
	scaffold_5	100211	TCCTTGAAT	TCCTTGAAT	TCCT y GAAT
10	scaffold_5	363169	AATGACAAG	AATGACAAG	AATG m CAAG
	scaffold_5	597097	ATGGAAAAA	ATGGAAAAA	ATGG w AAAA
	scaffold_5	851262	TAATTCTCT	TAATTCTCT	TAAT ys TCT
	scaffold_5	1099776	ACATTGACA	ACATTGACA	ACAT y GACA
	scaffold_5	1352539	TTGTGATCC	TTGTGATCC	TTGT kr TCC
15	scaffold_5	1599904	AACTTCCTT	AACTTCCTT	AACT y CCTT
	scaffold_5	1851458	AAATAATCC	AAATAATCC	AAAT wm TCC
	scaffold_5	2100025	CCCTTAGTC	CCCTTAGTC	CCCT y AGTC
	scaffold_5	2278878	GGTCGAAAA	GGTCGAAAA	GGTCGAAAA
20	scaffold_6	106294	GCCATCTCG	GCCATCTCG	GCC Ay CTCr
	scaffold_6	106524	TTGGAGAAC	TTGGAGAAC	TTGGAGAAC
	scaffold_6	350337	CATTTGGTT	CATTTGGTT	CATT y GGTT
	scaffold_6	600047	GGAGCATT	GGAGCATT	GGAG y ATT
25	scaffold_6	849990	AGTTCAGGA	AGTTCAGGA	AGTT y AGGA
	scaffold_6	1098535	CAAAGATTG	CAAAGATTG	CAAA r ATTG
	scaffold_6	1349453	TGTCGGTAG	TGTCGGTAG	TGTC rr TAG
	scaffold_6	1603456	GCGGTACAA	GCGGTACAA	GCGGTACAA
	scaffold_6	1764645	AACCGGATT	AACCGGATT	AACCrGATT
30	scaffold_6	2000087	GATTTTGCG	GATTTTGCG	GATT y TGCG
	scaffold_6	2000920	ACCTTCCAG	ACCTTCCAG	ACCTTCCAG
	scaffold_6	2001839	CTTCAATCA	CTTCAATCA	CTTC r ATCA
	scaffold_7	64927	GATTTCGGAG	GATTTCGGAG	GATTTCGGAG
35	scaffold_7	348994	CCGGAGTTT	CCGG C GTTT	CCGG m GTTT
	scaffold_7	600111	CAATTATTA	CAAT C ATTA	CAAT y ATTA
	scaffold_7	605781	CGTGCTATC	CGTG T TATC	CGTG y TATC
	scaffold_7	850516	TGACGCATA	TGAC A CATA	TGAC r CATA
40	scaffold_7	873221	AATAGACCT	AATA A ACCT	AATArACCT
	scaffold_7	1100248	TCACGGAAG	TCAC A GGAAG	TCAC r GGAAG
	scaffold_7	1352529	TAAATATAT	TAAATATAT	TAAATATAT
	scaffold_7	1605059	GACAAGCAA	GACA G GCAA	GACArGCAA
45	scaffold_7	1944368	AACACGGAG	AACA T GGAG	AACA y GGAG
	scaffold_8	350000	ATTGACGCG	ATTG G CGCG	ATTG G CGCG
	scaffold_8	606991	GTGTATTCT	GTGT C TTCT	GTGT s TTCT
	scaffold_8	834519	ACACATAGA	ACAC T TGGA	ACAC w TrGA
	scaffold_8	1069362	AGCTATCCC	AGCT T TCCC	AGCT k TCCC
50	scaffold_8	1354068	AGAATGCCT	AGAA A GCCT	AGAA A GyyT
	scaffold_8	1614036	TTATCAGTA	TTAT T AGTA	TTAT y AGTA
	scaffold_8	1869238	TGGAGGTTG	TGGAC G TTG	TGGA y GTTG
	scaffold_9	100447	CTATTTTCT	CTAT G TTCT	CTAT s TTCT
55	scaffold_9	350569	AGAATATAC	AGAAAATAC	AGAA r ATAC
	scaffold_9	611816	GTAATCTTT	GTAA A CTTT	GTAA m CTTT
	scaffold_9	721973	TGTATACGT	TGTAGACGT	TGTAGACGT
	scaffold_9	1012871	CTCATAAGA	CTCA C AAGA	y TCAmAAGA
60	scaffold_9	1250830	TTGTGGGGA	TTGT A GGGA	TTGT w GGGA
	scaffold_9	1499265	AGTCAGACA	AGTC C GACA	AGTC C GACA
	scaffold_9	1665606	TAAATCTTT	TAAACT C TTT	TAAATCTTT
	scaffold_9	1676755	CTGCCGTTT	CTGC A GTTT	CTGC w GTTT
	scaffold_10	104977	TTAGCTGGA	TTAGCTGGA	w TAG m TGGA
65	scaffold_10	354531	AATCAATCA	AATCAATCA	AATC m ATCA
	scaffold_10	633622	TGGGCAAAG	TGGGCAAAG	TGGG s AAAG

a continuación

	scaffold_10	863401	ATAAAATTT	ATAAAATTT	ATAAAATTT
	scaffold_10	1107782	CAACCCAC	CAACCCAC	CAAC s CCAC
	scaffold_10	1338596	GTGCATCAT	GTGCATCAT	GTGC m TCAT
5	scaffold_10	1477125	ATGGTAAAT	ATGGTAAAT	ATGG w /AAAw
	scaffold_11	173230	AGCGGGCGA	AGCGGGCGA	AGCG s GCGA
	scaffold_11	378409	TGATTGGGG	TGATTGGGG	TGAT w GGGG
	scaffold_11	627221	TCTTCGCCC	TCTTCGCCC	TCTT y GCCC
10	scaffold_11	931877	GACCTCACC	GACCTCACC	GAC Ck CACC
	scaffold_11	1155849	GT-TGCCAC	GT-TGCCAC	GT- /ATs CCAC
	scaffold_11	1250447	GAGGCTACA	GAGGCTACA	GAGG m TACA
	scaffold_12	116044	ACGTCCTCT	ACGT G CTCT	ACGT s CTCT
	scaffold_12	272255	CCGAGTGCT	CCGA AT GCT	CCGA r TGCT
15	scaffold_12	554582	ACTCCGGTC	ACTC T GGTC	ACTC y GGTC
	scaffold_12	770075	GAACGTTCT	GAAC ATT CT	GAAC r TTCT
	scaffold_12	909536	CTATGGAGG	CTAT C GAGG	CTAT s GAGG
	scaffold_13	119283	ACGTTACTG	ACGTTACTG	ACGTTACTG
20	scaffold_13	363867	ATCCACTGC	ATCCACTGC	ATCCACTGC
	scaffold_13	656215	TTGACAAGA	TTGACAAGA	TTGACAAGA
	scaffold_13	866136	GTTGGTCAG	GTTGGTCAG	GTTGGTCAG
	scaffold_14	110330	TAGGACCAG	TAGG T CCAG	TAGG w CCAG
25	scaffold_14	359739	AATTTTGAA	AATT G TGAA	AATT k TGAA
	scaffold_14	603118	GGCCCGCCT	GGCC G GCCT	GGCC s GCCT
	scaffold_14	783276	TTCGCACGT	TTCGCACGT	TTCGCACGT
	scaffold_14	808308	AAGGTATGG	AAGGTATGG	AAGGTATGG
30	scaffold_15	101381	TAAACAGAT	TAAACAGAT	TAAACAGAT
	scaffold_15	367204	CCAAGATAG	CCAAGATAG	CCAAGATAG
	scaffold_16	106292	AAGCTGGAA	AAGCTGGAA	AAGCTGGAA
	scaffold_16	472546	CTTTTAATA	CTTTTAATA	CTTTTAATA
	scaffold_17	107673	GCTCTTTTA	GCTC C TTTA	GCTC s TTTA
35	scaffold_17	370858	GACACAACG	GACA TA ACG	GACA TA ACG
	scaffold_18	126322	CCTCTTCCG	CCTC G TCCG	CCTC k TCCG
	scaffold_19	87323	CCCAAGCAA	CCC A CGCAA	CCC m GCAA

[0120] La Tabla I presenta una “huella digital” extraída del genotipo SNP (polimorfismo mononucleotídico) de las secuencias completas del genoma de la línea B12998-s39, del genoma de referencia de la línea OWNC H97 y de un ejemplo de una cepa híbrida F1, B14528, obtenida del cruce de las líneas B12998-s39 con una segunda línea homocariota. Se apreciará que el uso de B12998-s39 junto con la segunda línea homocariota para proporcionar la cepa B14528 es solo un ejemplo de la generación híbrida F1, y se observa que B12998-s39 se ha usado en al menos 21 cruces con otras líneas de *Agaricus bisporus* para producir híbridos F1. Los códigos de nucleótidos y de ambigüedad de la IUPAC se usan para representar las secuencias marcadoras de ADN de 9 bases observadas informadas anteriormente, cada una de las cuales representa uno o dos caracteres alélicos en un locus marcador genotípico. La identidad de cada locus marcador está especificada por la información de la posición del andamiaje y del SNP derivada de la secuencia del genoma de referencia H97 V2.0 publicada por el U.S. Department of Energy Joint Genome Institute (Morin y col. 2012). Se proporcionan datos de las 19 estructuras base genómicas más grandes de H97, es decir, aquellas que superan los 100.000 nucleótidos de longitud. Las distinciones entre los genotipos homoalélicos de la línea B12998-s39 y la línea OWNC H97 son evidentes. También es evidente que los alelos de la línea homoalélica B12998-s39 están incorporados dentro del genotipo heteroalélico de la cepa heterocariota híbrida B14528.

[0121] En la TABLA II se proporcionan datos del genotipo de seis locus marcadores adicionales.

Tabla II

Alelos en 6 locus marcadores, para las líneas B12998-s39, OWNC y SWNC						
Marcador:	ITS	p1n150	MFPC-1-ELF	AN	AS	FF
<u>Línea</u>						
B12998-s39	1	5	E4	N3	SC	FF3
OWNC	1	1T	E1	N1	SD	FF1
SWNC	2	2	E2	N2	SC	FF2

[0122] OWNC y SWNC son dos líneas derivadas de dos cepas tradicionales de cultivares de sombrero blanco, como se describe en la solicitud de patente presentada al mismo tiempo titulada “Cepa B14528 de champiñón híbrido y descendientes de la misma”. Cada uno es genotípicamente distinto, como se muestra en la Tabla II.

[0123] El marcador “p1n150-3G-2” es un refinamiento del marcador p1n150 informado sobre el Cromosoma 1 por Kerrigan, R.W., y col. “Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus *Agaricus bisporus*”. *Genetics* 133, 225-236 (1993) y se ha demostrado que está vinculado al locus MAT (tipo de cruce) por Xu y col., “Localization of the mating type gene in *Agaricus bisporus*”. *App. Env. Microbiol.* 59(9): 3044-3049 (1993) y también se ha usado en otros estudios publicados. Si bien pueden usarse y se han usado varios cebadores diferentes para amplificar segmentos de ADN en los cuales está presente el marcador p1n150-3G-2 y a partir de los cuales puede secuenciarse, digerirse, caracterizarse electroforéticamente o analizarse de otro modo, las secuencias de cebadores empleadas en la presente invención para el desarrollo de los datos descritos son: Directo: 5'-aggcrrcccatcttcasc-3' (Id. de sec. n.º 1); Inverso: 5'-gttcgacgacggactgc-3' (Id. de sec. n.º 2), con 35 ciclos de PCR, temperatura de hibridación de 56 °C, tiempo de extensión de 1 min.

[0124] El marcador “ITS” se ha adoptado como la secuencia de “código de barras” oficial para todos los hongos (Schoch y col., Fungal Barcoding Consortium, “Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi”. *Proc. Nat. Acad. Sci.* <www.pnas.org/cgi/content/short/1117018109> (2012)) y se ha usado en innumerables publicaciones, incluyendo Morin y col., “Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche”. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 109: 17501-17506 (2012) sobre la secuencia del genoma de *A. bisporus* completo. White y col. (1990), Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, Nueva York, EE.UU.: 315-322., publicaron numerosas secuencias de cebadores para el marcador ITS, de los cuales los inventores usan los cebadores ITS1: 5'-tcctgtaggtgaacctgcgg-3' (Id. de sec. n.º 3) e ITS4: 5'-tcctccgcttattgatgc-3' (Id. de sec. n.º 4), con 35 ciclos de PCR, temperatura de hibridación de 56 °C, tiempo de extensión de 1 min.

[0125] El marcador MFPC-1-ELF deriva de una secuencia mapeada por Marie Foulongne-Oriol y col., “An expanded genetic linkage map of an intervarietal *Agaricus bisporus* var. *bisporus* - *A. bisporus* var. *burnettii* hybrid based on AFLP, SSR and CAPS markers sheds light on the recombination behaviour of the species”. *Fungal Genetics and Biology* 47: 226-236 (2010) que está enlazado al locus PPC-1 descrito por Callac y col., “Evidence for PPC1, a determinant of the pilei-pellis color of *Agaricus bisporus* fruit bodies”. *Fungal Genet. Biol.* 23, 181-188 (1998). Se ha usado un marcador enlazado equivalente como se describe en Loftus y col., “Use of SCAR marker for cap color in *Agaricus bisporus* breeding programs”. *Mush. Sci.* 15, 201-205 (2000). Si bien pueden usarse y se han usado varios cebadores diferentes para amplificar segmentos de ADN en los cuales está presente el marcador MFPC-1-ELF y a partir de los cuales puede secuenciarse, digerirse, caracterizarse electroforéticamente o analizarse de otro modo, las secuencias de cebadores empleadas por los inventores para el desarrollo de los datos descritos son: Directo: 5'-aytcrcaamaacatacctcaac-3' (Id. de sec. n.º 5); inverso: 5'-cattcgccgattttctca-3' (Id. de sec. n.º 6), con 35 ciclos de PCR, temperatura de hibridación de 55 °C, tiempo de extensión de 0,5 min.

[0126] Los marcadores AN, AS y FF se diseñaron a partir de secuencias obtenidas de productos de PCR producidos mediante el uso de cebadores descritos por Robles y col., Patente de EE.UU. N.º 7.608.760, y/o de secuencias genómicas contiguas o superpuestas, para mejorar el rendimiento, la confiabilidad y la consistencia de los resultados, en comparación con los marcadores como se describieron originalmente; son genotípica y genómicamente equivalentes. Si bien pueden usarse y se han usado varios cebadores diferentes para amplificar segmentos de ADN en los cuales está presente cualquiera del marcador AN, AS o FF y a partir de los cuales puede secuenciarse, digerirse, caracterizarse electroforéticamente o analizarse de otro modo, las secuencias de cebadores empleadas por los inventores para el desarrollo de los datos descritos son: para AN: Directo: 5'-gacgatgctgggactggtgat-3' (Id. de sec. n.º 7); Inverso: 5'-ggtctggcctacrggagtgtgt-3' (Id. de sec. n.º 8), con 35 ciclos de PCR, temperatura de hibridación de 64 °C, tiempo de extensión de 2 min; para AS: Directo: 5'-ccgccagcacaaggaatcaaatg-3' (Id. de sec. n.º 9); Inverso: 5'-tcagtgcgcctcaaaacagtgc-3' (Id. de sec. n.º 10), con 35 ciclos de PCR, temperatura de hibridación de 64 °C, tiempo de extensión de 2 min; y para FF: Directo: 5'-tcgggtggttgcaactgaaaag-3' (Id. de sec. n.º 11); Inverso: 5'-ttccttcgcgccttaattgtttct-3' (Id. de sec. n.º 12), con 35 ciclos de PCR, temperatura de hibridación de 64 °C, tiempo de extensión de 2 min.

[0127] La línea B12998-s39 puede identificarse a través de su perfil de marcadores moleculares como se muestra en las Tablas I y II. Un cultivo o producto que incorpora el perfil de marcadores genéticos que se muestra en las Tablas I y II es una realización de la invención. Otra realización de esta invención es una línea de *Agaricus bisporus* o sus partes que comprenden los mismos alelos que la línea B12998-s39 para al menos el 75 % de los locus enumerados en las Tablas I y II. En otras realizaciones, esta línea o sus partes comprenden los mismos alelos que la línea B12998-s39 para al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o esencialmente el 100 % de los locus enumerados en las Tablas I y II.

[0128] Es decir, se apreciará que cada nucleótido del genoma nuclear de *Agaricus bisporus* tiene una identidad única y específica, especificada por el número de estructura base y el número de posición de nucleótido de ese

nucleótido dentro de la secuencia de referencia estándar de la técnica (versión 2.0) de *A. bisporus* línea H97, según lo determinado y puesto en el dominio público por el D.O.E. de EE.UU. Joint Genome Institute and the *Agaricus* Genome Consortium, como se describe en la publicación por Morin y col., “Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche”. Proc. Nat’l Acad. Sci. USA 109: 17501-17506 (2012). Como se sabe en la técnica, cualquier marcador genético o locus marcador en el genoma de *A. bisporus* puede identificarse especificando la información posicional de la secuencia de referencia H97. Por ejemplo, el primer marcador que aparece en la Tabla I aparece en 1:101993 (es decir, estructura base 1: posición 101993).

[0129] Una célula que comprende los mismos alelos que una célula de la línea B12998-s39 para al menos el 75 % de los locus enumerados en las Tablas I y II también es una realización de esta invención. En otras realizaciones, se proporcionan células que comprenden los mismos alelos que una célula de la línea B12998-s39 para al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o esencialmente el 100 % de los locus enumerados en las Tablas I y II. También se incluyen dentro del alcance de la invención cultivos que se benefician sustancialmente del uso de la línea B12998-s39 en su desarrollo, tales como descendencia híbrida que tiene la línea B12998-s39 como un precursor, y la línea B12998-s39 que tiene un rasgo introducido a través de cruces introgresivos de descendencia con la línea B12998-s39, o a través de transformación. De manera similar, una realización de esta invención es un heterocariote de *Agaricus bisporus* que comprende al menos un alelo por locus que es el mismo alelo que está presente en la línea B12998-s39 para al menos el 75 % de los locus marcadores enumerados en las Tablas I y II. En otras realizaciones, se proporcionan heterocariotes que comprenden al menos un alelo por locus que es el mismo alelo que el que está presente en la línea B12998-s39 para al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o esencialmente el 100 % de los locus marcadores enumerados en las Tablas I y II. Más particularmente, el heterocariote puede ser un descendiente híbrido de la línea B12998-s39.

[0130] Los hongos formadores de champiñones exhiben una alternancia de generaciones, desde heterocariotas (N+N, con dos núcleos haploides, funcionalmente como el estado diploide 2N) a homocariotas (1N) y además tras cruzarse se vuelven heterocariotas nuevamente. En la mayoría de los eucariotas, se considera convencionalmente que un progenitor es diploide o heterocariota. La “generación” haploide a menudo, aunque no siempre, se denomina gameto (por ejemplo, polen, esperma). En los hongos, que son microorganismos, la generación haploide puede vivir y crecer indefinida e independientemente, por ejemplo en un cultivo celular de laboratorio; si bien estos homocariotes haploides funcionan como gametos en los cruces, son equivalentes a líneas endogámicas (por ejemplo, de plantas) y es más fácil hacer referencia a ellos como precursores (de híbridos). Aquí, el término “precursor” se refiere al cultivo que es un, o el, progenitor directo de otro cultivo dentro de las generaciones alternantes del ciclo de vida sexual. El término “línea” se refiere de forma más estricta a un cultivo homoalélico haploide (N) dentro del ciclo de vida. El heterocariote N+N resultante de un cruce, o que comprende una cepa reproductora, o que comprende un cultivo usado para producir una cosecha de champiñones, puede denominarse una “cepa”.

[0131] Si una línea parental lleva el alelo “p” en un locus particular, y la otra línea parental lleva el alelo “q”, el híbrido F1 resultante del cruce de estas dos líneas llevará ambos alelos, y el genotipo puede representarse como “p/q” (o “pq”, o “p+q”). Los marcadores caracterizados por secuencia son codominantes y ambos alelos serán evidentes cuando se lleve a cabo un protocolo de secuenciación apropiado en el ADN celular del híbrido. Por lo tanto, el perfil de la línea B12998-s39 puede usarse para identificar híbridos que comprenden la línea B12998-s39 como línea parental, ya que dichos híbridos comprenderán dos conjuntos de alelos, uno de los cuales será de la línea B12998-s39 y coincidirá con el de esta. La coincidencia puede demostrarse restando el segundo alelo del genotipo, dejando el alelo B12998-s39 evidente en cada locus. Es posible perfeccionar este enfoque con híbridos de *Agaricus bisporus* como consecuencia de la condición de heterocariote (N+N) existente en los híbridos. Los dos núcleos haploides pueden aislarse físicamente mediante diversas técnicas conocidas (por ejemplo, protoplastia) en subcultivos de “neohaplontes” y después cada uno de ellos puede caracterizarse independientemente. Uno de los dos genotipos nucleares neohaplontales del híbrido F1 será el de la línea B12998-s39, lo que demuestra su uso en el cruce y su presencia en el híbrido.

[0132] Una descendencia autofecundada heterocariota de un híbrido F1 que tiene un genotipo “p/q” tendrá en el ejemplo un genotipo “p/p”, “q/q” o “p/q”. Dos tipos de autofecundación dan lugar a diferentes expectativas sobre la representación de los alelos de la línea B12998-s39 y del híbrido F1 en la siguiente generación heterocariota. Cuando dos descendientes haploides obtenidos aleatoriamente del mismo híbrido F1, derivado de esporas individuales de diferentes tétradas meióticas, se cruzan (es decir, en autofecundación entre tétradas), la representación del perfil del marcador de la línea B12998-s39 en cada línea parental haploide recombinada y en cada heterocariote cruzado entre hermanos será del 50 % en promedio, y un poco más del 75 % (hasta aproximadamente el 85 %) del heterocariote presente en el híbrido F1 se mantendrá en promedio en el heterocariote cruzado entre hermanos (la expectativa de más del 75 % se debe al requisito de cruce para el heterocariote en el locus de tipo de cruce (MAT) en el cromosoma 1). Distintivamente, además, *Agaricus bisporus* experimenta regularmente una segunda forma característica y espontánea de autofecundación intra tétradas llamada intramixis, que produce esporas postmeióticas heterocariotas que llevan dos núcleos haploides recombinados diferentes que tienen alelos MAT heteroalélicos complementarios. Una descendencia que se

desarrolla a partir de cualquiera de estas esporas es un heterocarionte autocruzado postmeiótico con una retención de aproximadamente el 100 % del heteroalelismo presente en el único progenitor F1 alrededor de los 13 pares de centrómeros. En teoría, este valor disminuye a un promedio del 66,7 % de retención del heteroalelismo F1 para marcadores distales no ligados a sus centrómeros; sin embargo las observaciones empíricas sugieren tasas de retención más altas incluso para dichos marcadores distales. La transmisión del perfil del marcador de la línea B12998-s39 en dicha descendencia autofecundada puede ser incompleta en un pequeño porcentaje (típicamente el 0-10 %) debido a los efectos de los cruzamientos meióticos poco frecuentes, aunque representa en promedio el 50 % del genoma heterocariota resultante. Ambos tipos de descendencia autofecundada se consideran variedades esencialmente derivadas (EDV) del híbrido F1 inicial, y el último tipo comprende la mayor parte (a menudo el 95-100 %) del genotipo del F1, y puede expresar un fenotipo muy similar al del híbrido F1.

[0133] Las Variedades Esencialmente Derivadas suelen derivar directamente de un único cultivo inicial (por ejemplo, cepa); todas estas derivaciones producen EDV. No existe una definición universalmente aceptada de EDV; un ejemplo de una definición aplicable a las variedades vegetales lo proporciona la Ley de Protección de Variedades Vegetales de los Estados Unidos (edición revisada, febrero de 2006). La definición empleada en esta solicitud de patente es congruente con el término como se entiende ampliamente. Los métodos de 'derivación esencial' para obtener cultivos que son, por definición, EDV de un único cultivo inicial de *A. bisporus* incluyen selección somática, selección mediante cultivo de tejidos, germinación de esporas únicas, germinación de esporas múltiples, autofecundación, cruce repetido con el cultivo inicial, mutagénesis y transformación, para proporcionar algunos ejemplos de métodos que son bien conocidos en la técnica. El cruce repetido con el cultivo inicial para introgresar un único rasgo en el trasfondo genético de una variedad o cepa inicial se denomina conversión de rasgos introgresivos y produce una EDV de la cepa inicial. La transformación mediada por ADN de *A. bisporus* se ha informado por Velcko, A. J. Jr., Kerrigan, R. W., MacDonald, L. A., Wach, M. P., Schlaghaufer, C. y Romaine, C. P. 2004, Expression of novel genes in *Agaricus bisporus* using an *Agrobacterium*-mediated transformation technique. Mush. Sci. 16: 591-597 y las referencias en el mismo. La transformación puede introducir un solo gen o alelo nuevo en el genoma de una variedad inicial.

[0134] Por lo tanto, según lo anterior, una o más realizaciones de esta invención incluyen un cultivo de champiñón, parte de cultivo, champiñón o parte de champiñón de la descendencia de la línea B12998-s39 que es un cultivo de champiñón híbrido heterocariota de primera generación (F1) que comprende dos conjuntos de alelos, en donde un conjunto de alelos es el mismo que la línea B12998-s39 en todos los locus marcadores enumerados en la Tabla I. Una célula de champiñón o elemento hifal en donde un conjunto de alelos es el mismo que la línea B12998-s39 en todos los locus marcadores enumerados en la Tabla I también es una realización de la invención. Esta célula de champiñón o elemento hifal puede ser parte de un cultivo, un inóculo comercial o un producto de "inóculo", un champiñón o parte de un champiñón producido mediante el cruce de la línea B12998-s39 con otro cultivo de champiñones. Otras realizaciones de esta invención pueden incluir una variedad esencialmente derivada del híbrido F1, producida por autofecundación inter-tétrada o intra-tétrada del híbrido F1, o por modificación del cultivo F1, y más específicamente por selección somática, selección de cultivo de tejidos, germinación de esporas individuales, germinación de esporas múltiples, autofecundación, cruce repetido con el cultivo inicial, mutagénesis y transformación.

[0135] Si bien se conocen y pueden usarse muchos tipos de marcadores moleculares, todos ellos derivan en última instancia de la secuencia primaria de ADN del genoma. El genotipo esencial de una línea o cepa está incorporado en su secuencia de ADN genómico. El perfil de marcador presentado en la Tabla I representa segmentos cortos seleccionados de la secuencia del genoma de la línea B12998-s39, generalmente en locus que se sabe que tienen secuencias diferentes entre otras líneas y cepas, seleccionados a intervalos ampliamente espaciados que abarcan todo el genoma nuclear. Pueden usarse proveedores de secuenciación comerciales y tecnologías comerciales como Illumina MiSeq, entre otros, para obtener secuencias del genoma completo a partir de preparaciones de ADN celular total. También pueden usarse otras técnicas para obtener perfiles genotípicos según sea apropiado.

[0136] Se apreciará que el ADN de la presente invención es el que incluye los mismos caracteres alélicos que están presentes en la línea B12998-s39 según se describe para los alelos en los locus marcadores ITS, p1n150-G3-2 MFPC-1-ELF, AN, AS y FF (es decir, Tabla II) y en una columna etiquetada B12998-s39 de la Tabla I. Por lo tanto, independientemente del proceso de producción del ADN de la línea B12998-s39, es ADN identificable porque incluye los mismos caracteres alélicos que los presentes en la línea B12998-s39 según se reivindica.

[0137] Con respecto al ARN y las proteínas expuestos en la presente invención, se entiende en la técnica que el dogma central de la biología molecular, plenamente probado experimentalmente, y como se explica en el sitio web de los Institutos Nacionales de Salud, en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MILACourse/Modules/MolBioReview/centraldogma.html>, (febrero de 2014) enseña que el ARN se transcribe directamente del ADN nuclear y mitocondrial de tal manera que la información presente en la secuencia de ADN se incorpora en la secuencia de ARN correspondiente. Similarmente, la secuencia de aminoácidos de las proteínas se traduce directamente a partir de las secuencias de ARN, de tal manera que la información presente en la secuencia de la proteína está determinada directamente por la secuencia de ARN y, en última instancia, por la secuencia de ADN. En conjunto, la transcripción y/o la traducción

de una secuencia de un gen de ADN se denominan “expresión” o “expresión génica”. Los caracteres distintivos de una secuencia de ADN se reflejan en secuencias únicas correspondientes de las secuencias de ARN y proteínas expresadas.

5 **[0138]** La línea B12998-s39 y su presencia en cultivos, partes de cultivos, híbridos, champiñones y partes de champiñones pueden identificarse a través de un perfil de marcadores moleculares. Una célula de cultivo de champiñones o un elemento hifal que tiene el perfil de marcador que se muestra en la Tabla I es una realización de la invención. Una célula de champiñón o elemento hifal tales pueden ser heterocariotas.

10 **[0139]** La línea B12998-s39 representa una nueva línea genética base en la cual puede introgresarse un nuevo locus o rasgo. La transformación directa y la endogamia representan dos métodos útiles que pueden aplicarse para lograr una introgresión tal. La introgresión que produce una conversión de rasgos comprende la etapa de cruzar la línea B12998-s39 con una segunda cepa, y luego cruzar la descendencia de ese cruce con la línea B12998-s39, repetidamente, hasta que se obtenga una variante derivada de la línea B12998-s39 que incorpore un gen introducido que determine un rasgo nuevo. Las cepas y líneas producidas por este método pueden tener, por ejemplo, en el
15 rango del 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o 99,9 % del ADN de la línea B12998-s39, y por lo tanto son Variedades Esencialmente Derivadas de la línea B12998-s39, y son una realización de la invención.

[0140] Con el fin de demostrar la práctica de la presente invención, se comparó la línea B12998-s39 con otras líneas. B12998-s39 es una línea seleccionada de entre la descendencia haploide de una primera generación en un pedigrí híbrido iniciado por Sylvan America, Inc. en 2011. Esta línea, dentro de un fondo genético heterocariota adecuado, confiere de forma dominante un rasgo de color de sombrero marrón a la descendencia heterocariota; el color del sombrero está determinado principalmente por los alelos dominantes y recesivos en el locus *PPC-1* en el Cromosoma 8. La línea B12998-s39 tiene el genotipo de tipo de cruce Mat-5 y el fenotipo conductual. También contribuye y respalda varios rasgos comercialmente deseables en la descendencia híbrida, incluidos el momento y la productividad del cultivo, el tamaño, el aspecto y el atractivo general del champiñón para la venta minorista. Debido a que la línea B12998-s39 es una línea haploide, es incapaz de producir una cosecha de champiñones y, en consecuencia, no puede obtenerse un “champiñón B12998-s39” y no es posible realizar una caracterización directa de un cultivo o fenotipo de producto. Por lo tanto, la mayoría de los criterios de selección aplicados a líneas haploides incluyendo la línea B12998-s39 se determinan empíricamente mediante la evaluación de una serie de cruces que comparten un progenitor común tal como la línea B12998-s39. En efecto, esta “capacidad de combinación”, es decir, la capacidad de cruzarse con éxito y producir una alta proporción de híbridos novedosos interesantes y útiles en los programas de desarrollo de cepas, se aplica usando criterios cualitativos, cuantitativos, objetivos y subjetivos. La línea B12998-s39 se encuentra entre las líneas haploides de mayor intervalo descubiertas entre su cohorte de líneas hermanas. Ningún híbrido anterior, antes de la creación de híbridos usando la línea B12998-s39, tenía la combinación particular de rasgos deseables (incluyendo detalles específicos de su sombrero más redondo, pulpa más gruesa y cultivo acelerado, además de un fenotipo de incompatibilidad novedoso particular) observado entre los híbridos que incorporan la línea B12998-s39, como se describe en la solicitud de patente correspondiente de Sylvan America, Inc. presentada el mismo día y titulada “Cepa B14528 de champiñón híbrido y descendientes de la misma”. Nunca antes se había observado que una línea produjera las combinaciones de rasgos deseables observadas entre los híbridos que incorporaban la línea B12998-s39.

[0141] Como se analizó previamente, los resultados en la Tabla I proporcionan, como una realización ilustrativa, una cepa de cultivo de champiñones híbridos específica, a saber, una cepa designada B14528, que se ha depositado en el NRRL con el N.º de Registro 50900 y que es el tema de una solicitud de patente presentada simultáneamente titulada “Cepa B14528 de champiñones híbridos y descendientes de la misma” para la cual la línea B12998-s39 es un progenitor con otra línea híbrida. Los resultados muestran que la línea homocariota B12998-s39 muestra una buena capacidad de combinación.

50 **[0142]** Un único híbrido de champiñón resulta del cruce de dos líneas haploides y homoalélicas, cada una de las cuales tiene un genotipo que complementa el genotipo de la otra. La descendencia híbrida de la primera generación se designa F1. Los híbridos F1 pueden ser útiles como nuevas variedades comerciales para la producción de champiñones, o como material de partida para la producción de descendientes endogámicos y/o EDV, o como precursores de la próxima generación de líneas haploides para producir cepas híbridas posteriores.

55 **[0143]** La línea B12998-s39 puede usarse para producir cultivos de champiñones híbridos. Una de estas realizaciones es el método de cruce de la línea homocariota B12998-s39 con otra línea de champiñones homocariotas, para producir un cultivo híbrido F1 de primera generación. El cultivo de primera generación, la parte de cultivo, el champiñón y la parte de champiñón producidos mediante este método son una realización de la invención. El cultivo F1 de primera generación comprenderá un conjunto completo de alelos de la línea homocariota B12998-s39. El desarrollador de la cepa puede usar registros de desarrollo de la cepa o métodos moleculares para identificar un cultivo híbrido F1 particular producido usando la línea B12998-s39. Además, el desarrollador de la cepa también puede producir híbridos F1 usando líneas que sean conversiones de rasgos transgénicos o introgresivos (“modificaciones estrechas”) de la línea B12998-s39. Otra realización es el método de cruce de la línea B12998-s39, o una versión estrechamente modificada de esa línea, con un cultivo heterocariota diferente de *Agaricus bisporus*.

Este último método es menos eficiente que el cruce usando dos líneas homocariotas, pero también puede dar lugar a la producción de nuevos cultivos híbridos.

[0144] El desarrollo de un híbrido de champiñones en un programa típico de desarrollo de cepas de champiñones implica muchas de o todas las etapas siguientes: (1) la obtención de cepas o inóculos de diversos grupos de germoplasma de especies de champiñones para cruces iniciales; (2) cruces entre pares de cultivos puros en medios de crecimiento microbiológicos estériles como el agar patata dextrosa (PDA); (3) la obtención y el uso de cepas híbridas prometedoras a partir de cruces para producir generaciones posteriores de líneas de descendencia homocariotas, tal como la línea B12998-s39, que son individualmente uniformes; (4) el uso de dichas líneas en cruces con otras líneas o cepas para producir una generación híbrida posterior; (5) repetición de las etapas (2-4) según sea necesario; (6) la obtención de cepas híbridas precomerciales y el uso de técnicas de derivación esenciales tales como la autofecundación para producir una cepa comercial final. En una realización, la repetición de las etapas (2-4) puede realizarse hasta 5 veces. En diversas otras realizaciones, las etapas (2) a (4) pueden repetirse en cualquier momento de 0 a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces. Las líneas homocariotas no son reproductivamente competentes ("fértiles"). La fertilidad, la capacidad de producir una cosecha de champiñones, se restablece mediante cruces complementarios con otras cepas haploides o, con menos frecuencia, heterocariotas. Una consecuencia importante del homoalelismo y la homogeneidad de la línea homocariota es que el híbrido entre un par definido de líneas homocariotas puede recrearse indefinidamente siempre que las líneas homocariotas se conserven y/o se propaguen. En un intento de cruce entre una línea homocariota y un heterocariota, en ausencia de recombinación somática, pueden obtenerse uno o ambos de los dos posibles genotipos heterocariotas nuevos definidos, cada uno de los cuales comprenderá la línea B12998-s39.

[0145] Usando la línea B12998-s39, la aplicación específica con repetición de las etapas descritas anteriormente puede producir cualquier estructura de pedigrí a partir de cualquier disposición de cepas, líneas e híbridos dentro de esa estructura. Puede producirse un híbrido de F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10 o cualquier generación híbrida posterior a partir de la línea B12998-s39 usando las etapas 1 a 6 descritas anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Una línea de cultivo de *Agaricus bisporus* designada B12998-s39, habiéndose depositado el cultivo de la línea B12998-s39 bajo el N.º de Registro de NRRL 50899.
2. Un cultivo de *Agaricus bisporus* que tiene al menos el 99 % de su genoma o genotipo presente en el genoma o genotipo del cultivo de la reivindicación 1.
3. Un cultivo de cepa híbrida F1 de *Agaricus bisporus* en donde el cultivo de la cepa de champiñón *Agaricus bisporus* se produce cruzando el cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 con un cultivo de *Agaricus bisporus* diferente.
4. Un cultivo de *Agaricus bisporus* caracterizado por tener al menos un conjunto de cromosomas de un cultivo de *Agaricus bisporus* de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en donde todos los alelos del genotipo del al menos un conjunto de cromosomas están presentes en el genotipo de la línea B12998-s39 en los locus marcadores caracterizados por secuencia enumerados en la Tabla II.
5. Un método para desarrollar un nuevo cultivo en un programa de desarrollo de cepas de champiñones *Agaricus bisporus* que comprende:

aplicar técnicas de desarrollo de cepas de champiñones a un primer cultivo de champiñones, en donde dicho primer cultivo de champiñones se designa como línea B12998-s39, depositada bajo el N.º de Registro de NRRL 50899, para proporcionar el nuevo cultivo; preferiblemente en donde las técnicas de desarrollo de cepas de champiñones se seleccionan del grupo que consiste en endogamia, exogamia, autofecundación, conversiones de rasgos introgresivos, derivación esencial, cría asistida por pedigrí, selección asistida por marcadores y transformación.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la etapa de aplicación incluye además la introducción de un rasgo deseado en el nuevo cultivo de la línea B12998-s39 de *Agaricus bisporus* que comprende las etapas de:
 - (1) cruzar el primer cultivo de la línea B12998-s39 de *Agaricus bisporus* con un segundo cultivo de *Agaricus bisporus* que tenga el rasgo deseado, para producir un híbrido;
 - (2) obtener una descendencia que lleva al menos un gen que determina el rasgo deseado del híbrido;
 - (3) cruzar dicha descendencia del híbrido con el cultivo de la línea B12998-s39 de *Agaricus bisporus* para producir un nuevo híbrido;
 - (4) repetir las etapas (2) y (3) al menos una vez para producir un híbrido posterior;
 - (5) obtener una línea homocariota que lleva al menos un gen que determina el rasgo deseado y que comprende al menos el 75 % de los alelos de la línea B12998-s39, en los locus marcadores caracterizados por secuencia descritos en la Tabla I, a partir del híbrido posterior de la etapa (4).
7. Un método según la reivindicación 5, en donde la etapa de aplicación proporciona un nuevo cultivo de champiñones híbridos, que comprende:
 - (1) cruzar el primer cultivo de champiñones con un segundo cultivo de champiñones *Agaricus bisporus*, en donde el segundo cultivo de champiñones es un cultivo de *Agaricus bisporus*; o
 - (2) que comprende las etapas de:
 - (a) cultivar un cultivo de descendencia producido al cruzar el primer cultivo de champiñones con un segundo cultivo de champiñones *Agaricus bisporus*;
 - (b) cruzar el cultivo de descendencia consigo mismo o con un cultivo diferente para producir un cultivo de descendencia de una generación posterior;
 - (c) cultivar un cultivo de descendencia de una generación posterior y cruzar el cultivo de descendencia de una generación posterior consigo mismo o con un cultivo diferente; y
 - (d) repetir las etapas (b) y (c) durante 0-5 generaciones adicionales para producir un cultivo de champiñones.
8. El método según la reivindicación 6, que comprende además las etapas de:

- (a) obtener un perfil de marcador molecular de la línea de champiñones *Agaricus bisporus* B12998-s39, habiéndose depositado un cultivo de dicha línea bajo el Número de Registro de NRRL 50899;
 - (b) obtener un cultivo híbrido F1 para el cual el cultivo de champiñones de la reivindicación 1 es un precursor;
 - (c) cruzar un cultivo obtenido a partir del cultivo híbrido F1 con un cultivo de champiñón diferente para obtener un cultivo de champiñón híbrido; y;
 - (d) seleccionar descendencia del cultivo de champiñones híbridos que posea características de dicho perfil de marcador molecular de la línea B12998-s39.
9. Una parte del cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el nuevo cultivo resultante del método de la reivindicación 5, el híbrido posterior resultante del método de la reivindicación 6, o el cultivo de champiñones resultante del método de las reivindicaciones 7 u 8, seleccionándose la parte del grupo que consiste en hifas, esporas y células.
 10. Un champiñón producido mediante el cultivo de una cosecha de champiñones a partir de dicho cultivo de las reivindicaciones 3 o 4, el nuevo cultivo resultante del método de la reivindicación 5, el híbrido posterior resultante del método de la reivindicación 6, o el cultivo de champiñones resultante del método de las reivindicaciones 7 u 8.
 11. El producto que tiene incorporado el cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, el nuevo cultivo resultante del método de la reivindicación 5, el híbrido posterior resultante del método de la reivindicación 6, o el cultivo de champiñones resultante del método de las reivindicaciones 7 u 8, seleccionándose el producto del grupo que consiste en micelio, prole, inóculo, inóculo de revestimiento, champiñones frescos, champiñones procesados, trozos de champiñones, sustratos colonizados, grano, compost y materia particulada friable.
 12. El cultivo de *Agaricus bisporus* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, definido además como aquel que tiene un genoma que comprende una conversión de rasgo de locus único, y preferiblemente en donde el locus confiere un rasgo seleccionado del grupo que consiste en tamaño del champiñón, forma del champiñón, redondez del sombrero del champiñón, grosor de la pulpa del champiñón, color del champiñón, textura de la superficie del champiñón, suavidad del sombrero del champiñón, densidad del tejido, firmeza del tejido, maduración retardada, número de esporas basidiales mayor que dos, ausencia de esporas, contenido aumentado de materia seca, período de validez aumentado, abolladura reducida, rendimiento aumentado, distribución modificada del rendimiento a lo largo del tiempo, intervalo disminuido entre inóculo y recolección, resistencia a la infección por síntomas o transmisión de enfermedades bacterianas, víricas o fúngicas, resistencia a insectos, resistencia a nematodos, facilidad de manejo del cultivo, idoneidad del cultivo de cosecha mecánica, respuesta conductual deseada a las condiciones ambientales, a los factores estresantes, a la composición del sustrato de nutrientes, a las influencias estacionales y a las prácticas agrícolas.
 13. Usos del cultivo de las reivindicaciones 1 a 4, del nuevo cultivo resultante del método de la reivindicación 5, del híbrido posterior resultante del método de la reivindicación 6, del cultivo de champiñones resultante del método de las reivindicaciones 7 u 8, de partes de la reivindicación 9, del champiñón de la reivindicación 10 del producto de la reivindicación 11.