

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 929 896**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/14** (2006.01)

**A01H 15/00** (2006.01)

**A01H 5/00** (2008.01)

**C12R 1/645** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2016 PCT/EP2016/051393**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2016 WO16116632**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2016 E 16701476 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2022 EP 3247787**

54 Título: **Nuevas cepas de hongos de *Agaricus bisporus* híbridas**

30 Prioridad:

**23.01.2015 EP 15305073**

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

**02.12.2022**

73 Titular/es:

**SOMYCEL (100.0%)  
ANC R Carnot ZI Sud Route de Tours  
37130 Langeais, FR**

72 Inventor/es:

**RODIER, ANNE;  
RUCKLIDGE, RICHARD y  
BITAUDEAU, STÉPHANIE**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 929 896 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

Nuevas cepas de hongos de *Agaricus bisporus* híbridas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al campo del desarrollo de cepas de microorganismos, más particularmente al desarrollo de híbridos heterocariotas de la especie de hongos *Agaricus bisporus*. Incluso más particularmente, la presente invención se refiere a cepas híbridas blancas de *Agaricus bisporus* que presentan características mejoradas para los usuarios (concretamente cultivadores, procesadores y consumidores). Estos híbridos son por ejemplo las cepas depositadas en CNCM I-4945 e I-4946, que se originan a partir de un plan de cruce que implica la línea depositada CNCM I-4948. La presente invención se refiere a cepas derivadas de estos híbridos y asimismo a las progenies derivadas de estos híbridos.

15 **Antecedentes de la invención**

*Agaricus bisporus* (Lange) es un microorganismo (reino: Fungi, filo: Basidiomycota, clase: Agaricomycetes, orden: Agaricales, familia: Agaricaceae, género: *Agaricus*, sección: Bivelares, especie: *bisporus*). Este microorganismo sigue siendo la especie de hongo comestible cultivada más ampliamente y representa el 38% de la producción mundial (sitio web de la International Society for Mushroom Science (Sociedad Internacional para la Ciencia de los Hongos) (ISMS)). Los hongos se venden principalmente como vegetales frescos o procesados (en conserva, pasteurizados o congelados). Son componentes interesantes de la dieta debido a su sabor, aroma y valores nutricionales (proteínas, fibras no digeribles, vitaminas, minerales, aminoácidos) interesantes (Beelman *et al.*, 2008). Asimismo presentan efectos medicinales, incluyendo el control de cánceres y enfermedades metabólicas (Chen y Kanaya, 2012).

Actualmente, el consumo de hongos blancos en todo el mundo contribuye a una industria de millones de dólares (Morin *et al.*, 2012). Más precisamente, la producción mundial de hongos alcanzó las 7.959.979 toneladas en 2013 (FAO stat, 2013).

Dado que los hongos se hacen crecer en un entorno controlado en interior durante todo el año en instalaciones exclusivamente dedicadas que requieren una gran inversión, cualquier ganancia en la productividad o eficacia (rentabilidad) es bienvenida en la industria. Un aumento en el rendimiento del cultivo o una disminución en la duración del ciclo de crecimiento puede tener un impacto positivo en la facturación del negocio. Más en general, una combinación de mejora de ambos factores puede tener potencialmente un impacto económico muy significativo y, por lo tanto, sería económicamente deseable.

Las primeras cepas híbridas reales de *A. bisporus* generadas mediante verdadero mejoramiento en la década de 1980 en Holanda (Horst U1 = Horronda y Horst U3 = Horwitu) han sido muy satisfactorias comercialmente y han tenido un gran impacto en la producción y comercialización del hongo. Hasta la fecha, la mayoría, si no todas, las variedades comerciales de *A. bisporus* var. *bisporus* con sombreros blancos son en realidad copias (clones) o derivados de Horst U1 (Foulongne-Oriol *et al.*, 2011, Sonnenberg *et al.*, 2011) y *A. bisporus* parece ser un cultivo monolinaje (Savoie *et al.*, 2013), por lo menos para las cepas blancas. Esto es especialmente relevante en territorios tales como los países europeos, donde las variedades comerciales de sombrero blanco son en la actualidad claramente dominantes en el mercado. En 2013, casi todas las cepas blancas comerciales mostraron una similitud sorprendente con Horst U1 a nivel genético (Savoie *et al.*, 2013).

Sin embargo, la falta de diversidad en las cepas cultivadas del hongo se considera un riesgo y una amenaza importantes para este cultivo. De hecho, debido a la falta de diversidad genética entre las cepas comerciales en este momento, no pueden esperarse diferencias reales en cuanto al rendimiento agronómico, de calidad o de procesamiento de los hongos cuando se comparan en las mismas condiciones. Además, la falta de diversidad genética entre las cepas comerciales genera un riesgo importante de erosión genética (falta de adaptación repentina en el contexto de producción, cultivo o utilización) con consecuencias en lo que se refiere a gestión de riesgos, riesgos comerciales y continuidad del suministro. Por tanto, la ausencia de diversidad inicial plantea riesgos sanitarios y económicos. En este contexto, varias empresas han iniciado programas de mejoramiento dirigidos a obtener nuevo material genético capaz de ofrecer nuevos beneficios y oportunidades (diversificación, segmentación) a los usuarios (cultivadores, procesadores, consumidores).

Se han intentado varios esfuerzos para mejorar genéticamente nuevas variedades blancas e introducirlas en el mercado (patentes US nº 5.832.659, US nº 8.663.969), sin embargo, con poco éxito. Uno de los obstáculos para el desarrollo de las cepas blancas es que un porcentaje muy alto de la diversidad silvestre lleva el color marrón del sombrero, que expresa dominancia parcial positiva con un control genético complejo que implica un locus principal y varios loci menores (Foulongne-Oriol *et al.*, 2012). Como consecuencia, se requieren por lo menos dos generaciones para recuperar el color blanco del sombrero en el material de mejoramiento. Asimismo deben tenerse en cuenta otros caracteres, tales como la reacción a la magulladura (Gao *et al.*, 2013), el término de caducidad, etc. Por tanto, el objetivo de lanzar cepas blancas parece más complicado en comparación con las cepas marrones.

Se han identificado dos variedades botánicas diferentes de *Agaricus bisporus* que expresan ciclos vitales diferentes en comparación con *A. bisporus* var. *bisporus* basándose en la biología, el fenotipo y la genética. *A. bisporus* var. *burnettii* (Callac, 1993) y *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* (Callac *et al.*, 2003) presentan ciclos vitales predominantemente heterotálicos y homotálicos, respectivamente. Esto hace posible obtener homocariones más fácilmente debido a un mayor porcentaje de recuperación de una esporada (Kerrigan *et al.* 1994). Sin embargo, aunque muestran interfertilidad con *A. bisporus* var. *bisporus*, su utilización en estrategias de mejoramiento ha resultado decepcionante debido a los principales inconvenientes fenotípicos transmitidos genéticamente a su descendencia, que requieren generaciones posteriores para remediar y volver a un fenotipo comercialmente aceptable.

Por tanto, el mercado de hongos blancos y más específicamente de los hongos *A. bisporus* espera innovaciones que permitan la mejora y diversificación en cualquier etapa del procedimiento de producción. Estas innovaciones pueden ayudar a la rentabilidad del productor (mayor rendimiento, tiempo de ciclo más corto, cosecha más temprana, mayor facilidad y velocidad de cosecha, etc.) y/o la demanda en la cadena de distribución (atractivo visual mejorado, características de sabor mejoradas o distintivas, mayor persistencia de los atributos visuales deseables, etc.). En particular, sería ventajoso generar cepas de hongos que tuvieran una apariencia de primer brote mejorada, por ejemplo, descamación del sombrero menos pronunciada y/o una apariencia más blanca. Todavía otras mejoras pueden potenciar la idoneidad del cultivo de hongos para la cosecha mecánica, la preparación de conserva ("canning") y/o el procesamiento de alimentos. Finalmente, es importante identificar variedades de suspensión de virus, es decir, hongos vegetativamente incompatibles, para evitar la transmisión de enfermedades virales en las instalaciones de crecimiento de hongos.

La presente invención satisface esta necesidad al proporcionar nuevas cepas híbridas de cultivos de hongos *A. bisporus* blancos que muestran una serie de características mejoradas para la rentabilidad de productor y consumidor.

Al examinar el valor agronómico, el valor fenotípico y el rendimiento de preparación de conserva de una serie de progenies de hongos blancos de *A. bisporus*, los inventores identificaron de hecho híbridos interesantes que presentaban i) un peso promedio alto y ii) un fenotipo apropiado para la cosecha mecánica (crecimiento individual de hongos, buena distribución en la superficie del cultivo, estípote recto) y/o para el consumidor (color de sombrero blanco liso) y iii) un rendimiento de preparación de conserva y valor agronómico (incluyendo en ensayos a gran escala) potenciados, en comparación con las variedades comerciales actuales. Además, estos híbridos son vegetativamente incompatibles con las variedades blancas comerciales actuales. Dicho de otro modo, estos híbridos de la invención muestran una combinación de valor agronómico potenciado y un fenotipo apropiado para la satisfacción de productor, procesador y consumidor.

### Descripción detallada de la invención

Inicialmente, con el fin de proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se proporcionan la siguiente información y definiciones.

#### Estructura de los hongos

Los hongos se componen de filamentos (hifas) compartimentados en artículos (células). A diferencia del micelio vegetativo, las hifas del esporóforo se diferencian en tejidos distintos que forman una red de hifas entrelazadas, con diferentes orientaciones, diámetros y densidades cuando se comparan diferentes áreas a través y dentro del estípote y el sombrero (Rama *et al.* 1997, Rama *et al.* 2000). Los espacios de aire entre las hifas del sombrero representan hasta el 50% del volumen total, con un mayor porcentaje en las capas superiores y un menor porcentaje en las capas más profundas. Este porcentaje es menor en las laminillas, alrededor del 25%, comparable al estípote (Donker *et al.*, 1996). Los cuerpos fructíferos de *A. bisporus* son partes reproductivas diferenciadas de hongos macroscópicos y los esporóforos se venden con el nombre de hongo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "hongo" designa, dependiendo del contexto en el que se utiliza, la estructura reproductiva de un hongo agárico o un agárico o un producto alimenticio cultivado del mismo nombre.

Las "esporas" son el propágulo reproductivo del hongo. Las esporas vivas son o bien heterocariones o bien homocariones en estado latente. Las esporas pueden recolectarse asépticamente en material estéril, suspenderse en medio líquido estéril, diluirse y sembrarse en placa en medios de crecimiento de agar estériles para producir esporas germinadas y los cultivos incorporados dentro de las esporas. Diferentes técnicas pueden estimular la germinación de esporas a través de la difusión de una feromona volátil: introducción de un cultivo vivo de *Agaricus* en la tapa de la placa con crecimiento al revés, o en un lado de la placa, o la utilización de ácido isovalérico. Las esporas germinadas pueden aislarse bajo un microscopio de disección utilizando microherramientas estériles, tales como agujas de disección de acero u hojas de bisturí, sobre placas de agar con nutrientes frescos. Utilizando este método, puede obtenerse descendencia heterocariota y homocariota de una cepa heterocariota que comprende las esporas y los cultivos incorporados dentro de las esporas.

Otras partes del hongo incluyen sombreros, pies, laminillas, células (definidas como compartimentos de hifas que incorporan núcleos, mitocondrias, citoplasma, una membrana celular y una pared celular que incluye paredes

transversales), hifas y micelio.

#### Mejoramiento de hongos

- 5 Recientemente se ha publicado una revisión completa de la genética y la genómica de los hongos cultivados aplicada al mejoramiento de agáriscos, incluyendo el germoplasma y la mejora genética (Savoie *et al.*, 2013).

10 Como otras especies de hongos, *A. bisporus* presenta diferentes procesos de reproducción: reproducción vegetativa (mitosis), reproducción sexual (meiosis) y reproducción parasexual (otros fenómenos). La mayoría de los hongos basidiomicetos producen cuatro esporas por basidio, cada una de las cuales recibe un núcleo y cada una de estas esporas germinará como un micelio haploide denominado homocarión, que puede aparearse ("mate") con otro homocarión.

15 El ciclo vital típico de *A. bisporus* es anfitático (pseudohomotálico, homotálico secundario) o heterotálico, dependiendo del nivel de ploidía de las esporas, que pueden ser respectivamente heterocariotas ( $n+n$  cromosomas) u homocariotas ( $n$  cromosomas).

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "homocarión" designa un cultivo haploide con un solo tipo (o linaje somático) de núcleo haploide (representado citogenéticamente como  $n$ ). Por lo general, es reproductivamente incompetente (es decir, no fructifica), pero puede funcionar como un gameto en anastomosis sexualmente complementarias. Aunque haploides, los homocariotes asimismo se denominan "líneas" que transmiten un genotipo uniforme a la descendencia.

25 Por otro lado, "heterocarión" se refiere a un cultivo que presenta dos tipos complementarios de núcleos haploides en un citoplasma común. Por tanto, es funcional y fisiológicamente análogo a un individuo diploide (pero representado citogenéticamente como  $n+n$  en lugar de  $2n$ ). A diferencia de los homocariotes, es reproductivamente competente (es decir, puede fructificar). Los heterocariotes asimismo se denominan "cepas" en el contexto del mejoramiento. En el contexto de la invención, las cepas heterocariotas producidas a partir de apareamientos ("matings") controlados asimismo se denominan "híbridos".

30 Para *A. bisporus* var. *bisporus*, el mejoramiento es más complicado en comparación con otras especies de hongos debido a un ciclo vital específico.

35 *A. bisporus* var. *bisporus* lleva una mayoría de basidios heterocariotas bispóricos que producen heterocariotes fértiles que caracterizan un ciclo vital pseudohomotálico predominante. El ciclo heterotálico produce homocariotes. *A. bisporus* var. *bisporus* presenta un sistema unifactorial multialélico de intercompatibilidad sexual, bajo el control del locus *MAT* (tipo de apareamiento) caracterizado por una serie de 14 alelos de *Mat*. Sin embargo, dos homocariotes pueden aparearse (plasmogamia) y producir un micelio fértil heterocariota híbrido solo si son sexualmente compatibles, es decir, si portan alelos diferentes. Este fenómeno lo tienen en cuenta los mejoradores para diseñar esquemas de

40 mejoramiento y planes de cruce. Sin embargo, dado que solo un pequeño porcentaje de esporas produce homocariotes, esto complica y ralentiza el trabajo de mejoramiento.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "anastomosis" designa la fusión de dos o más hifas, lo que logra la continuidad citoplásmica. Además, el término "plasmogamia" se refiere al establecimiento, a través de la anastomosis, de una continuidad citoplasmática que conduce a la formación de un heterocarión sexual con intercambio de núcleos, mitocondrias, citoplasma y otros componentes intracelulares. La unión sexual de dos cultivos mediante anastomosis y plasmogamia se denomina en la presente memoria "apareamiento".

50 El término "cultivo de hongos" en la presente memoria designa el microorganismo de hongos propagado en varios medios y sustratos de crecimiento. Se refiere a una cepa física, línea, homocarión o heterocarión. Una vez obtenido, un cultivo puede reproducirse vegetativamente a nivel de laboratorio.

#### Procedimiento de cultivo de *A. bisporus*

55 *A. bisporus* es una especie saprofita y un descomponedor secundario de hojarasca. Se cultiva sobre compost preparado a partir de subproductos o desechos agrícolas (por ejemplo, paja) en ocasiones complementado con estiércol animal (caballo, pollo) y otros aditivos (fuente de calcio, por ejemplo, yeso). Los sistemas de cultivo en todo el mundo van desde pequeñas granjas familiares intensivas en mano de obra en países en desarrollo hasta sistemas automatizados industrializados de alta inversión. En los sistemas más modernos, para cada etapa del procedimiento, desde la producción del blanco de hongo hasta la producción de compost, el cultivo, la cosecha y el procesamiento,

60 participan empresas especializadas.

65 *A. bisporus* es un microorganismo que puede manipularse mediante técnicas clásicas de microbiología en laboratorios en condiciones estériles (campana laminar y/o área limpia, medios estériles, instrumentos, equipos, envases, etc.). Sus condiciones óptimas son temperatura de aproximadamente 24°C, pH de aproximadamente 7. El micelio o las esporas pueden almacenarse en una cámara frigorífica (por ejemplo, a 2°C). Los medios de cultivo pueden ser agar

de extracto de malta, agar de dextrosa de patata, agar de levadura de dextrosa de patata, agar de compost específico de *Agaricus*, etc.

El blanco de hongos consiste en un portador (habitualmente cereales cocidos o productos sintéticos) inoculado en condiciones asépticas o estériles con un cultivo puro de una cepa. Es decir, "blanco de hongo" en la presente memoria se refiere a un cultivo de hongos, normalmente un cultivo puro de un heterocarión, portado por un sustrato estéril que es materia particulada friable y dispersable (por ejemplo, granos de cereal).

Más precisamente, el procedimiento de cultivo comienza con la mezcla del blanco de hongo en el compost (generación del blanco de hongo), seguida de una fase vegetativa (desarrollo del blanco de hongo o fase III). El compost inoculado se incuba durante de 13 a 19 días en un entorno controlado para mantener la temperatura, la concentración de CO<sub>2</sub> y la humedad relativa en el aire óptimas. Durante esta fase, el micelio se alimenta del compost, desarrolla biomasa y coloniza el medio. Como resultado, el calor metabólico generado por el compost aumenta hasta la colonización completa y luego disminuye. El pH disminuye desde aproximadamente 7,5 hasta 6 y el color del medio cambia de marrón (compost) a blanco (micelio).

Posteriormente, se añade a la superficie del compost una capa de material inerte conocido como cobertura (por ejemplo, turba o tierra con pH ajustado o una mezcla, por ejemplo, de turba y piedra caliza). En algunos casos, el micelio se mezcla con la cobertura (ya sea con productos patentados o compost colonizado) para promover la colonización de la capa de cobertura y la fructificación. Los parámetros de crecimiento son similares a los del desarrollo del blanco de hongo.

En el contexto del mejoramiento de hongos, la "capa de cobertura" designa una capa de material no nutritivo (turba, tierra o mezcla) que se aplica a la superficie superior de una masa de compost colonizado para permitir el desarrollo del cultivo de hongos. "Inóculo de cobertura" (CI) designa el material de inóculo que incorpora un cultivo de hongos, normalmente de una cepa heterocariota definida, adecuado para mezclarse en la capa de cobertura.

Un ajuste de las condiciones de crecimiento desencadena el cambio desde la fase vegetativa a la reproductiva y la fructificación. Generalmente esto implica una disminución controlada de la temperatura y la humedad relativa junto con la introducción de aire fresco (aireación) para reducir el nivel de CO<sub>2</sub>. En esta etapa asimismo pueden participar técnicas para remover físicamente la superficie, riego y estrés químico.

Los hongos generalmente se desarrollan en el plazo de 7 a 14 días desde la aireación hasta la primera cosecha. La etapa de recolección o cosecha depende del desarrollo fisiológico del hongo y se ajusta a los requerimientos del cultivador para su mercado.

Después de la recolección o cosecha, otros hongos comienzan a crecer en grupos sucesivos a intervalos aproximadamente semanales. El periodo de producción de hongos dentro de un ciclo de cultivo, separado por intervalos sin producción, se denomina en la presente memoria "oleada". Las oleadas sucesivas generalmente producen valores de rendimiento decrecientes. En los sistemas industriales son habituales actualmente dos o tres oleadas, más que en los tradicionales.

La precocidad (tiempos) generalmente se expresa como el tiempo que transcurre desde la cobertura hasta la recolección. Entre oleadas, las condiciones de crecimiento (clima, riego) asimismo se manejan cuidadosamente para generar el número y la calidad apropiados de hongos y ajustar el tiempo de recolección de las oleadas posteriores.

Finalmente se retira el cultivo, se desecha el compost gastado, se limpia la instalación y comienza un nuevo ciclo de cultivo.

La mayoría de las instalaciones modernas que reciben compost de fase III (desarrollo del blanco de hongo completado) y que cultivan durante 2 oleadas presentan muchas salas de cultivo y pueden completar hasta 13 ciclos de cultivo sucesivos por sala por año.

Para el mercado de productos frescos, los hongos se recolectan manualmente, mientras que para el procesamiento se cosechan mecánicamente. Se necesita un periodo de cosecha de 3 a 5 días (escalonado) para la recolección manual, mientras que se requiere uniformidad para la cosecha mecánica (operación única). Esto se obtiene respectivamente mediante una transición suave de la fase vegetativa a la reproductiva, o una transición más rápida, lo que tiene impacto en el número y correlativamente en el tamaño de los hongos.

La humedad de la cobertura, la gestión adecuada de la recolección y la higiene para evitar plagas y enfermedades asimismo son factores clave en la gestión del cultivo con el fin de garantizar la cantidad (el rendimiento) y la calidad en la recolección o cosecha. Los ciclos de cultivo más prolongados aumentan el riesgo de epidemias de plagas y enfermedades. Las primeras oleadas siempre son más limpias que las segundas o incluso que las terceras oleadas.

El rendimiento del cultivo se define como el peso de hongos recolectados (o cosechados) por unidad de área superficial o, más específicamente, el peso de hongos recolectados (o cosechados) por peso de compost pasteurizado, es decir,

como porcentaje.

#### Procesamiento de los hongos después de la cosecha

- 5 El procesamiento tiene como objetivo conservar alimentos tales como verduras, prolongando su término de caducidad mediante preparación de conserva, pasteurización, congelación, liofilización, secado, por ejemplo. Esto es de particular interés para los hongos debido a su término de caducidad naturalmente corto (alrededor de 5 días después de la recolección), especialmente cuando la oferta supera la demanda.
- 10 El procesamiento se organiza en varias etapas. Durante la preparación de conserva, la evacuación consiste en colocar los hongos en condiciones de vacío tras un pretratamiento con agua y aditivos, de manera que el aire se evacue y se reemplace por líquido. El escaldado consiste en sumergir los hongos en agua caliente o hirviendo con aditivos: el calentamiento los hace menos susceptibles al deterioro. Los hongos pueden conservarse enteros o en rebanadas. En la última etapa, los hongos pueden pasteurizarse o esterilizarse. La pasteurización consiste en calentar los hongos hasta 95°C para prolongar su término de caducidad (meses si se refrigeran), mientras que la esterilización consiste en someter los hongos al autoclave hasta aproximadamente 125°C para prolongar su término de caducidad (años a temperatura ambiente). La refrigeración y el remojo pueden producirse en diferentes etapas del procedimiento. Los recipientes pueden ser latas, frascos, bolsas, etc.

- 15
- 20 Puede calcularse la eficacia del procedimiento de preparación de conserva. El rendimiento de preparación de conserva es la razón del peso del producto puesto en conserva al final del procedimiento en comparación con el peso del producto fresco introducido al principio y puede expresarse como una razón, un porcentaje, etc.

- 25  $\% \text{ de rendimiento del producto puesto en conserva} = (\text{peso escurrido total} / \text{peso de la muestra inicial}) \times 100$  (Beelman *et al.* 1973).

- La merma, es decir, la pérdida de peso del producto procesado que se produce durante el escaldado y el procesamiento térmico da como resultado una disminución del rendimiento de preparación de conserva. Dado que el producto puesto en conserva se vende basándose en el peso escurrido, la contracción excesiva da como resultado una pérdida económica considerable para los procesadores. Un estudio realizado sobre costes e ingresos calculó que para una planta de tamaño medio, una reducción del 5% en la merma aumentaría los ingresos en un 20% y los ingresos por hora por encima de los costes en un 21.8% (Coale *et al.* 1972). Cabe destacar que las cepas blanquecinas (tales como Somycel 76) se caracterizan por una mayor pérdida de peso después de la preparación de conserva (es decir, un CY menor) en comparación con las cepas de color blanco lisas. Además, proporcionan menor calidad (el tejido del sombrero es menos blanco, las laminillas se vuelven marrones antes) (Steinbuch 1978, Fristche, 1983).

- 30 Se considera que muchos factores tienen un impacto sobre el rendimiento de preparación de conserva: el grado de los hongos (diámetro del sombrero), la etapa (madurez fisiológica), la oleada, las técnicas de cultivo, las condiciones de almacenamiento (parámetros de tiempo y clima), etc. y asimismo parámetros del procedimiento tecnológico. Debido a los grandes volúmenes procesados, la optimización de las materias primas y los procedimientos son la principal preocupación de las conserveras y la industria agradece las ganancias en el rendimiento de preparación de conserva, especialmente cuando presentan márgenes de productos básicos. La falta de diversidad genética en las cepas comerciales actuales restringe el campo de mejora y ganancia a los parámetros del procedimiento tecnológico.

- 40
- 45 El rendimiento del cultivo es importante tanto para los mercados frescos como para los de procesamiento, y el rendimiento del procesamiento es el más importante para la industria de la conservación de hongos.

- En los sistemas modernos, el rendimiento del cultivo y el rendimiento del procesamiento se combinan en un cálculo del valor económico del cultivo, es decir, el resultado económico, por ejemplo, valor del cultivo x valor del procesamiento. Una mejora del rendimiento del cultivo o del rendimiento del procesamiento puede tener un impacto en el resultado económico y, como consecuencia, la combinación de una ganancia para ambos parámetros puede tener un impacto económico muy significativo. La eficiencia económica puede calcularse como el peso escurrido de hongos procesados frente a la masa de sustrato pasteurizado en la generación del blanco de hongo (%) o como el peso escurrido de los hongos procesados/m<sup>2</sup> del cultivo.

- 50
- 55 Desarrollo de progenies

- Para desarrollar una progenie a partir de una cepa dada, la primera etapa es obtener una esporada a partir de un hongo de esta cepa. Se recolecta un hongo de un cultivo en la etapa apropiada (mientras el velo se estira pero antes de que se rompa) y se coloca en una cámara aséptica (por ejemplo, un vaso de precipitados) sobre una lámina estéril (por ejemplo, papel de calco esterilizado en autoclave) a temperatura ambiente. Los hongos madurarán en el plazo de algunos días y las esporas se liberarán sobre el papel. Las esporadas pueden conservarse a temperatura de frigorífico una vez envasadas en una placa o tubo estéril.

- 60
- 65 Las siguientes etapas se completan en un entorno estéril (campana laminar, área limpia). Se preparan placas de Petri de un medio apropiado, o bien con un micelio de *A. bisporus* o bien con ácido isovalérico, que presentan ambos la

propiedad de estimular la germinación de esporas.

En una segunda etapa, se prepara una disolución de esporas, se siembran en placas de Petri preparadas previamente y se dejan crecer durante algunos días (incubadora).

En una tercera etapa, en cuanto comienza la germinación, las esporas individuales (recién germinadas) se recolectan (microscopio de disección bajo una campana estéril) utilizando instrumentos estériles (por ejemplo, agujas de disección), se transfieren individualmente a placas nuevas y se dejan crecer (incubadora).

#### Incompatibilidad vegetativa

La compatibilidad/incompatibilidad vegetativa (asimismo denominada “incompatibilidad de heterocariones” o “reconocimiento propio/no propio”) es un fenómeno diferente de la compatibilidad sexual. Se expresa en la etapa heterocariota como un fenómeno antagónico que impide que el micelio de dos heterocariones distintos se anastomosen y creen continuidad de citoplasma. Cuando se hacen crecer uno al lado del otro, dos heterocariones vegetativamente incompatibles mostrarán un retardo en el crecimiento y/o en el desarrollo de los hongos, mientras que dos heterocariones compatibles mostrarán un crecimiento y tiempos normales.

La incompatibilidad vegetativa puede ser una ventaja en lo que se refiere a la higiene de las instalaciones de crecimiento de hongos. Una variedad de enfermedades virales puede infectar los cultivos de hongos, siendo las más comunes el virus X (MVXD) y el virus La France (LIV) (Fletcher y Gaze, 2008). Se conocen dos posibles medios de transferencia de virus:

- de micelio a micelio a través de la fusión de hifas (anastomosis) con transferencia del contenido celular,
- en esporas de hongos que germinan y transmiten el virus al micelio sano por anastomosis.

La anastomosis entre cepas de hongos es esencial para la transferencia de virus. Las epidemias se desarrollan a través de fragmentos de micelio viable que permanecen sobre o dentro de los equipos o a través de fragmentos transportados por el aire cuando se manipula compost a granel incubado (durante o al final del desarrollo del blanco de hongo, al remover la superficie o en la cobertura...). De este modo, la enfermedad puede propagarse dentro de una instalación o entre instalaciones.

Una vez que una granja está infectada, la utilización de una segunda cepa alternativa que muestre incompatibilidad vegetativa con la cepa cultivada normalmente puede interrumpir el ciclo de infección. En este caso, se considera que la segunda cepa presenta propiedades de suspensión de virus.

Es conocido que dentro de los híbridos de gama media (derivados de U1) se produce anastomosis, es decir, las cepas son vegetativamente compatibles. Por el contrario, las cepas blanquecinas no se anastomosan fácilmente con las de color blanco liso, es decir, estas cepas son vegetativamente incompatibles (Fletcher y Gaze, 2008).

#### **Híbridos de la invención**

La presente invención se refiere a una cepa híbrida de *Agaricus bisporus* que presenta la cepa J10117 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4950, como primera cepa parental y una cepa blanca de *Agaricus bisporus* como segundo progenitor, seleccionándose dicha cepa híbrida de entre el grupo que consiste en:

- LB811, que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4945,
- LB906 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4946, y
- derivados de las mismas, en los que dichos derivados son híbridos de *Agaricus bisporus* que comprenden todos los marcadores moleculares SSR y/o las secuencias alélicas de P1N150 del híbrido LB811 que se ha depositado con el número de registro de CNCM I-4945 o del híbrido LB906 que se ha depositado con el número de registro de CNCM I-4946 o del híbrido J10117 que se ha depositado con el número de registro de CNCM I-4950,

en la que las combinaciones alélicas de P1N150 para LB811, LB906 y J10117 son las de la tabla 17,

y en la que los marcadores moleculares SSR para LB811, LB906 y J10117 son los de la tabla 15bis,

en la que dicha cepa híbrida presenta un rendimiento de preparación de conserva mejorado, definiéndose el rendimiento de preparación de conserva mejorado como un rendimiento de preparación de conserva superior en comparación con el hongo procedente de una cepa de *Agaricus bisporus* A15 comercial de control.

Estos híbridos se denominarán a continuación en la presente memoria "J10117" (o "J 10117"), "LB811" (o "LB-811") y "LB906" (o "LB-906").

Se ha realizado un depósito de un cultivo del híbrido de *Agaricus bisporus* J10117 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARÍS CEDEX 15, FRANCIA. La fecha de depósito fue el 20 de enero de 2015. Dicho depósito lo realizó SOMYCEL, antes de la fecha de presentación de esta solicitud. El depósito pretende cumplir con todos los requisitos de depósito en virtud del Tratado de Budapest. El n.º de registro de CNCM es I-4950. El depósito se mantendrá en el depositario durante un periodo de 30 años o 5 años después de la última solicitud o durante la vigencia de la patente, lo que sea más largo y se reemplazará según sea necesario durante ese periodo.

El híbrido de *Agaricus bisporus* J10117 puede cruzarse con cualquier cepa de *Agaricus bisporus*. Dicha cepa es por ejemplo una cepa marrón o una cepa blanca de *A. bisporus*.

En una forma de realización preferida, dicha cepa blanca es U1 o un derivado de la misma, o cualquier cepa blanca útilmente equivalente (es decir, idéntica, perteneciente al mismo grupo de linaje derivado o funcionalmente similar). Otras cepas blancas incluyen cepas blanquecinas tradicionales (=OW) tales como, por ejemplo, Somycel 9.2, Somycel 76 o Somycel 611 o cepas Smooth-White (=SW) tales como, por ejemplo, Somycel 53. Estas y otras cepas OW forman un grupo de linaje derivado que comparten una identidad genética común y son funcionalmente equivalentes e intercambiables. Se ha realizado un depósito de un cultivo de la cepa híbrida Somycel 76, tal como se da a conocer en la presente memoria, con la Agricultural Research Services Culture Collection (NRRL) 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604 EE.UU. el 18 de febrero de 2014, con el n.º de registro de NRRL 50903. En otra forma de realización preferida, dicha cepa blanca es Fungisem FS 9.18, que se encuentra disponible comercialmente.

En una forma de realización preferida, dicha cepa marrón es Sylvan 800 o Sylvan 856. Se han obtenido líneas homocariotas a partir de los híbridos J10117, Somycel 76 y FS9-18, y se han generado progenies híbridas mediante apareamiento convencional de estas líneas. Resulta interesante que dos de ellas (concretamente LB811 y LB906) mostraron una mejora en el rendimiento de preparación de conserva y los valores agronómicos (en lo que se refiere al peso del hongo, el tamaño del sombrero, tiempos, etc.), así como un fenotipo apropiado para la satisfacción de productor y consumidor (luminosidad, lisura, forma del sombrero, diámetro del estípite, ver los ejemplos a continuación). Además, se ha demostrado que son vegetativamente incompatibles con todas las cepas comerciales sometidas a prueba, incluyendo sus progenitores J10117, Somycel 76 y FS9-18.

LB811 y LB906 presentan J10117 como un primer progenitor. Más precisamente, el híbrido LB811 presenta la cepa J10117 como un primer progenitor y la cepa FS9-18 como el segundo progenitor. Además, el híbrido LB906 presenta la cepa J10117 como un primer progenitor y la cepa Somycel 76 como el segundo progenitor.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a cepas de hongos híbridos que presentan la cepa J10117 como un primer progenitor y una cepa blanca o marrón de *Agaricus bisporus* como un segundo progenitor. En una forma de realización preferida, dicha cepa blanca es U1 o un derivado de la misma o una cepa de tipo OW o una cepa de tipo SW. En una forma de realización más preferida, dicha cepa blanca es una cepa OW seleccionada del grupo formado por: Somycel 9.2, Somycel 76 o Somycel 611 y sus derivados. En otra forma de realización más preferida, dicha cepa blanca es Fungisem FS 9-18.

Específicamente, las líneas homocariotas J10117s62, 76s14 y FS9-18s50 se han obtenido a partir de los híbridos J10117, Somycel 76 y FS9-18, respectivamente. Los híbridos LB811 y LB906 se han producido apareando la línea de *Agaricus bisporus* homocariota J10117s62 (obtenida a partir de J10117) con líneas homocariotas (76s14 y FS9-18s50) derivadas de las cepas disponibles comercialmente Somycel 76 y FS9-18, respectivamente. De manera ventajosa, estos dos híbridos mostraron una mejora en el aspecto de primer brote, rendimiento de preparación de conserva, rendimiento y valor agronómico (por ejemplo, peso y tamaño del hongo) y un fenotipo apropiado para la satisfacción de productor y consumidor (por ejemplo, diámetro del estípite, luminosidad y lisura del sombrero, etc.).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de producción de los híbridos de la invención (J10117, LB811 y/o LB906).

En una forma de realización particular, dicho método comprende las etapas siguientes:

- a) obtener esporas a partir de dicho cultivo de hongos híbridos,
- b) hacer germinar dichas esporas,
- c) transferir cultivos de esporas en germinación a nuevos medios de crecimiento.

Cada etapa puede realizarse mediante cualquier medio convencional, tal como se dio a conocer anteriormente.

#### Depósitos de CNCM

5 Se ha realizado un depósito de un cultivo del homocarión de *Agaricus bisporus* J10117s62 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15. La fecha de depósito fue el 20 de enero de 2015. Dicho depósito lo realizó SOMYCEL, antes de la fecha de presentación de esta solicitud. El depósito pretende cumplir con todos los requisitos en virtud del Tratado de Budapest. El n.º de registro de CNCM es I-4948. El depósito se mantendrá en el depositario durante un periodo de 30 años, o 5 años después de la última solicitud, o durante la vigencia de la patente, lo que sea más largo, y se reemplazará según sea necesario durante ese periodo.

15 Se ha realizado un depósito de un cultivo del homocarión de *Agaricus bisporus* 76s14 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15. La fecha de depósito fue el 20 de enero de 2015. Dicho depósito lo realizó SOMYCEL, antes de la fecha de presentación de esta solicitud. El depósito pretende cumplir con todos los requisitos en virtud del Tratado de Budapest. El n.º de registro de CNCM es I-4947. El depósito se mantendrá en el depositario durante un periodo de 30 años, o 5 años después de la última solicitud, o durante la vigencia de la patente, lo que sea más largo y se reemplazará según sea necesario durante ese periodo.

20 Se ha realizado un depósito de un cultivo del heterocarión de *Agaricus bisporus* FS9-18 con la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15. La fecha de depósito fue el 20 de enero de 2015. Dicho depósito lo realizó SOMYCEL, antes de la fecha de presentación de esta solicitud. El depósito pretende cumplir con todos los requisitos en virtud del Tratado de Budapest. El n.º de registro de CNCM es I-4949. El depósito se mantendrá en el depositario durante un periodo de 30 años, o 5 años después de la última solicitud, o durante la vigencia de la patente, lo que sea más largo y se reemplazará según sea necesario durante ese periodo. Este heterocarión generó homocariones tales como FS9.18s50, que se han utilizado para generar LB811.

30 En una forma de realización preferida, el híbrido de la invención es el híbrido de *Agaricus bisporus* LB811 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARÍS CEDEX 15, FRANCIA el 20 de enero de 2015 por SOMYCEL, y cuyo n.º de registro de CNCM es I-4945. Este depósito pretende cumplir con todos requisitos de depósito en virtud del tratado de Budapest. En particular, se mantendrá en el depositario durante un periodo de 30 años, o 5 años después de la última solicitud, o durante la vigencia de la patente, lo que sea más largo y se reemplazará según sea necesario durante ese periodo.

40 En otra forma de realización preferida, el híbrido de la invención es el híbrido de *Agaricus bisporus* LB906 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARÍS CEDEX 15, FRANCIA el 20 de enero de 2015 por SOMYCEL, y cuyo n.º de registro de CNCM es I-4946. Este depósito pretende cumplir con todos requisitos de depósito en virtud del tratado de Budapest. En particular, se mantendrá en el depositario durante un periodo de 30 años, o 5 años después de la última solicitud, o durante la vigencia de la patente, lo que sea más largo y se reemplazará según sea necesario durante ese periodo.

45 A continuación se proporciona una breve descripción del genotipo de los híbridos de la invención en 22 marcadores SSR (repetición de secuencia única) (para detalles sobre estos marcadores, ver Foulongne-Oriol *et al.*, 2009). Debido a que los híbridos incorporan dos juegos de cromosomas, existen dos copias alélicas en cada locus de marcador.

La tabla 1 presenta una huella de 22 marcadores SSR para los híbridos de la invención.

| marcadores | LB811   | LB906   | J10117  |
|------------|---------|---------|---------|
| AbSSR02    | 188/188 | 188/192 | 188/188 |
| AbSSR05    | 329/332 | 329/332 | 329/332 |
| AbSSR12    | 171/171 | 171/171 | 171/174 |
| AbSSR13    | 212/212 | 212/212 | 212/212 |
| AbSSR14    | 167/167 | 167/167 | 167/167 |
| AbSSR19    | 191/191 | 191/191 | 191/191 |
| AbSSR23    | 176/176 | 176/176 | 176/176 |
| AbSSR31    | 167/167 | 167/167 | 167/167 |
| AbSSR33    | 192/192 | 192/192 | 192/192 |
| AbSSR36    | 149/157 | 149/149 | 149/149 |
| AbSSR39    | 186/188 | 186/188 | 186/188 |
| AbSSR42    | 177/179 | 179/179 | 177/179 |
| AbSSR43    | 231/231 | nd      | 231/231 |
| AbSSR45    | 193/203 | 193/203 | 193/203 |
| AbSSR49    | 174/174 | 174/174 | 174/174 |

| marcadores | LB811   | LB906   | J10117  |
|------------|---------|---------|---------|
| AbSSR56    | 225/225 | 225/225 | 225/225 |
| AbSSR57    | 257/257 | 257/257 | 257/257 |
| AbSSR58    | 165/169 | 167/169 | 169/169 |
| AbSSR59    | 197/201 | 197/201 | 197/201 |
| AbSSR60    | 206/208 | 206/208 | 206/208 |
| AbSSR64    | 104/104 | 104/104 | 104/104 |
| AbSSR65    | 197/213 | 188/213 | 213/213 |

Los perfiles de marcadores dados a conocer en la tabla I representan un pequeño extracto de la secuencia del genoma de los híbridos reivindicados. Estos marcadores se han seleccionado porque se distribuyen a intervalos espaciados ampliamente que abarcan todo el genoma nuclear y se sabe que distinguen distintas cepas comerciales de hongos (Foulongne-Oriol *et al.*, 2009).

Por ejemplo, es posible distinguir el híbrido LB811 de todos los derivados de U1 por su genotipo en cualquiera de los cuatro marcadores AbSSR 23, 39, 58 y 65. Además, es posible distinguir el híbrido LB906 de todos los derivados de U1 por su genotipo en cualquiera de los cinco marcadores AbSSR 02, 23, 36, 39 y 42. Finalmente, es posible distinguir el híbrido J10117 de todos los derivados de U1 por su genotipo en cualquiera de los seis marcadores AbSSR 12, 23, 36, 39, 58 y 65.

Los híbridos y las cepas de la invención pueden distinguirse de las cepas derivadas de U1 comerciales, tales como A15, así como de otras cepas híbridas o cepas de homocarión, tales como J10165 (tal como se da a conocer en los documentos US20100218294 y US2100154079), J11500 (tal como se da a conocer en el documento WO/2015/114612) y J9277 (tal como se da a conocer en los documentos US20080182321 y US2010154079).

La tabla 2 representa un pequeño extracto de la secuencia del genoma de los híbridos reivindicados frente a cepas o híbridos conocidos y muestra que, utilizando los marcadores AbSSR tal como se indicó anteriormente, existen muchas diferencias genéticas entre ellos.

Tabla 2. Huellas de 22 marcadores SSR de los híbridos de la invención y de cepas conocidas

| marcadores | LB811   | LB906   | J10117  | J10165  | J11500  | J9277   | A15     |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| AbSSR02    | 188/188 | 188/192 | 188/188 | 188/188 | 188/188 | 188/188 | 188/188 |
| AbSSR05    | 329/332 | 329/332 | 329/332 | 329/332 | -/-     | 329/332 | 329/332 |
| AbSSR12    | 171/171 | 171/171 | 171/174 | 171/171 | 171/173 | 171/171 | 171/171 |
| AbSSR13    | 212/212 | 212/212 | 212/212 | 212/212 | 212/212 | 212/212 | 212/212 |
| AbSSR14    | 167/167 | 167/167 | 167/167 | 167/167 | 165/167 | 167/167 | 167/167 |
| AbSSR19    | 191/191 | 191/191 | 191/191 | 191/191 | 191/191 | 191/191 | 191/191 |
| AbSSR23    | 176/176 | 176/176 | 176/176 | 170/176 | 170/176 | 170/176 | 170/176 |
| AbSSR31    | 167/167 | 167/167 | 167/167 | 167/167 | 167/167 | 167/167 | 167/167 |
| AbSSR33    | 192/192 | 192/192 | 192/192 | 192/192 | 192/192 | 192/192 | 192/192 |
| AbSSR36    | 149/157 | 149/149 | 149/149 | 149/149 | 149/149 | 149/157 | 149/157 |
| AbSSR39    | 186/188 | 186/188 | 186/188 | 186/186 | 186/186 | 186/188 | 186/186 |
| AbSSR42    | 177/179 | 179/179 | 177/179 | 177/177 | 156/179 | 177/177 | 177/179 |
| AbSSR43    | 231/231 | nd      | 231/231 | 231/231 | 231/231 | 231/231 | 231/231 |
| AbSSR45    | 193/203 | 193/203 | 193/203 | 193/203 | 193/203 | 193/197 | 193/203 |
| AbSSR49    | 174/174 | 174/174 | 174/174 | 174/174 | 174/174 | 174/174 | 174/174 |
| AbSSR56    | 225/225 | 225/225 | 225/225 | 219/225 | -/-     | 219/219 | 225/225 |
| AbSSR57    | 257/257 | 257/257 | 257/257 | 257/257 | 257/257 | 257/257 | 257/257 |
| AbSSR58    | 165/169 | 167/169 | 169/169 | 167/169 | 167/167 | 167/169 | 167/169 |
| AbSSR59    | 197/201 | 197/201 | 197/201 | 197/201 | 197/201 | 197/201 | 197/201 |
| AbSSR60    | 206/208 | 206/208 | 206/208 | 206/208 | 206/208 | 208/208 | 206/208 |
| AbSSR64    | 104/104 | 104/104 | 104/104 | 104/104 | 104/104 | 104/104 | 104/104 |
| AbSSR65    | 197/213 | 188/213 | 213/213 | 188/213 | 188/213 | 188/213 | 188/213 |

La tabla 3 reúne y resume las diferencias genotípicas entre las cepas sometidas a prueba.

|        |                    | A15 | LB811 | LB906 | J10117 | J10165 | J11500 | J9277 |
|--------|--------------------|-----|-------|-------|--------|--------|--------|-------|
| LB811  | N.º de diferencias | 4   |       |       |        |        |        |       |
|        | N.º de marcadores  | 22  |       |       |        |        |        |       |
| LB906  | N.º de diferencias | 5   | 5     |       |        |        |        |       |
|        | N.º de marcadores  | 21  | 22    |       |        |        |        |       |
| J10117 | N.º de diferencias | 5   | 4     | 5     |        |        |        |       |
|        | N.º de marcadores  | 22  | 22    | 21    |        |        |        |       |
| J10165 | N.º de diferencias | 3   | 7     | 5     | 7      |        |        |       |
|        | N.º de marcadores  | 22  | 22    | 21    | 22     |        |        |       |
| J11500 | N.º de diferencias | 5   | 8     | 7     | 7      | 4      |        |       |
|        | N.º de marcadores  | 20  | 20    | 19    | 20     | 20     |        |       |
| J9277  | N.º de diferencias | 5   | 7     | 7     | 9      | 5      | 8      |       |
|        | N.º de marcadores  | 22  | 22    | 21    | 22     | 22     | 20     |       |

Con este panel de 22 marcadores SSR, cada una de las cepas muestra un perfil de genotipo único. El número de alelos diferentes entre las cepas (comparaciones de pares) se presenta en la tabla anterior.

Cada una de las cepas presenta por lo menos un alelo raro o único:

- 2 para LB811: AbSSR58 (165), AbSSSR65 (197)
- 1 para LB906: AbSSR02 (192)
- 1 para J10117: AbSSR12 (174)
- 1 para J10165: AbSSR56 (219)
- 3 para J11500: AbSSR12 (173), AbSSR14 (165), AbSSR42 (156)
- 2 para J9277: AbSSR45 (197), AbSSR57 (219)

Los híbridos de la invención asimismo pueden distinguirse de otras cepas de hongos mediante el análisis de los diferentes alelos en el locus *MAT*. *A. bisporus* presenta un sistema unifactorial multialélico de intercompatibilidad sexual bajo el control del locus *MAT* que presenta 14 alelos (Xu *et al.*, 1993, Imbernon *et al.*, 1995). Debido a la reproducción sexual y al ciclo de vida de *A. bisporus*, el genotipo de los heterocariotes fértiles fructíferos siempre es heterocigoto en el locus *MAT* y por tanto heteroalélico en los marcadores vinculados al locus *MAT*, tal como el marcador P1N150.

El genotipo de P1N150 del híbrido LB811 es un perfil de genotipo heterocariota "4/7".

El genotipo de P1N150 del híbrido LB906 es un perfil de genotipo heterocariota "3/4".

El genotipo de P1N150 del híbrido J10117 es un perfil de genotipo heterocariota "2/4".

Los híbridos de la invención pueden identificarse sin ambigüedades mediante el análisis de estos marcadores de locus SSR o *MAT*. Para este fin, puede utilizarse cualquier cebador de PCR adecuado que abarque las regiones marcadoras definidas. Los métodos de diseño y utilización de cebadores de PCR adecuados se conocen bien en la técnica. A este respecto asimismo pueden utilizarse métodos de secuenciación.

#### Derivados de los híbridos de la invención

La presente invención asimismo comprende células "que derivan" de los híbridos mencionados anteriormente. Estas células se denominan a continuación en la presente memoria "derivados", en los que dichos derivados son híbridos de *Agaricus bisporus* que comprenden todos los marcadores moleculares SSR y/o las secuencias alélicas de P1N150 del híbrido LB811 que se ha depositado con el número de registro de CNCM I-4945 o del híbrido LB906 que se ha depositado con el número de registro de CNCM I-4946 o del híbrido J10117 que se ha depositado con el número de registro de CNCM I-4950,

en la que las combinaciones alélicas de P1N150 para LB811, LB906 y J10117 son las de la tabla 17,

y en la que los marcadores moleculares SSR para LB811, LB906 y J10117 son los de la tabla 15bis.

Los métodos para obtener dichos derivados incluyen: selección somática, selección en cultivo tisular, germinación de una sola espora, germinación de múltiples esporas, apareamiento entre micelios obtenidos a partir de esporas homocariotas o heterocariotas de estos híbridos, autofecundación, apareamiento repetido de vuelta al cultivo inicial, mutagénesis, conversión de rasgos, conversión de rasgos de introgresión, endogamia y transformación, por dar algunos ejemplos. Tal como se utiliza en la presente memoria, transformación es el procedimiento de introducir nuevo material genético en el genoma del cultivo inicial por medios biotecnológicos (Velcko *et al.*, 2004). Conversión de

rasgos de introgresión representa en la presente memoria el apareamiento de una línea de interés con una cepa de manera que se introduce un rasgo deseado de la cepa de interés en un trasfondo genético predominante de la otra cepa. Conversión de rasgos representa la introducción selectiva de los determinantes genéticos de uno o más rasgos deseables en el trasfondo genético de una cepa inicial mientras se retiene la mayor parte del trasfondo genético de la cepa inicial. Los porcentajes del genotipo inicial que estará presente en los derivados de *A. bisporus* oscilan entre casi 100% en el caso de selecciones somáticas, 99.x% en el caso de cepas modificadas mediante transformación mediada por ADN, 90-99.x% en el caso de selecciones de una sola espora o de múltiples esporas o alguna mutagénesis, y un promedio de aproximadamente 75% a aproximadamente 85% en el caso de apareamientos entre hermanos-descendientes (= autofecundación). Se conocen en la técnica muchos métodos de determinación de genotipos para determinar el porcentaje de ADN de un cultivo inicial que está presente en otro cultivo.

La presente descripción da a conocer cultivos que se benefician sustancialmente de la utilización de una línea obtenida a partir de las cepas LB811 o LB906 en su desarrollo, tales como descendencia (o progenie) híbrida que presenta una línea obtenida a partir de la cepa LB811 o LB906 como un progenitor.

La presente invención comprende estos híbridos o líneas descendientes (asimismo denominados "descendencia" o "progenie") obtenidos utilizando los híbridos de la invención y pueden designarse como "derivados". Pueden ser homocariones o heterocariones.

Habitualmente, los híbridos descendientes se obtienen haciendo crecer dos homocariones uno al lado del otro en una sola placa de Petri, permitiendo su crecimiento (incubadora) hasta que se establece un contacto entre ellos. Para un cruce sexualmente compatible, posteriormente se desarrollará un micelio denso ("estroma") o de rápido crecimiento en la interfase. Puede recolectarse, transferirse a placas nuevas y cultivarse (incubadora).

En otro aspecto, la presente descripción asimismo da a conocer un procedimiento de producción de un nuevo cultivo de hongos híbridos, que comprende el apareamiento del homocarión obtenido a partir de los híbridos LB811 o LB906 o J10117 con un segundo homocarión de *A. bisporus*.

En otro aspecto, la presente invención se refiere además a un procedimiento de producción de un nuevo cultivo de hongos híbridos, que comprende el apareamiento del homocarión obtenido a partir de los híbridos LB811 o LB906 o J10117 con un segundo heterocarión de *A. bisporus*.

En otro aspecto, la presente descripción asimismo da a conocer un procedimiento de producción de un nuevo cultivo de hongos híbridos, que comprende el apareamiento de los híbridos LB811, LB906 o J10117 con un segundo homocarión de *A. bisporus*.

Los híbridos heterocariotas o las líneas homocariotas obtenidos mediante estos procedimientos está comprendidos dentro de la invención como derivados "híbridos".

El alcance de la presente invención asimismo comprende los híbridos o líneas obtenidos a partir de la cepa LB811 o LB906 o J10117, que presentan un rasgo genético introducido a través de apareamientos de introgresión de descendencia con la línea obtenida a partir de las cepas LB811, LB906, J10117 o a través de transformación.

En esta forma de realización, los derivados de híbridos pueden reconocerse sin ambigüedades por su genotipo, que será predominantemente un subconjunto del que presenta el cultivo inicial individual (incluyendo los 22 marcadores SSR y el marcador P1N150 dado a conocer anteriormente).

Al derivar de la misma línea homocariota, los híbridos LB811 y LB906 comparten marcadores moleculares y/o secuencias comunes con el homocarión J10117s62 (véase la tabla 4 a continuación).

La tabla 4 presenta los marcadores SSR de los híbridos de la invención y del homocarión J10117s62.

| Marcador SSR | LB811   | LB906   | J10117s62 |
|--------------|---------|---------|-----------|
| AbSSR02      | 188/188 | 188/192 | 188       |
| AbSSR05      | 329/332 | 329/332 | 332       |
| AbSSR12      | 171/171 | 171/171 | 171       |
| AbSSR13      | 212/212 | 212/212 | 212       |
| AbSSR14      | 167/167 | 167/167 | 167       |
| AbSSR19      | 191/191 | 191/191 | 191       |
| AbSSR23      | 176/176 | 176/176 | 176       |
| AbSSR31      | 167/167 | 167/167 | 167       |
| AbSSR33      | 192/192 | 192/192 | 192       |
| AbSSR36      | 149/157 | 149/149 | 149       |
| AbSSR39      | 186/188 | 186/188 | 188       |
| AbSSR42      | 177/179 | 179/179 | 179       |

| Marcador SSR | LB811   | LB906   | J10117s62 |
|--------------|---------|---------|-----------|
| AbSSR43      | 231/231 | nd      | nd        |
| AbSSR45      | 193/203 | 193/203 | 203       |
| AbSSR49      | 174/174 | 174/174 | 174       |
| AbSSR56      | 225/225 | 225/225 | 225       |
| AbSSR57      | 257/257 | 257/257 | 257       |
| AbSSR58      | 165/169 | 167/169 | 169       |
| AbSSR59      | 197/201 | 197/201 | 201       |
| AbSSR60      | 206/208 | 206/208 | 206       |
| AbSSR64      | 104/104 | 104/104 | 104       |
| AbSSR65      | 197/213 | 188/213 | 213       |

Además, el progenitor homocariota J10117s62 presenta el marcador alélico P1N150 "4" en el locus *MAT*.

La presente descripción asimismo da a conocer híbridos de *Agaricus bisporus* que comprenden (en por lo menos un alelo por locus) todos los marcadores moleculares SSR y/o la secuencia alélica de P1N150 del homocarión J10117s62.

En otra forma de realización, la descripción asimismo da a conocer híbridos de *Agaricus bisporus* que comprenden todos los marcadores moleculares SSR y/o las secuencias alélicas de P1N150 del híbrido LB811 que se han depositado con el número de registro de CNCM I-4945 o del híbrido LB906 que se ha depositado con el número de registro de CNCM I-4946 o del híbrido J10117 que se ha depositado con el número de registro de CNCM I-4950.

Dichos híbridos presentan ventajosamente un sombrero de color blanco liso, un rendimiento de preparación de conserva mejorado, un valor agronómico mejorado y un fenotipo apropiado para la satisfacción de productor y consumidor.

Más precisamente, una forma de realización de esta invención es un heterocarión de *A. bisporus* que comprende, en uno de sus alelos por locus, los mismos marcadores SSR que una línea obtenida a partir de los híbridos LB811, LB906 o J10117 para por lo menos el 50% de los marcadores enumerados en la tabla I anterior. En otras formas de realización, la presente invención comprende heterocariones que comprenden en uno de sus alelos por locus el mismo marcador SSR que una línea obtenida a partir de los híbridos LB811, LB906 o J10117 para por lo menos el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o esencialmente el 100% de los marcadores enumerados en la tabla I anterior. En una forma de realización preferida, dicho heterocarión de *A. bisporus* presenta adicionalmente la secuencia alélica de P1N150 "4" (para células derivadas de J10117, LB811 y LB906) o "7" (para células derivadas de LB811) o "3" (para células derivadas de LB906) o "2" (para células derivadas de J10117).

#### Cultivos celulares y productos que incorporan los híbridos de la invención

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un cultivo de hongos híbridos de *Agaricus bisporus* que comprende cualquiera de los híbridos de *Agaricus bisporus* de la invención, tal como se describió anteriormente. Es importante destacar que este cultivo de hongos híbridos muestra un rendimiento de preparación de conserva mejorado, un valor agronómico mejorado (rendimiento agronómico, tamaño y peso del hongo, etc.) y un fenotipo apropiado para la satisfacción de productor y consumidor (luminosidad, lisura, diámetro del estípite, etc.). En particular, es vegetativamente incompatible con las cepas de hongos comerciales blancas.

En particular, la presente invención se refiere un cultivo de hongos híbridos de *Agaricus bisporus* que comprende:

- el híbrido de *Agaricus bisporus* LB811 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARÍS CEDEX 15, FRANCIA el 20 de enero de 2015, por SOMYCEL y cuyo n.º de registro de CNCM es I-4945, o derivados del mismo, o
- el híbrido de *Agaricus bisporus* LB906 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARÍS CEDEX 15, FRANCIA el 20 de enero de 2015, por SOMYCEL y cuyo n.º de registro de CNCM es I-4946, o derivados del mismo, o
- el híbrido de *Agaricus bisporus* J10117 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARÍS CEDEX 15, FRANCIA el 20 de enero de 2015, por SOMYCEL y cuyo n.º de registro de CNCM es I-4950 o derivados del mismo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a cualquier producto que incorpore dicho cultivo de hongos híbridos de la invención. En una forma de realización preferida dicho producto se selecciona de entre el grupo que consiste en: micelio, blanco de hongo, inóculo, inóculo de cobertura y sustratos colonizados (por ejemplo, grano, compost, cobertura y materia particulada friable).

Estos productos pueden obtenerse tal como se indicó anteriormente, mediante medios convencionales.

En otro aspecto la descripción asimismo da a conocer cualquiera parte de estos cultivos. Dicha parte puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en hifas, esporas y partes de células, incluyendo dichas partes por ejemplo núcleos, mitocondrias, citoplasma, protoplastos, ADN, ARN, proteínas, membranas celulares y paredes celulares, estando presente cada parte o bien en el micelio vegetativo del cultivo o bien en los hongos producidos por el cultivo o en ambos.

En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a cualquier célula de los cultivos de *Agaricus bisporus* descritos anteriormente.

En otra forma de realización preferida, la presente invención se refiere a una espora que comprende una célula de los cultivos de *Agaricus bisporus* descritos anteriormente.

Más en general, la presente descripción asimismo da a conocer un cultivo o producto que incorpora los marcadores moleculares SSR y/o las secuencias alélicas de P1N150 de líneas obtenidas a partir de los híbridos de la invención. En una forma de realización preferida, dicho cultivo o producto comprende los mismos alelos que los de una línea inicial obtenida a partir de LB811, LB906 o J10117 para por lo menos el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o esencialmente el 100% de los marcadores SSR o secuencias alélicas de P1N150.

#### Homocariones de los híbridos de la invención

Los homocariones son derivados específicos de los híbridos de la invención; pueden obtenerse mediante cualquier medio convencional. El aislamiento de aislados de esporas individuales (SSI) en condiciones apropiadas es un ejemplo: las esporas de los híbridos de la invención pueden diluirse en medio líquido y sembrarse en placas en un medio de agar nutritivo. Asimismo pueden utilizarse métodos alternativos de desheterocariotización (por ejemplo, formación de protoplastos a partir de micelio o células).

En la literatura científica se han descrito varios métodos para identificar y seleccionar homocariones: métodos fenotípicos (crecimiento lento del micelio, aspecto diferente del micelio), capacidades específicas (capacidad de fructificación, capacidad de cruzamiento), métodos genotípicos (marcadores enzimáticos, marcadores moleculares, técnicas de secuenciación...) o diferentes combinaciones.

En un aspecto específico, la presente invención se refiere a homocariones (o líneas homocariotas) obtenidos a partir de los híbridos de la invención o a partir de derivados de los mismos.

En particular, la presente invención se refiere a homocariones (o líneas homocariotas) obtenidos a partir de:

- el híbrido de *Agaricus bisporus* LB811 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARÍS CEDEX 15, FRANCIA el 20 de enero de 2015 por SOMYCEL y cuyo n.º de registro de CNCM es I-4945, o a partir de derivados del mismo, o a partir de
- el híbrido de *Agaricus bisporus* LB906 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARÍS CEDEX 15, FRANCIA el 20 de enero de 2015 por SOMYCEL, cuyo n.º de registro de CNCM es I-4946, o a partir de derivados del mismo, o a partir de
- el híbrido de *Agaricus bisporus* J10117 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARÍS CEDEX 15, FRANCIA el 20 de enero de 2015 por SOMYCEL y cuyo n.º de registro de CNCM es I-4950 o a partir de derivados del mismo.

Más particularmente, la presente descripción asimismo da a conocer el homocarión de *Agaricus bisporus* J10117s62 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15 el 20 de enero de 2015 por SOMYCEL con el n.º de registro de CNCM I-4948. El depósito se mantendrá en el depositario durante un periodo de 30 años, o 5 años después de la última solicitud, o durante la vigencia de la patente, lo que sea más largo y se reemplazará según sea necesario durante ese periodo.

La presente descripción asimismo da a conocer un homocarión de *A. bisporus* que comprende los mismos marcadores SSR que una línea obtenida a partir de los híbridos LB811, LB906 o J10117 para por lo menos el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o esencialmente el 100% de los marcadores enumerados en la tabla I anterior. En una forma de realización preferida, dicho homocarión de *A. bisporus* presenta adicionalmente la secuencia alélica de P1N150 "4" (para células derivadas de J10117, LB811 y LB906) o "7" (para células derivadas de LB811) o "3" (para células derivadas de LB906) o "2" (para células derivadas de J10117).

La presente invención asimismo comprende cultivos que incorporan los homocariotes mencionados anteriormente.

#### Producción de hongos a partir de los híbridos de la invención

La descripción asimismo da a conocer un hongo producido haciendo crecer una cosecha de hongos a partir de cualquiera de los cultivos descritos anteriormente. Los procedimientos de producción de hongos se han detallado anteriormente. Se conocen bien en la materia.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método de producción de hongos híbridos, comprendiendo dicho método:

- a) inocular un medio de crecimiento de hongos con un híbrido de hongo *Agaricus bisporus* híbrido de la invención, concretamente LB811, LB906 o J10117,
- b) mantener dicho medio de crecimiento inoculado en condiciones conducentes a la fructificación de hongos y
- c) recolectar hongos de dicho medio de crecimiento.

#### Utilizaciones de los híbridos de la invención

Las utilizaciones del cultivo de las cepas de hongos LB811, LB906 o J10117 incluyen, entre muchas otras cosas, la producción de líneas homocariotas y otra descendencia a partir de esporas o protoplastos de LB811, LB906 o J10117, la producción de cultivos de hongos híbridos que incorporan líneas obtenidas de la cepa LB811, LB906 o J10117, la producción de hongos a partir de cultivos que incorporan líneas obtenidas de LB811, LB906 o J10117 y la producción de partes de hongos a partir de cultivos que incorporan líneas obtenidas de la cepa LB811, LB906 o J10117.

Todavía otras utilizaciones incluyen procedimientos para producir un cultivo de hongos que comprenden aparear líneas homocariotas de *Agaricus bisporus* obtenidas a partir de la cepa LB811, LB906 o J10117 o las propias cepas heterocariotas LB811, LB906 o J10117 con otra línea de hongos. Asimismo procedimientos para producir un cultivo de hongos que contenga en su material genético uno o más rasgos de introgresión en líneas obtenidas a partir de LB811, LB906 o J10117 a través de conversión o transformación de rasgos de introgresión y cultivos de hongos, hongos y partes de hongos producidos por tal introgresión.

Además, la invención puede incluir un cultivo de hongos híbridos, hongo, parte de hongo, incluyendo una espora o parte de cultivo producida mediante el apareamiento de una línea homocariota obtenida a partir de la cepa LB811, LB906 o J10117 o una conversión de rasgo de introgresión de una línea obtenida a partir de la cepa LB811, LB906 o J10117 con otra línea de hongos.

Todavía otras utilizaciones de la presente invención incluyen la producción de líneas de hongos homocariotas derivadas de líneas de hongos obtenidas a partir de la cepa LB811, LB906 o J10117, así como los procedimientos para obtener otras líneas de hongos homocariotas derivadas de líneas de hongos obtenidas a partir de la cepa LB811, LB906 o J10117, y la producción de las líneas endogámicas de hongos y sus partes derivadas de la utilización de esos procedimientos.

La presente descripción asimismo da a conocer una cepa de *A. bisporus* que produce hongos con rendimiento de preparación de conserva mejorado, en la que dicho rendimiento de preparación de conserva mejorado se controla por un determinante genético, en la que dicho rendimiento de preparación de conserva mejorado de la cepa de *Agaricus bisporus* se define como un rendimiento de preparación de conserva normalizado de dicha cepa de *A. bisporus* NCY<sub>cepa</sub> por encima de 100 y en la que el rendimiento de preparación de conserva normalizado NCY<sub>cepa</sub> se calcula tal como sigue:

$$NCY_{cepa} = CY_{cepa} - CY_{control} + 100$$

en la que CY<sub>cepa</sub> y CY<sub>control</sub> corresponden respectivamente al rendimiento de preparación de conserva de la cepa de *A. bisporus* y al rendimiento de preparación de conserva de una cepa de control de *A. bisporus* que no contiene dicho determinante genético y

en la que el rendimiento de preparación de conserva se mide con hongos recogidos en la misma etapa de cosecha según el procedimiento tal como se detalla en el ejemplo 2.

En una forma de realización, el rendimiento de preparación de conserva normalizado de la cepa NCY<sub>cepa</sub> está comprendido entre 100.1 y 120, particularmente entre 100.5 y 120, más particularmente entre 101 y 115, más particularmente entre 102 y 115, incluso más particularmente entre 103 y 110, por ejemplo alrededor de 110.

La cepa de *Agaricus bisporus* según la invención puede obtenerse cruzando una cepa de *A. bisporus* J10117 como

como primer progenitor con una segunda cepa de *A. bisporus* como un segundo progenitor.

En la cepa de *Agaricus bisporus* de la invención, el rasgo responsable del aumento del rendimiento de preparación de conserva se controla por un determinante genético que es hereditario y puede encontrarse en J10117.

En una forma de realización, la cepa de *A. bisporus* según la invención y tal como se describió anteriormente en la presente memoria contiene un rasgo de “rendimiento de preparación de conserva aumentado” que puede obtenerse a partir una cepa de *A. bisporus* J10117 depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4950 o LB811, que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4945, o LB906 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4946.

En una forma de realización de la invención, el rasgo de “rendimiento de preparación de conserva aumentado” o una cepa que comprende dicho rasgo puede obtenerse a partir cualquiera de las cepas depositadas haciendo crecer la progenie de dicha cepa. En particular, el rasgo de “rendimiento de preparación de conserva aumentado” o una cepa que comprende dicho rasgo puede obtenerse a partir cualquiera de las cepas depositadas i) haciendo crecer material de propagación de dicha cepa y haciendo crecer un hongo maduro a partir del mismo; ii) cosechar el material de propagación fértil a partir del mismo, y iii) hacer crecer hongos de los cultivos crecidos a partir del material de propagación cosechado en ii) y seleccionar cepas de las que crecen hongos con rendimiento de preparación de conserva aumentado.

En una forma de realización, la descripción asimismo da a conocer material que puede obtenerse a partir una cepa de hongo según la invención y tal como se describió anteriormente en la presente memoria que incluye, pero sin limitarse a ellos, micelio, blanco de hongo, esporas, protoplastos, definido en la presente memoria como “material de propagación”, o cualquier otra parte o producto de la cepa que todavía muestre el fenotipo de rendimiento de preparación de conserva aumentado según la invención, particularmente cuando se hace crecer para dar un hongo.

La invención se refiere además a un método de producción de una cepa de *A. bisporus* que produce hongos con rendimiento de preparación de conserva mejorado que comprende las etapas siguientes

- i) proporcionar material de propagación de una cepa híbrida de *A. bisporus* según la presente invención;
- ii) hacer crecer dicho material y recuperar un material de reproducción a partir del mismo;
- iii) cruzar el material de reproducción obtenido en ii) con el material de reproducción de una cepa de *A. bisporus* que no presenta el rasgo de rendimiento de preparación de conserva aumentado, hacer crecer el material de propagación obtenido a partir del cruce y cosechar el material de propagación a partir de ahí y
- iv) hacer crecer hongos a partir del material de propagación cosechado según iii) y seleccionar una cepa de hongos que produce hongos con rendimiento de preparación de conserva mejorado.

En una forma de realización, el material de propagación, tal como esporas, utilizado en dicho método según la invención procede de una cepa de *A. bisporus* seleccionada del grupo que consiste en J10117 depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4950, LB811, que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4945 y LB906 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4946.

En una forma de realización, la cepa de *A. bisporus* que no presenta el rasgo de rendimiento de preparación de conserva mejorado que se cruza en la etapa iii) puede ser cualquier variedad de cepa de *A. bisporus*.

En consecuencia es posible convertir cualquier cepa de *A. bisporus* en una cepa de *A. bisporus* según la presente invención cruzando tal cepa de *A. bisporus* con una cepa de *A. bisporus* según la presente invención, es decir, que contiene el determinante genético responsable del rasgo de rendimiento de preparación de conserva mejorado.

El determinante genético para el rasgo de la presente invención puede obtenerse a partir una cepa de *A. bisporus* seleccionada del grupo que consiste en

J10117 depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4950; LB811, que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du

Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4945 y LB906 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4946.

- 5 Tal determinante genético es hereditario y puede transmitirse a través de generaciones mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia del mejoramiento de plantas/hongos o biotecnología vegetal.

Una forma de realización ejemplificativa de un método de este tipo comprende la transferencia por introgresión del determinante genético responsable del rendimiento de preparación de conserva aumentado, o la secuencia de ácido nucleico que contiene tal determinante genético, desde una cepa donadora de *A. bisporus* a una cepa receptora de *A. bisporus* mediante cruzamiento de las cepas.

Por tanto, esta transferencia puede lograrse de manera adecuada utilizando técnicas de mejoramiento tradicionales. Se realiza de ese modo la introgresión del determinante genético en algunas formas de realización en la cepa de *Agaricus* utilizando selección asistida por marcadores (MAS) o mejoramiento asistido por marcadores (MAB). MAS y MAB implican la utilización de uno o más de los marcadores moleculares para la identificación y selección de aquellas cepas descendientes que contienen el determinante genético que está asociado con el rasgo deseado, es decir, un rendimiento de preparación de conserva mejorado. En el contexto del contenido dado a conocer actualmente, tal identificación y selección se basa en la selección del determinante genético del contenido dado a conocer actualmente o marcadores asociados con el mismo.

Las cepas desarrolladas de *A. bisporus* según estas formas de realización pueden derivar ventajosamente la mayoría de sus rasgos de la cepa receptora, y derivar rasgos de rendimiento de preparación de conserva mejorado de la cepa donadora. Tal como se expone anteriormente en la presente memoria, pueden utilizarse técnicas tradicionales de mejoramiento para lograr la introgresión de un determinante genético responsable del rendimiento de preparación de conserva mejorado en una cepa receptora de *A. bisporus*. En algunas formas de realización, una cepa donadora de *A. bisporus* que muestra un rendimiento de preparación de conserva mejorado y comprende un determinante genético que codifica para un rendimiento de preparación de conserva mejorado se cruza con una cepa receptora de *A. bisporus* que en algunas formas de realización muestra características comercialmente deseables.

En un método de selección recurrente y retrocruzamiento, puede obtenerse la introgresión del rasgo de rendimiento de preparación de conserva mejorado, es decir, el determinante genético para el rasgo, en una cepa receptora objetivo (el progenitor recurrente) al cruzar el progenitor recurrente con una primera cepa donadora, que difiere del progenitor recurrente y se denomina en la presente memoria "progenitor no recurrente". El progenitor recurrente es una cepa que no presenta un rendimiento de preparación de conserva mejorado pero que posee características comercialmente deseables. La cepa donadora puede ser ventajosamente la cepa de *A. bisporus* seleccionada del grupo que consiste en J10117 depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4950, LB811, que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4945 y LB906 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4946.

La descripción asimismo da a conocer la utilización de un determinante genético, para conferir rendimiento de preparación de conserva mejorado, particularmente en la etapa de cosecha, a una cepa de *A. bisporus* que carece de dicho determinante genético, en la que dicho determinante genético puede obtenerse a partir de la cepa de *A. bisporus* seleccionada de entre el grupo que consiste en J10117 depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4950, LB811, que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4945 y LB906 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4946.

El experto en la materia puede implementar fácilmente la invención en cualquier cepa de *A. bisporus* y la información y la herramienta proporcionada en la presente memoria permiten esta implementación de la invención. Las cepas de *A. bisporus* depositadas contienen el determinante genético de la presente invención. Cualquiera de las cepas depositadas puede utilizarse por el experto en la materia como fuente para el determinante genético, en asociación con un rendimiento de preparación de conserva mejorado, particularmente en la etapa de cosecha.

La progenie que resulta de un cruce entre el progenitor recurrente y el progenitor no recurrente puede someterse a retrocruzamiento con el progenitor recurrente. La población resultante puede examinarse entonces para determinar el rendimiento de preparación de conserva mejorado.

Después del examen, las cepas que muestran un fenotipo, o en algunas formas de realización un genotipo, de rendimiento de preparación de conserva mejorado, y comprenden por tanto el determinante genético necesario,

responsable de un rendimiento de preparación de conserva mejorado, se seleccionan entonces y se someten a retrocruzamiento con el progenitor recurrente durante varias generaciones con el fin de permitir que la cepa *A. bisporus* se vuelva cada vez más endogámica. Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos “introgresión”, “sometido a introgresión” y “obtener introgresión” se refieren al procedimiento mediante el cual un gen o una pluralidad de genes, un QTL o haplotipo de una especie, variedad o cepa se trasladan al genoma de otra especie, variedad o cepa, cruzando esas especies. El cruce puede ser natural o artificial. El procedimiento puede completarse opcionalmente mediante el retrocruzamiento con el progenitor recurrente, en cuyo caso introgresión se refiere a infiltración de los genes de una especie en el acervo genético de otra a través del retrocruzamiento repetido de un híbrido interespecífico con una de sus progenitores. Una introgresión asimismo puede describirse como un material genético heterólogo integrado de manera estable en el genoma de una cepa receptora.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “rasgo” se refiere a una característica o fenotipo, por ejemplo, el color del sombrero de un hongo o una resistencia a patógeno o enfermedad. Un rasgo puede heredarse de manera dominante o recesiva, o de manera dominante parcial o incompleta. Un rasgo puede ser monogénico (es decir, determinado por un solo locus) o poligénico (es decir, determinado por más de un locus) o asimismo puede resultar de la interacción mutua entre genes o la interacción de uno o más genes con el entorno.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “fenotipo” o “rasgo fenotípico” se refiere a la apariencia u otra característica detectable de un individuo, que resulta de la interacción de su genoma, proteoma y/o metaboloma con el entorno.

Por “determinante genético” se entiende dentro del alcance de la invención un gen o un locus en el genoma o parte del mismo que puede contribuir al rendimiento de preparación de conserva de los hongos de la cepa influyendo en el rasgo de expresión a nivel del propio ADN, a nivel de traducción, transcripción y/o activación de un producto polipeptídico final, es decir, para regular el metabolismo en el tejido del hongo que conduce a la expresión fenotípica del genotipo. Un determinante genético es hereditario, es decir, puede transferirse a la progenie mediante cruzamiento.

Se entiende dentro del alcance de la invención que “cepa donadora de *A. bisporus*” significa la cepa de *A. bisporus* que proporciona el determinante genético asociado a un rendimiento de preparación de conserva significativamente mejorado.

Se entiende dentro del alcance de la invención que “mejora en el rendimiento de preparación de conserva” y “rendimiento de preparación de conserva mejorado” significa un hongo que muestra una mayor rendimiento de preparación de conserva tal como se calcula en el ejemplo 2, que es estadísticamente significativo en  $P < 0.05$  o  $P < 0.01$  en comparación con un hongo de una cepa de control, particularmente una cepa de control A15 que es un *A. bisporus* comercial de libre disposición y que puede adquirirse o cualquier otra cepa independientemente de su origen (comercial, de colección, de tipo natural ...).

La expresión “etapa de cosecha” corresponde a la etapa de madurez del hongo en la que el hongo está suficientemente desarrollado para su cosecha, es decir, es sombrero es suficientemente independiente del pie y el tamaño corresponde al de calidad comercial habitual.

La expresión “material de propagación” se refiere a cualquier material de hongo que sea adecuado para el crecimiento y la fructificación, pero no para el cruce, e incluye, por ejemplo, esporas, micelio, blanco de hongo y protoplastos. Este material es heterocariota.

La expresión “material de reproducción” se refiere a cualquier material de hongo que sea adecuado y capaz de cruzarse, pero que no sea capaz de fructificar. Este material es homocariota y corresponde a los homocariones, es decir, al micelio homocariota.

En consecuencia, basándose en la descripción de la presente invención, el experto en posesión de una cepa seleccionada de entre el grupo que consiste en J10117 depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4950, LB811, que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4945 y LB906 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4946 no presenta dificultad en transferir el rasgo de rendimiento de preparación de conserva mejorado de la presente invención, es decir, el determinante genético que dirige tal rasgo, a cualquier otra cepa de *A. bisporus* de diversos tipos utilizando técnicas de mejoramiento bien conocidas en la técnica. El rasgo de la presente invención se transfiere por ejemplo a cepas de *A. bisporus* que producen hongos de diversos tipos o formas, mostrando diferentes niveles de rendimiento agronómico.

En una forma de realización, la información genética que determina el rasgo de rendimiento de preparación de conserva mejorado, particularmente en la etapa de cosecha, según la presente invención comprende un determinante genético que está en por lo menos un locus que puede obtenerse a partir de la cepa de *A. bisporus* seleccionada del

*grupo que consiste en* J10117 depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4950, LB811, que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4945 y LB906 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4946.

La descripción asimismo da a conocer un nuevo rasgo en el hongo *A. bisporus* que permite un mejor rendimiento en el procesamiento del hongo cosechado para la industria conservera. Sin embargo, el determinante genético que soporta este rasgo, aunque no se da a conocer en lo que se refiere a la secuencia de ADN, existe y es hereditario. Este determinante genético contenido en el material depositado es la herramienta para otorgar el rasgo de rendimiento de preparación de conserva mejorado deseado tal como se definió anteriormente en cualquier cepa de *A. bisporus* que carezca de este rasgo. Este rasgo puede medirse y cuantificarse fácilmente utilizando el procedimiento de prueba tal como se representa en el ejemplo 2 en la presente memoria dada a conocer.

Los depósitos se han realizado para proporcionar al experto en la materia una fuente de rasgos de rendimiento de preparación de conserva mejorado que puede utilizarse para reproducir la invención reivindicada y no resulta necesario repetir ningún programa de mejoramiento para desarrollar cepas con el rasgo ya que este rasgo está presente en las cepas depositadas y es fácilmente transferible a cualquier cepa de *A. bisporus*.

### Leyendas de las figuras

La figura 1 representa la evolución del rendimiento acumulativo (kg de hongos/m<sup>2</sup>) a lo largo del tiempo (días después de la cobertura) en dos ensayos a pequeña escala (estando cada ensayo representado en A o B) para LB811, LB906 y las cepas de control A15 y Sylvan 512.

La figura 2 representa la evolución del rendimiento acumulativo (kg de hongos/m<sup>2</sup>) a lo largo del tiempo (días después de la cobertura) en dos ensayos a mediana escala. Las cepas experimentales y de control se hicieron crecer simultáneamente en la misma sala. A: para tres lotes de LB906 (en comparación con A15). B: para tres lotes de LB811 (en comparación con A15).

La figura 3 representa la evolución del rendimiento acumulativo (kg de hongos/m<sup>2</sup>) a lo largo del tiempo (días después de la cobertura) en dos ensayos a gran escala. Las cepas experimentales y el control se hicieron crecer simultáneamente en salas paralelas independientes. A: para LB811 y LB906 (en comparación con A15). B: para dos lotes de LB906 (en comparación con A15).

### Ejemplos

#### 1. Producción de los híbridos de la invención

##### 1.1. Material

\* LB906 es un híbrido obtenido a partir de un plan de cruzamiento que implica el homocarión J10117s62 y el homocarión 76s14.

Se ha realizado un depósito de un cultivo del homocarión de *Agaricus bisporus* J10117s62 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cedex 15. La fecha de depósito fue el 20 de enero de 2015. Su n.º de registro de CNCM es I-4948.

Se ha realizado un depósito de un cultivo del homocarión de *Agaricus bisporus* 76s14 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cedex 15. La fecha de depósito fue el 20 de enero de 2015. Su n.º de registro de CNCM es I-4947.

\* LB811 es un híbrido obtenido a partir de un plan de cruzamiento que implica el homocarión J10117s62 y el homocarión FS9-18-s50 generado a partir del heterocarión FS9-18.

El homocarión J10117s62 se ha descrito anteriormente.

Se ha realizado un depósito de un cultivo del heterocarión de *Agaricus bisporus* FS9-18 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cedex 15. La fecha de depósito fue el 20 de enero de 2015. Su n.º de registro de CNCM es I-4949.

##### 1.2. Apareamiento de las líneas homocariotas

Los cruces pueden realizarse en placas. Cada homocarión parental se hace crecer en una placa de agar (PDA,

compost-agar...). Se transfiere un tapón de cada homocarión parental a una placa nueva de modo que los dos homocariones se inoculen uno al lado del otro, separados por algunos centímetros. La placa se incuba de modo que los dos homocariones crezcan hasta encontrarse.

- 5 En el punto de contacto, si son sexualmente compatibles, comienza a crecer un nuevo micelio, es decir, el híbrido. Puede recolectarse y transferirse a una nueva placa e incubarse.

### 1.3. Cultivo de laboratorio de las cepas híbridas de la invención

- 10 Los híbridos se cultivan en placas de compost-agar (ajustadas a pH 7) y se transfieren utilizando un sacabocados como tapones de agar de placa a placa. Las placas se hacen crecer en una incubadora a 24°C hasta que colonizan de uno a dos tercios de la placa y luego se transfieren a la cámara frigorífica a 2°C.

- 15 Todas las operaciones de microbiología se realizan en condiciones estériles (campana de flujo laminar, instrumentos, medios y envases estériles).

## 2. Evaluación de las propiedades de los híbridos de la invención

### 2.1. Rendimiento de preparación de conserva (CY)

- 20 El CY puede evaluarse procesando hongos en una línea de producción comercial, una línea de producción piloto o dispositivos y equipos de laboratorio de I + D que replican un procedimiento comercial, mientras se mide el peso en cada etapa del procedimiento. De este modo puede determinarse el peso escurrido y calcularse la razón del peso de los hongos en conserva escurridos por ejemplo con respecto al peso de los hongos frescos introducidos al inicio del procedimiento. Por tanto, el CY total puede obtenerse combinando el% de evacuación, el% de enfriamiento, el% de escaldado y el% de esterilización.

Se utilizan diseños experimentales y análisis estadísticos apropiados para comparar diferentes tratamientos.

- 30 Cuando se cumplen estas condiciones, pueden compararse dos o más variedades (por ejemplo, híbridos desarrollados a partir de un programa de mejoramiento) entre sí o con un control (por ejemplo, una cepa comercial).

Para todos los ensayos de rendimiento de preparación de conserva, el procedimiento fue el siguiente:

- 35
- Recepción de los hongos,
  - Determinación del peso por caja,
  - Evacuación e hidratación (presión negativa para garantizar la entrada de agua libre en los hongos),
  - Determinación del peso por caja,
  - Almacenamiento en cámara frigorífica,

40

  - Determinación del peso por caja,
  - Blanqueamiento (12 min 90°C),
  - Refrigeración en caja (agua en movimiento a 15°C),
  - Drenaje de agua libre (2 min),
  - Determinación del peso por caja,

45

  - Corte en rebanadas (rebanadora de laboratorio de 6.25 mm),
  - Llenado de tarros de 580 ml con peso neto entre 330-340 g de hongos por tarro,
  - Llenado al máximo de tarros con salmuera,
  - Cierre de los tarros,
  - Esterilización de los tarros (autoclave en masa),

50

  - Almacenamiento (min 5 días),
  - Apertura de los tarros,
  - Drenaje (2 min),
  - Pesada.

- 55 Todos los lotes se aleatorizaron con respecto al orden de procesamiento.

Los datos de las cepas experimentales se normalizaron teniendo en cuenta que el valor de CY del control fue del 100%, según la fórmula siguiente:

60 
$$NCY_{\text{cepa}} = CY_{\text{cepa}} - CY_{\text{control}} + 100$$

mediante lo cual:

- 65 NCY: Rendimiento de preparación de conserva normalizado  
CY: Rendimiento de preparación de conserva

Sylvan A15 fue el control en cada ensayo.

a) El rendimiento de preparación de conserva de LB811 y LB906 se ha evaluado en 2 ensayos.

- 5 En el primer ensayo, los hongos se clasificaron según el grado en pequeños (< 45 mm) o grandes (> 45 mm) y se estudió el efecto del tamaño de los hongos. El plan era cosechar todos los hongos el mismo día para enviarlos a la planta de preparación de conserva según los códigos, sin embargo LB906 fue más rápido y se tomó la decisión de cosechar en 2 días consecutivos y compararlos como dos tratamientos diferentes.

- 10 Las tablas 5 y 5bis resumen los resultados obtenidos en dos ensayos independientes:

Tabla 5: resultados del análisis estadístico de datos del rendimiento de preparación de conserva (análisis de varianza y comparación de medios).

| Código | Nombre de cepa | Origen                | Fecha de recolección | NCY (%) | * | Promedio (%) |
|--------|----------------|-----------------------|----------------------|---------|---|--------------|
| 1      | A15            | Cepa comercial Sylvan | D                    | 100.00  | B | 100.00       |
| 2      | LB811          | Híbrido exp. Sylvan   | D                    | 109.67  | A | 109.87       |
| 3      | LB906          | Híbrido exp. Sylvan   | D-1                  | 110.19  | A |              |
| 4      | LB906          | Híbrido exp. Sylvan   | D                    | 109.74  | A |              |

\*Los datos seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes (prueba de Tukey  $\alpha = 5\%$ )

15

Tabla 5bis: resultados del análisis estadístico de datos del rendimiento de preparación de conserva (análisis de varianza y comparación de medios).

| Código | Nombre de cepa | Origen                | Fecha de recolección | NCY (%) | * | Promedio (%) |
|--------|----------------|-----------------------|----------------------|---------|---|--------------|
| 1      | A15            | Cepa comercial Sylvan | D                    | 100.00  | B | 99.98        |
| 4      | 512            | Cepa comercial Sylvan | D                    | 99.95   | B |              |
| 2      | LB811          | Híbrido exp. Sylvan   | D                    | 105.82  | A | 107.05       |
| 3      | LB906          | Híbrido exp. Sylvan   | D                    | 108.28  | A |              |

\*Los datos seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes (prueba de Tukey  $\alpha = 5\%$ )

- 20 Los valores de CY del control A15 fueron comparables con los de los ensayos blancos anteriores.

Para ambos ensayos, el análisis estadístico mostró un efecto de cepa muy significativo y un efecto de tamaño muy significativo (produciendo los hongos más grandes un CY más alto). Para LB906 el efecto de la duración del almacenamiento (hongos procesados el día D o D + 1) no fue significativo.

25

En el primer ensayo (tabla 3), los resultados no mostraron diferencias significativas entre el grupo de los híbridos experimentales (promedio 109.87%). Sin embargo, se mostró una diferencia significativa en comparación con el control comercial (100.0%) con valores casi un 9.9% más altos para los híbridos experimentales, lo que es una diferencia sustancial para la industria conservera (tal como sugiere Coale *et al.*, 1972).

30

En el segundo ensayo (tabla 3bis), los hongos se procesaron independientemente de su tamaño y, por tanto, no se estudió el efecto del tamaño de los hongos. Los resultados no mostraron diferencias significativas dentro del grupo de las cepas comerciales (promedio 99.98%) ni dentro de los híbridos experimentales (promedio 107.05%). Sin embargo, las diferencias entre las cepas experimentales y de control fueron significativas con valores casi un 7.1% más altos para las cepas experimentales en promedio en comparación con los controles.

35

Valores un 9.9% y un 7.1% más altos de rendimiento de preparación de conserva son diferencias sustanciales para la industria de procesamiento (tal como sugiere Coale *et al.*, 1972).

- 40 b) El CY de la cepa progenitora J10117 se ha evaluado adicionalmente en condiciones similares.

La tabla 6 muestra los resultados obtenidos al comparar el CY de J10117 y las cepas comerciales Sylvan A15 y Sylvan 512.

- 45 El análisis realizado para los 3 ensayos confirmó el CY estadísticamente más alto de J10117, en comparación con las cepas A15 y 512 (ver la tabla 6).

| Código | Nombre de cepa | Origen       | Rendimiento de preparación de conserva normalizado (%) |   |          |   |          |    |          |   |          |   |          |   |
|--------|----------------|--------------|--------------------------------------------------------|---|----------|---|----------|----|----------|---|----------|---|----------|---|
|        |                |              | Ensayo 1                                               |   |          |   | Ensayo 2 |    |          |   | Ensayo 3 |   |          |   |
|        |                |              | Oleada 1                                               | * | Oleada 2 | * | Oleada 1 | *  | Oleada 2 | * | Oleada 1 | * | Oleada 2 | * |
| A      | J10117         | Híbrido exp. | 108,35                                                 | A | 101,79   | A | 102,16   | AB | 109,37   | A | 109,73   | A | 108,09   | A |
| B      | A15            | Cepa comer.  | 100,00                                                 | B | 100,00   | B | 100,00   | BC | 100,00   | B | 100,00   | C | 100,00   | B |
| C      | 512            | Cepa comer.  | 98,93                                                  | B | 99,50    | B | 102,01   | AB | 98,25    | B | 107,25   | B | 99,70    | C |

| Nombre de cepa | Origen |              | Rendimiento de preparación de conserva normalizado (%) |    |           |   |
|----------------|--------|--------------|--------------------------------------------------------|----|-----------|---|
|                |        |              | Tres ensayos (media)                                   |    |           |   |
|                |        |              | Oleada 1*                                              |    | Oleada 2* |   |
| J10117         | Sylvan | Híbrido exp. | 106.58                                                 | A  | 106.41    | A |
| A15            | Sylvan | Cepa comer.  | 100.00                                                 | D  | 100.00    | B |
| 512            | Sylvan | Cepa comer.  | 103.06                                                 | BC | 99.15     | B |

Tabla 6: datos del rendimiento de preparación de conserva normalizado (%) y resultados de los análisis estadísticos

5 Los tratamientos seguidos por la misma letra no fueron estadísticamente diferentes

Para LB906, se realizó una evaluación adicional a mayor escala. Los ensayos de crecimiento consistieron en cultivar LB906 y una cepa de control (512) en una instalación de crecimiento al mismo tiempo, en diferentes salas paralelas.

10 Los hongos se cosecharon mecánicamente en la misma etapa de cosecha y se enviaron a una instalación de preparación de conserva de hongos el día de la cosecha.

15 Una vez recibidos, los hongos se hidrataron a vacío y se almacenaron en frío hasta su procesamiento.

15 Cuando se entregaron más de 3 toneladas de hongos frescos de la misma calidad de cada cepa, se separaron y procesaron por lotes en latas, para determinar el rendimiento de procesamiento de cada cepa en una línea de producción de conservas. El procedimiento fue similar al descrito anteriormente.

20 Se calculó el CY de un lote como la razón del peso de los hongos en latas dividido entre el peso de los hongos frescos. El peso de los hongos en latas se calculó multiplicando el peso escurrido promedio de varias latas muestreadas del lote (de 13 a 20 latas por lote) por la cantidad de latas producidas en el mismo lote.

25 Para evitar un sesgo, se consideraron los datos de CY para el análisis estadístico (prueba de la T de Student) solo cuando el tiempo de almacenamiento aplicado al lote estuvo dentro del intervalo normal para la fábrica. Se consideraron 9 y 10 series de datos para LB906 y 512, respectivamente. El NCY se calculó tal como se indicó anteriormente.

30 LB906 expresó un NCY promedio de 103.0 frente a 100.0 para el control, es decir, un valor superior en un 3,0%, y la diferencia fue estadísticamente significativa (tabla \*).

Por tanto, se confirmó la ventaja significativa de LB906 para CY.

35 Tabla 6bis: datos (%) del rendimiento de preparación de conserva normalizado (NCY) resultados del análisis estadístico.

| Nombre de cepa | Datos del rendimiento de preparación de conserva normalizado | Diferencia promedio | Análisis de la prueba de la T de Student |
|----------------|--------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------------|
|                |                                                              |                     | Conclusión                               |
| 512            | 100.0 ± 3.2%                                                 | 3.0%                | 0.04 (< 0.05) significativo              |
| LB906          | 103.0 ± 3.5%                                                 |                     |                                          |

## 2.2. Incompatibilidad vegetativa

40 La adición de micelio a la cubierta (como "cacing", es decir, compost colonizado o CI, es decir, inoculante de cobertura, un material patentado) se utiliza comúnmente en la producción comercial de hongos para mejorar la precocidad y uniformidad de la primera oleada. Por tanto, esta práctica puede utilizarse para someter a prueba la incompatibilidad vegetativa.

45 De manera práctica, la cepa A genera el blanco de hongo en el compost y su micelio coloniza el compost (desarrollo del blanco de hongo). Al final del desarrollo del blanco de hongo, la cepa B se mezcla con la capa de cobertura, la mezcla se deposita sobre la superficie del compost y su micelio coloniza la capa de cobertura (desarrollo de cobertura). En un programa de crecimiento normal, el micelio procedente del compost y el micelio procedente de la cobertura se anastomosarán en la superficie de contacto de las dos capas, formando una red fúngica singular en todo el sustrato. Las cabezas de alfiler ("pins") de la primera oleada se formarán, crecerán y se convertirán en hongos. Puede evaluarse el desarrollo de micelio, cabezas de alfiler y hongos en la superficie (aspecto y tiempos) para determinar si las dos cepas son vegetativamente compatibles.

Si dos cepas A y B son vegetativamente compatibles, el micelio se anastomosará, se producirá la formación de

cabezas de alfiler y aparecerán y se desarrollarán los hongos en el periodo de tiempo habitual y esperado.

5 Mientras que si las dos cepas A y B son vegetativamente incompatibles, el micelio de las dos cepas no se anastomosará, no se producirá la formación de cabezas de alfiler y los hongos no aparecerán en el periodo de tiempo habitual y esperado. El antagonismo impedirá o retrasará la aparición y el desarrollo de los hongos.

10 Romaine y Royse (2011), utilizando transformación genética, han establecido que después de la anastomosis de dos cepas compatibles, los hongos de la primera oleada serán del genotipo de la cepa B (crecidos en la cobertura), mientras que los hongos de la segunda oleada serán del genotipo de la cepa A (blanco de hongo generado en el compost).

15 Las cepas sometidas a prueba se hicieron crecer en bandejas (1.4 m<sup>2</sup>) llenas con compost con blanco de hongo generado con la cepa A (el denominado blanco de hongo de base). La bandeja se cubrió con una lámina de plástico perforada con anillos grandes (15.2 cm de diámetro, 3.8 cm de profundidad) creando así parcelas individuales. Cada prueba de compatibilidad se repitió en 5 o 10 de las parcelas individuales.

20 Al final del desarrollo del blanco de hongo, la cobertura se mezcló con CI (inoculante de cobertura) de la cepa B a una tasa de 375 g/m<sup>2</sup> y se aplicó en las parcelas en anillo con el fin de someter a prueba la compatibilidad de la combinación A/B.

25 Se sometió a prueba la compatibilidad de todas las combinaciones de cepas A/B con A en el compost/B en la cobertura y de manera recíproca B en el compost/A en la cobertura. Las combinaciones A/A y B/B se utilizaron como controles.

25 Todas las parcelas de prueba se regaron el día de la aplicación y luego se cultivaron utilizando los parámetros de producción comercial de hongos.

30 Diariamente se realizaron observaciones visuales que incluían la fuerza del crecimiento del micelio, la producción de cabezas de alfiler y los tiempos de cualquier cultivo. Los índices de la superficie de cobertura en el día 8 (crecimiento de micelio) y el día 16 (presencia de cabezas de alfiler y hongos) se resumen en la siguiente tabla.

35 Si no se produjo fructificación para la combinación A/B o si solo aparecieron cabezas de alfiler sin desarrollo adicional o retraso en comparación con A/A o B/B, A y B se consideraron vegetativamente incompatibles.

35 La tabla 7 muestra los resultados obtenidos para las cepas de la invención, en comparación con las cepas parental y A15 de control.

Tabla 7: Compatibilidad vegetativa de diferentes cepas de *Agaricus bisporus*

|                      | Índices<br>Conclusión | Cepa en el compost                               |                                                  |                                                   |                                                  |                                                  |                                                                  |
|----------------------|-----------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
|                      |                       | A15                                              | J10117                                           | 76                                                | FS9.18                                           | LB811                                            | LB906                                                            |
| Cepa en la cobertura | A15                   | Crecimiento muy<br>bueno<br>Hongos<br>Compatible | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible   | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible    | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible   | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible   | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible                   |
|                      | J10117                | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible   | Crecimiento<br>muy bueno<br>Hongos<br>Compatible | nd                                                | nd                                               | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible   | Poco crecimiento de<br>superficie<br>Sin hongos<br>No compatible |
|                      | 76                    | nd                                               | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible   | Crecimiento<br>muy bueno<br>Hongos<br>Crecimiento | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible   | nd                                               | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible                   |
|                      | FS9.18                | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible   | nd                                               | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible    | Crecimiento<br>muy bueno<br>Hongos<br>Compatible | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible   | nd                                                               |
|                      | LB811                 | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible   | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible   | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible    | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible   | Crecimiento muy<br>bueno<br>Hongos<br>Compatible | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible                   |
|                      | LB906                 | Buen crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible  | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible   | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible    | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible   | Sin crecimiento<br>Sin hongos<br>No compatible   | Crecimiento muy<br>bueno<br>Hongos<br>Compatible                 |

La tabla 7bis muestra los resultados obtenidos para las cepas de la invención, en comparación con cepas comerciales de control (U1 y A15 y derivados de las mismas 512, 520, 737), cepas parentales y otras cepas (J9277, J10165, J11500).

| Índices    |            | Cepa en el compost   |                      |                      |                      |               |             |             |             |             |             |             |             |
|------------|------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Conclusión | U1         | A15                  | 512                  | 520                  | 737                  | J10117        | 76          | FS9.18      | LB811       | LB906       | J9277       | J10165      | J11500      |
|            | Día 9      | Muy buen crecimiento | Buen crecimiento     | Muy buen crecimiento | Muy buen crecimiento | Sin           | crecimiento | crecimiento | crecimiento | crecimiento | crecimiento | crecimiento | crecimiento |
| U1         | Día 16     | Hongos               | Hongos               | Hongos               | Hongos               | Sin hongos    | Sin hongos  | Sin hongos  | Sin hongos  | Sin hongos  | Sin hongos  | Sin hongos  | Sin hongos  |
|            | Conclusión | Compatible           | Compatible           | Compatible           | Compatible           | No compatible | compatible  | compatible  | compatible  | compatible  | compatible  | compatible  | compatible  |
|            | Día 9      | Muy buen crecimiento | Muy buen crecimiento | Muy buen crecimiento | Muy buen crecimiento | Sin           | crecimiento | Sin         | Sin         | Sin         | Sin         | Sin         | Sin         |
| A15        | Día 16     | Hongos               | Hongos               | Hongos               | Hongos               | Sin hongos    | crecimiento | Sin hongos  | crecimiento | Sin hongos  | crecimiento | Sin hongos  | Sin hongos  |
|            | Conclusión | Compatible           | Compatible           | Compatible           | Compatible           | No compatible | compatible  | No          | compatible  | compatible  | compatible  | No          | No          |
|            | Día 9      | Buen crecimiento     | Muy buen crecimiento | Muy buen crecimiento | Muy buen crecimiento | Sin           | crecimiento | Sin         | Sin         | Sin         | Sin         | Sin         | Sin         |
| 512        | Día 16     | Hongos               | Hongos               | Hongos               | Hongos               | Sin hongos    | crecimiento | Sin hongos  | crecimiento | Sin hongos  | crecimiento | Sin hongos  | Sin hongos  |
|            | Conclusión | Compatible           | Compatible           | Compatible           | Compatible           | No compatible | compatible  | No          | compatible  | compatible  | compatible  | No          | No          |
|            | Día 9      | Muy buen crecimiento | Muy buen crecimiento | Muy buen crecimiento | Muy buen crecimiento | Sin           | crecimiento | Sin         | Sin         | Sin         | Sin         | Sin         | Sin         |
| 520        | Día 16     | Hongos               | Hongos               | Hongos               | Hongos               | Sin hongos    | crecimiento | Sin hongos  | crecimiento | Sin hongos  | crecimiento | Sin hongos  | Sin hongos  |
|            | Conclusión | Compatible           | Compatible           | Compatible           | Compatible           | No compatible | compatible  | No          | compatible  | compatible  | compatible  | No          | No          |
|            | Día 9      | Muy buen crecimiento | Muy buen crecimiento | Muy buen crecimiento | Muy buen crecimiento | Sin           | crecimiento | Sin         | Sin         | Sin         | Sin         | Sin         | Sin         |
| 737        | Día 16     | Hongos               | Hongos               | Hongos               | Hongos               | Sin hongos    | crecimiento | Sin hongos  | crecimiento | Sin hongos  | crecimiento | Sin hongos  | Sin hongos  |
|            | Conclusión | Compatible           | Compatible           | Compatible           | Compatible           | No compatible | compatible  | No          | compatible  | compatible  | compatible  | No          | No          |

| Índices    | Cepa en el compost |                 |                  |                    |                    |                    |                       |                       |                       |                       |                       |                 |                 |                 |
|------------|--------------------|-----------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|            | Conclusión         | U1              | A15              | 512                | 520                | 737                | J10117                | 76                    | FS9.18                | LB811                 | LB906                 | J9277           | J10165          | J11500          |
| J10<br>117 | Día 9              | Sin crecimiento | Sin crecimiento  | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Crecimiento muy bueno | Crecimiento bajo      | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Crecimiento bajo      | Sin crecimiento | Sin crecimiento | Sin crecimiento |
|            | Día 16             | Sin hongos      | Sin hongos       | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Hongos                | Sin hongos            | Sin hongos            | Sin hongos            | Sin hongos            | Sin hongos      | Sin hongos      | Sin hongos      |
|            | Conclusión         | compatible      | compatible       | compatible         | compatible         | No                 | Compatible            | No                    | No                    | No                    | No                    | compatible      | compatible      | No              |
|            | Día 9              | Sin crecimiento | Sin crecimiento  | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Sin crecimiento       | Crecimiento muy bueno | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Sin crecimiento | Sin crecimiento | Sin crecimiento |
| 76         | Día 16             | Sin hongos      | Sin hongos       | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos            | Hongos                | Sin hongos            | Sin hongos            | Sin hongos            | Sin hongos      | Sin hongos      | Sin hongos      |
|            | Conclusión         | compatible      | compatible       | compatible         | compatible         | No                 | compatible            | Compatible            | No                    | No                    | No                    | compatible      | compatible      | No              |
|            | Día 9              | Sin crecimiento | Sin crecimiento  | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Crecimiento muy bueno | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Sin crecimiento | Sin crecimiento | Sin crecimiento |
|            | Día 16             | Sin hongos      | Sin hongos       | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos            | Sin hongos            | Hongos                | Sin hongos            | Sin hongos            | Sin hongos      | Sin hongos      | Sin hongos      |
| FS9<br>.18 | Conclusión         | compatible      | compatible       | compatible         | compatible         | compatible         | compatible            | compatible            | Compatible            | compatible            | compatible            | compatible      | compatible      | No              |
|            | Día 9              | Sin crecimiento | Sin crecimiento  | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Crecimiento muy bueno | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Sin crecimiento | Sin crecimiento | Sin crecimiento |
|            | Día 16             | Sin hongos      | Sin hongos       | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos            | Sin hongos            | Hongos                | Sin hongos            | Sin hongos            | Sin hongos      | Sin hongos      | Sin hongos      |
|            | Conclusión         | compatible      | compatible       | compatible         | compatible         | No                 | compatible            | No                    | Compatible            | compatible            | compatible            | compatible      | compatible      | No              |
| LB8<br>11  | Día 9              | Sin crecimiento | Sin crecimiento  | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Crecimiento muy bueno | Sin crecimiento       | Sin crecimiento | Sin crecimiento | Sin crecimiento |
|            | Día 16             | Sin hongos      | Sin hongos       | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos            | Sin hongos            | Sin hongos            | Hongos                | Sin hongos            | Sin hongos      | Sin hongos      | Sin hongos      |
|            | Conclusión         | compatible      | compatible       | compatible         | compatible         | compatible         | compatible            | compatible            | Compatible            | compatible            | compatible            | compatible      | compatible      | No              |
|            | Día 9              | Sin crecimiento | Sin crecimiento  | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Crecimiento muy bueno | Sin crecimiento       | Sin crecimiento | Sin crecimiento | Sin crecimiento |
| LB9<br>06  | Día 16             | Sin hongos      | Sin hongos       | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos            | Sin hongos            | Sin hongos            | Compatible            | compatible            | compatible      | compatible      | compatible      |
|            | Conclusión         | compatible      | compatible       | compatible         | compatible         | compatible         | compatible            | compatible            | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Crecimiento muy bueno | Sin crecimiento | Sin crecimiento | Sin crecimiento |
|            | Día 9              | Sin crecimiento | Buen crecimiento | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Hongos                | Sin hongos      | Sin hongos      | Sin hongos      |
|            | Día 16             | Sin hongos      | Sin hongos       | Cabezas de alfiler | Cabezas de alfiler | Cabezas de alfiler | Cabezas de alfiler    | Sin hongos            | Sin hongos            | Sin hongos            | Compatible            | Sin crecimiento | Sin crecimiento | Sin crecimiento |
| LB9<br>06  | Conclusión         | compatible      | compatible       | compatible         | compatible         | compatible         | compatible            | compatible            | No                    | No                    | Compatible            | No              | No              | No              |
|            | Día 9              | Sin crecimiento | Sin crecimiento  | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Sin crecimiento    | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Sin crecimiento       | Sin crecimiento | Sin crecimiento | Sin crecimiento |
|            | Día 16             | Sin hongos      | Sin hongos       | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos            | Sin hongos            | Sin hongos            | Sin hongos            | Sin hongos            | Sin hongos      | Sin hongos      | Sin hongos      |
|            | Conclusión         | compatible      | compatible       | compatible         | compatible         | compatible         | compatible            | compatible            | Compatible            | compatible            | compatible            | compatible      | compatible      | compatible      |

|            | Índices<br>Conclusión | Cepa en el compost |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                       |                    |                    |                          |                          | J11500                   |
|------------|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|            |                       | U1                 | A15                | 512                | 520                | 737                | J10117             | 76                 | FS9.18                | LB811              | LB906              | J9277                    | J10165                   |                          |
| J92<br>77  | Día 9                 | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Crecimiento<br>bajo   | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Crecimiento<br>muy bueno | Sin<br>crecimiento       | Sin<br>crecimiento       |
|            | Día 16                | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Cabezas de<br>afilier | Sin hongos         | Sin hongos         | Hongos                   | Sin hongos               | Sin hongos               |
|            | Conclusión            | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible      | No<br>compatible   | No<br>compatible   | Compatible               | No<br>compatible         | No<br>compatible         |
| J10<br>165 | Día 9                 | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Crecimiento<br>bajo   | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento       | Crecimiento<br>muy bueno | Sin<br>crecimiento       |
|            | Día 16                | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Cabezas de<br>afilier | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos               | Hongos                   | Sin hongos               |
|            | Conclusión            | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible      | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible         | Compatible               | No<br>compatible         |
| J11<br>500 | Día 9                 | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Crecimiento<br>bajo   | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento | Sin<br>crecimiento       | Sin<br>crecimiento       | Crecimiento<br>muy bueno |
|            | Día 16                | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos         | Cabezas de<br>afilier | Sin hongos         | Sin hongos         | Sin hongos               | Sin hongos               | Hongos                   |
|            | Conclusión            | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible      | No<br>compatible   | No<br>compatible   | No<br>compatible         | No<br>compatible         | Compatible               |

Tabla 7bis: compatibilidad vegetativa de diferentes cepas de *Agaricus bisporus*.

Se conoce bien que todas las cepas blancas comerciales actuales se derivan de U1 y, por tanto, son vegetativamente compatibles entre sí (Romaine y Royse, 2011). En particular, la cepa blanca comercial A15 es compatible con Sylvan 512, Sylvan 520 y Sylvan 737.

5 Cabe destacar que Somycel 76 y Fungisem 9.18 no se derivan de U1.

Sin embargo, los híbridos de la invención no son compatible con ninguna de las cepas sometidas a prueba y, en particular, con la cepa blanca comercial A15.

10 Además, J10117 no es compatible con la cepa blanca comercial A15.

Por tanto, los híbridos de la invención pueden considerarse como cepas de “suspensión de virus”.

### 2.3. Resultados agronómicos

15 2.3.1. Aspecto de superficie y color del sombrero

Las mediciones se han realizado en un cromámetro Minolta según el espacio del oponente de color L,a,b con la dimensión L para la luminosidad y a y b para las dimensiones del oponente de color.

20 Parámetros: 30 hongos/cepa, 1 medida (parte superior del sombrero)/hongo, para las oleadas 1 y 2, pico de la oleada (antes de la recolección).

25 En el sistema L,a,b, el color se describe mediante 3 componentes: L (luminosidad, 0 = negro a 100 = blanco), a (-verde a rojo b (- azul a amarillo +).

Se ha realizado un análisis de varianza (prueba de la F) y comparación de medios (prueba de Tukey  $\alpha = 5\%$ ) para las 3 variables.

30 Se ha evaluado el aspecto de superficie (5 índices: muy liso, liso, medianamente escamoso, escamoso, muy escamoso) y el aspecto visual, es decir, la percepción del color (5 índices: muy blanco, blanco, blanquecino, crema) de los hongos producidos por los híbridos de la invención.

35 Los hongos producidos por LB811 y LB906 presentan un color de píleo visualmente blanco.

LB811 y LB906 mostraron valores más altos de L (luminosidad) en la primera oleada, incluso significativamente más altos para LB906. En la segunda oleada, los valores de L fueron comparables a los controles para LB811 pero de manera significativa ligeramente más bajos para LB906.

40 Además del color del sombrero en sentido estricto, la lisura del sombrero asimismo genera la impresión de hongos más brillantes y/o más blancos en comparación con las cepas comerciales actuales, tales como Sylvan A15 crecida en los mismos ensayos. La apariencia o el aspecto visual es más importante que los valores de color absolutos, ya que para los consumidores es la clave para comprar en el mercado de productos frescos.

45 La cepa “U1” ha heredado un fenotipo intermedio entre sus progenitores de color blanco liso y blanquecino (escamosas) (Fristche, 1981). Es de ligeramente escamosa a medianamente escamosa en la primera oleada y más lisa a partir de la segunda oleada. Todos los derivados de U1 expresan un fenotipo similar (por ejemplo, A15 y 512).

50 Por el contrario, LB811 y LB906 han sido sistemáticamente más lisas que el control A15 crecido en las mismas condiciones en las oleadas primera, segunda y tercera, independientemente de la escala (pequeña a grande) y la ubicación (Francia, Inglaterra, Bélgica) de los ensayos.

55 La tabla 8 muestra el color de superficie y el aspecto visual de los hongos producidos por los híbridos de la invención, en comparación con las cepas de control 512 y A15.

Tabla 8: comparación de 3 parámetros de color y 2 índices visuales para las oleadas 1 y 2, en los ensayos 1 y 2 (controles A15 y S12)

| Parámetro<br>Ensayo | Parámetros de medición del color |     |       |     |      |    | Índices visuales |    | Aspecto visual<br>1 2 |     |                              |    |                          |                          |               |               |
|---------------------|----------------------------------|-----|-------|-----|------|----|------------------|----|-----------------------|-----|------------------------------|----|--------------------------|--------------------------|---------------|---------------|
|                     | 1                                | L   | 2     | 1   | a    | 2  | 1                | b  |                       | 2   | Aspecto de superficie<br>1 2 |    |                          |                          |               |               |
| Oleada 1            |                                  |     |       |     |      |    |                  |    |                       |     |                              |    |                          |                          |               |               |
| 512                 | 92.04                            | C   | 92.38 | D   | 0.65 | BC | 0.50             | A  | 8.03                  | C   | 6.83                         | A  | Liso                     | Liso                     | Blanco        | Blanco        |
| A15                 | 91.97                            | C   | 92.65 | CD  | 0.57 | B  | 0.57             | AB | 8.90                  | A   | 7.31                         | AB | Medianamente<br>escamoso | Medianamente<br>escamoso | Blanco        | Blanco        |
| LB811               | 93.81                            | A   | 93.10 | ABC | 0.75 | C  | 0.63             | BC | 8.51                  | ABC | 8.25                         | CD | Muy liso                 | Muy liso                 | Muy<br>blanco | Muy<br>blanco |
| LB906               | 93.36                            | AB  | 93.66 | A   | 0.28 | A  | 0.73             | D  | 8.21                  | BC  | 8.13                         | BC | Muy liso                 | Muy liso                 | Muy<br>blanco | Muy<br>blanco |
| Oleada 2            |                                  |     |       |     |      |    |                  |    |                       |     |                              |    |                          |                          |               |               |
| 512                 | 93.83                            | ABC | 93.62 | A   | 0.75 | C  | 0.69             | BC | 8.08                  | CD  | 7.50                         | CD | Liso                     | Liso                     | Blanco        | Blanco        |
| A15                 | 93.40                            | A   | 93.94 | A   | 0.68 | BC | 0.59             | B  | 7.96                  | D   | 7.22                         | D  | Liso                     | Liso                     | Blanco        | Blanco        |
| LB811               | 93.50                            | C   | 94.29 | A   | 0.75 | C  | 0.84             | C  | 8.24                  | BCD | 8.00                         | BC | Muy liso                 | Muy liso                 | Muy<br>blanco | Muy<br>blanco |
| LB906               | 92.12                            | D   | 90.61 | B   | 0.13 | A  | 0.26             | A  | 8.78                  | AB  | 9.16                         | A  | Muy liso                 | Muy liso                 | Muy<br>blanco | Muy<br>blanco |

### 2.3.2. Caracterización fenotípica

#### a) Métodos:

5 Se ha medido la morfología de los hongos por medio de un calibre electrónico Mitutoyo, con los siguientes parámetros: 100 hongos/cepa, 4 medidas, para las oleadas 1 y 2, pico de la oleada (después de la recolección).

10 Se han medido el diámetro del sombrero (SombreroD), la altura del sombrero (SombreroH), el diámetro del estípite (EstípiteD) y la altura del estípite (EstípiteH).

Se han calculado las siguientes razones para el análisis estadístico:

Razón 1 =  $\text{SombreroD} / \text{SombreroH}$

Razón 2 =  $\text{EstípiteH} / \text{EstípiteD}$

15 Se ha calculado la varianza (prueba de la F) y se han comparado las medias (prueba de Tukey= 5%) para las 6 variables.

#### b) Resultados:

20 La morfología de los híbridos LB906 y LB811 se caracteriza en la tabla 9.

Tabla 9: diámetro del sombrero/estípite y altura del sombrero/estípite de los híbridos de la invención Los números seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes

| Parámetro Ensayo | Diámetro del sombrero (mm) |     | Altura del sombrero (mm) |    | Razón 1 |     | Diámetro del estípite (mm) |    | Altura del estípite (mm) |    | Razón 2 |    |       |   |       |    |       |       |       |       |      |      |      |      |    |
|------------------|----------------------------|-----|--------------------------|----|---------|-----|----------------------------|----|--------------------------|----|---------|----|-------|---|-------|----|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|----|
|                  | 1                          | 2   | 1                        | 2  | 1       | 2   | 1                          | 2  | 1                        | 2  | 1       | 2  |       |   |       |    |       |       |       |       |      |      |      |      |    |
| Oleada 1         |                            |     |                          |    |         |     |                            |    |                          |    |         |    |       |   |       |    |       |       |       |       |      |      |      |      |    |
| 512              | 30.02                      | A   | 32.38                    | C  | 21.48   | ABC | 20.29                      | C  | 1.58                     | C  | 1.60    | D  | 15.55 | A | 14.29 | D  | 28.22 | C     | 31.96 | AB    | 1.83 | C    | 2.26 | A    |    |
| A15              | 34.45                      | A   | 35.39                    | AB | 20.92   | BC  | 21.53                      | AB | 1.65                     | B  | 1.64    | C  | 16.18 | A | 16.15 | AB | AB    | 27.61 | C     | 29.95 | B    | 1.71 | C    | 1.87 | C  |
| LB811            | 34.09                      | A   | 34.48                    | B  | 22.08   | A   | 21.47                      | AB | 1.54                     | C  | 1.60    | CD | 14.39 | B | 15.19 | C  | C     | 32.30 | A     | 33.62 | A    | 2.26 | A    | 2.26 | A  |
| LB906            | 32.90                      | A   | 36.99                    | A  | 19.52   | D   | 20.75                      | BC | 1.68                     | AB | 1.78    | A  | 15.56 | A | 16.65 | A  | A     | 31.32 | AB    | 33.59 | A    | 2.02 | B    | 2.03 | BC |
| Oleada 2         |                            |     |                          |    |         |     |                            |    |                          |    |         |    |       |   |       |    |       |       |       |       |      |      |      |      |    |
| 512              | 27.26                      | D   | 33.20                    | BC | 17.06   | C   | 18.99                      | B  | 1.60                     | C  | 1.75    | B  | 13.79 | B | 15.72 | A  | A     | 28.26 | BC    | 31.69 | B    | 2.06 | BC   | 2.03 | B  |
| A15              | 30.60                      | C   | 32.34                    | C  | 18.28   | B   | 18.46                      | BC | 1.68                     | B  | 1.75    | B  | 13.56 | B | 15.80 | A  | A     | 31.13 | A     | 28.67 | C    | 2.33 | A    | 1.82 | C  |
| LB811            | 33.60                      | A   | 35.63                    | A  | 20.79   | A   | 20.94                      | A  | 1.61                     | C  | 1.70    | BC | 15.49 | A | 14.95 | BC | BC    | 24.92 | D     | 32.07 | B    | 1.62 | E    | 2.16 | B  |
| LB906            | 32.18                      | ABC | 33.20                    | BC | 18.06   | B   | 17.87                      | C  | 1.78                     | A  | 1.86    | A  | 14.88 | A | 14.57 | BC | BC    | 30.89 | A     | 34.97 | A    | 2.09 | B    | 2.43 | A  |

LB811 se caracteriza por un estípite estrecho y recto y un sombrero redondeado.

Más específicamente, el diámetro del estípite fue menor de manera significativa y repetida en comparación con los controles, lo que caracteriza un estípite estrecho.

LB906 se caracteriza por un estípite recto y un sombrero menos redondeado en comparación con los controles comerciales.

Más específicamente, la razón 1 (= diámetro del sombrero / altura del sombrero) fue menor de manera significativa y repetida en comparación con los controles, lo que caracteriza un sombrero achatado.

Por tanto, los híbridos de la invención (J10117, LB906 y LB811) presentan un fenotipo apropiado para la cosecha mecánica (estípite recto, hongos que crecen individualmente con distribución uniforme en el cultivo) y una buena calidad general de los hongos.

### 2.3.3. Ensayos agronómicos

#### a) Métodos

Se han realizado ensayos a pequeña, mediana y gran escala en diferentes instalaciones. Se crearon diseños experimentales para controlar el gradiente climático vertical para cada sala de cultivo y se aleatorizaron las parcelas dentro de cada nivel. El número de parcelas y el tamaño de parcela aumentaron desde las primeras etapas hasta las últimas del examen.

Para los ensayos a pequeña escala, las parcelas presentaban tinas de 0.12 m<sup>2</sup> (de 2 a 15 parcelas divididas en 5 niveles), tasa de llenado 75.5 kg de compost/m<sup>2</sup>, tasa de generación del blanco de hongo 0.7%, desarrollo del blanco de hongo 12 días en tinas (fase II), cobertura 53% de turba rubia - 21% de turba negra - 9% de piedra caliza - 17% de yeso, ciclo de producción 9 días y remover 2 días antes de airear.

Para los ensayos a mediana escala, las parcelas presentaban bandejas de 1.45 m<sup>2</sup> (de 3 a 12 parcelas divididas en 4 niveles), tasa de llenado 83 kg de compost/m<sup>2</sup>, tasa de generación del blanco de hongo 0.5%, desarrollo de blanco de hongo 15 días en bandejas (fase II), cobertura 80% de turba negra -10% de turba rubia -10% de cal de remolacha azucarera, *cacing* 375 g/m<sup>2</sup> y ciclo de producción de 8 días.

Para ensayos a gran escala, el desarrollo de blanco de hongo 16 días en un túnel a granel (fase III), tasa de generación del blanco de hongo 0.5%, se llenaron bandejas de 1.5 m<sup>2</sup> (20 o 25 parcelas/cepa divididas en 5 niveles) a 90 kg de compost incubado/m<sup>2</sup>, suplementado a 1.33 kg/m<sup>2</sup> (MC Substradd), recubierto con 100% de turba, *cacing* 300 g/m<sup>2</sup> y ciclo de producción 7 días.

Se incluyó un control comercial en cada ensayo (Sylvan A15). En las etapas iniciales del examen (ensayos a pequeña, mediana y gran escala), las nuevas cepas y el control se hicieron crecer en la misma sala (salas mixtas). En las etapas posteriores (ensayos a mediana y gran escala), el control se hizo crecer simultáneamente en una sala idéntica y paralela (salas independientes) con la práctica de cultivo adaptada a cada cepa con el fin de favorecer su crecimiento y producción y evaluar su potencial optimizado.

El riego se adaptó a los requisitos de cada tratamiento y parcela.

Los hongos se recolectaron en la etapa 2-3 para cada parcela y se registraron diariamente el tratamiento y el peso.

En los ensayos a pequeña escala, junto con el rendimiento, asimismo se registró diariamente el número de hongos por parcela.

La precocidad (tiempos) se evaluó tanto a partir de la fecha de la primera recolección (recolección de los primeros hongos) como a partir de la fecha del pico de la primera oleada (día en que se recolectó el peso máximo de hongos) comparando los datos de la cepa con los datos del control comercial.

Se evaluó el potencial de rendimiento como el peso de los hongos por unidad de superficie (es decir, kg/m<sup>2</sup>) de ensayos realizados a pequeña, mediana y gran escala, en comparación con 1 o 2 controles comerciales (Sylvan A15, Sylvan 512) con diseños experimentales apropiados que incluyeron repeticiones internas.

Se evaluaron los componentes del rendimiento (número de hongos y peso promedio de hongos = peso/número) a partir de ensayos a pequeña escala.

#### b) Resultados

Los tiempos mejorados constituyen una ventaja en lo que se refiere al manejo del cultivo, la calidad de los hongos

y desde el punto de vista económico, ya que el comienzo del periodo de cultivo está más limpio de plagas y enfermedades, en comparación con los días posteriores a la primera oleada y las oleadas posteriores del cultivo.

5 Sin embargo, el monocultivo casi global actual para *A. bisporus* restringe el rango de características de cultivo disponibles para los cultivadores de hongos (Romaine y Royse, 2011) y por tanto, los distintos rasgos distintivos tales como los tiempos y la distribución del rendimiento a lo largo del tiempo durante el cultivo pueden considerarse como ventajas en el contexto actual.

10 La tabla 10 muestra los tiempos de LB811 y LB906 en ensayos a pequeña, mediana y gran escala (expresados por comparación con el control comercial Sylvan A15).

15 En comparación con el control comercial, LB906 mostró mejores tiempos en lo que se refiere a la primera recolección en 66% de las pruebas y en lo que se refiere al pico de la primera oleada en 64% de las pruebas. Por tanto, LB906 puede describirse como una cepa temprana en comparación con el control.

20 En comparación con el control comercial, LB811 mostró mejores tiempos en lo que se refiere a la primera recolección en 48% de las pruebas y en lo que se refiere al pico de la primera oleada en 60% de las pruebas. Por tanto, LB811 puede describirse como una cepa temprana en comparación con el control, aunque en menor grado en comparación con LB906.

Las figuras 1 a 3 presentan el rendimiento acumulativo a lo largo del tiempo para los híbridos de la invención en comparación con controles comerciales (A15, Sylvan 512) en ensayos a pequeña, mediana o gran escala.

25 Tal como se observa en las figuras 1 (A y B), 2A y 3 (A y B), los tiempos de LB906 siempre son mejores en comparación con las cepas comerciales A15 y Sylvan 512. Además, los tiempos de LB906 mejoran adicionalmente en comparación con LB811 a pequeña escala (véanse las figuras 1A y 1B) y a gran escala (ver la figura 3A).

30 En lo que se refiere a LB811, las figuras 2B y 3A muestran que sus tiempos son mejores que los de las cepas de control a mediana escala y a gran escala, aunque no son mejores en ensayos a pequeña escala (figuras 1A y 1B).

Por tanto, las cifras adjuntas muestran los tiempos mejorados (es decir, la recolección más temprana de los hongos en la primera oleada), la mayor contribución de los primeros días de la primera oleada al rendimiento del cultivo total y el rendimiento potencial de los híbridos de la invención en comparación con los controles comerciales.

Tabla 10: tiempos de LB811 y LB906 en ensayos a pequeña, mediana y gran escala

| Cepa  | Escala  | Tipo (salas mixtas / independientes) | N.º de ensayos | N.º de pruebas | Fecha de la primera recolección de la 1ª oleada<br>Tiempos* del control – tiempos de la nueva cepa (días)<br>(en el mismo ensayo) |    |    |    |    | Fecha del pico de la 1ª oleada<br>Tiempos* del control – tiempos de la nueva cepa (días)<br>(en el mismo ensayo) |    |        |         |         |
|-------|---------|--------------------------------------|----------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|--------|---------|---------|
| LB811 | Pequeña | Mixtas                               | 12             | 31             | -2                                                                                                                                | -1 | 0  | 11 | 8  | 9                                                                                                                | 2  | 0      | 0       | 0       |
| LB811 | Mediana | Mixtas                               | 13             | 44             | 0                                                                                                                                 | 0  | 26 | 4  | 14 | 0                                                                                                                | 0  | 4      | 12      | 21      |
| LB811 | Mediana | Independientes                       | 0              | /              | /                                                                                                                                 | /  | /  | /  | /  | /                                                                                                                | /  | /      | /       | /       |
| LB811 | Grande  | Mixtas                               |                | 2              | 0                                                                                                                                 | 0  | 1  | 0  | 1  | 0                                                                                                                | 0  | 0      | 0       | 1       |
| LB811 | Grande  | Independientes                       |                | 3              | 0                                                                                                                                 | 0  | 3  | 0  | 0  | 0                                                                                                                | 0  | 0      | 2       | 1       |
|       |         |                                      |                | 80             | 1                                                                                                                                 | 0  | 41 | 12 | 24 | 2                                                                                                                | 0  | 0      | 4       | 40      |
|       |         |                                      |                |                | 1                                                                                                                                 | 0  | 41 | 38 | 4  | 28                                                                                                               | 48 | (5.0%) | (35.0%) | (60.0%) |
|       |         |                                      |                |                | (1.3%)                                                                                                                            |    |    |    |    | (47.5%)                                                                                                          |    |        |         |         |
|       |         |                                      |                |                | (51.3%)                                                                                                                           |    |    |    |    |                                                                                                                  |    |        |         |         |

| Cepa  | Escala  | Tipo (salas mixtas / independientes) | N.º de ensayos | N.º de pruebas | Fecha de la primera recolección de la 1ª oleada<br>Tiempos del control – tiempos de la nueva cepa (días)<br>(en el mismo ensayo) | Fecha del pico de la 1ª oleada<br>Tiempos del control – tiempos de la nueva cepa (días)<br>(en el mismo ensayo) |
|-------|---------|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LB906 | Pequeña | Mixtas                               | 13             | 27             | -2 -1 0 1 2 3 4<br>0 0 7 1 9 8 2                                                                                                 | -2 -1 0 1 2 3 4<br>0 0 6 1 2 0 0                                                                                |
| LB906 | Mediana | Mixtas                               | 11             | 38             | 1 0 14 2 21 0 0                                                                                                                  | 0 2 14 16 0 6 0                                                                                                 |
| LB906 | Mediana | Independientes                       | 1              | 6              | 0 0 3 0 3 0 0                                                                                                                    | 0 0 2 1 0 3 0                                                                                                   |
| LB906 | Grande  | Mixtas                               |                | 2              | 0 0 1 1 0 0 0                                                                                                                    | 0 1 0 1 0 0 0                                                                                                   |
| LB906 | Grande  | Independientes                       |                | 3              | 0 0 0 3 0 0 0                                                                                                                    | 0 0 2 0 1 0 0                                                                                                   |
|       |         |                                      |                | 76             | 1 0 25 7 33 8 2                                                                                                                  | 0 2 25 38 2 9 0                                                                                                 |
|       |         |                                      |                |                | 1 25 50<br>(1.3%) (32.9%) (65.8%)                                                                                                | 2 25 49<br>(2.6%) (32.9%) (64.5%)                                                                               |

La tabla 11 muestra el rendimiento agronómico (kg/m<sup>2</sup>) de LB811 y LB906 en ensayos a pequeña escala:

|                                                                                                                  | Primera oleada |   |          |    | Datos finales (oleadas primera + segunda) |   |          |   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---|----------|----|-------------------------------------------|---|----------|---|
|                                                                                                                  | Ensayo 1       |   | Ensayo 2 |    | Ensayo 1                                  |   | Ensayo 2 |   |
| 512 (control)                                                                                                    | 12.82          | A | 10.03    | C  | 22.23                                     | A | 18.89    | A |
| A15 (control)                                                                                                    | 13.48          | A | 10.57    | BC | 21.99                                     | A | 19.10    | A |
| LB811-1                                                                                                          | 9.94           | B | 8.43     | D  | 15.95                                     | C | 16.13    | B |
| LB811-2                                                                                                          | 10.31          | B | 8.25     | D  | 16.21                                     | C | 15.31    | B |
| LB811-3                                                                                                          | 9.91           | B | 9.79     | C  | 15.86                                     | C | 16.61    | B |
| LB906-1                                                                                                          | 13.46          | A | 12.04    | A  | 20.60                                     | B | 18.75    | A |
| LB906-2                                                                                                          | 13.79          | A | 11.47    | AB | 20.42                                     | B | 19.12    | A |
| Los números seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Tukey, $\alpha = 5\%$ ). |                |   |          |    |                                           |   |          |   |

La tabla 12 muestra el número de hongos de LB811 y LB906 (hongos / parcela) en ensayos a pequeña escala:

|                                                                                                                  | Primera oleada |   |          |    | Datos finales (oleadas primera + segunda) |   |          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---|----------|----|-------------------------------------------|---|----------|----|
|                                                                                                                  | Ensayo 1       |   | Ensayo 2 |    | Ensayo 1                                  |   | Ensayo 2 |    |
| 512 (control)                                                                                                    | 151.81         | A | 104.00   | A  | 312.03                                    | A | 224.67   | A  |
| A15 (control)                                                                                                    | 148.33         | A | 100.53   | A  | 289.20                                    | A | 216.93   | A  |
| LB811-1                                                                                                          | 109.80         | B | 77.07    | B  | 188.80                                    | C | 170.87   | CD |
| LB811-2                                                                                                          | 107.80         | B | 79.53    | B  | 182.60                                    | C | 160.00   | D  |
| LB811-3                                                                                                          | 100.20         | B | 95.27    | AB | 170.93                                    | C | 168.60   | CD |
| LB906-1                                                                                                          | 147.53         | A | 101.93   | A  | 246.80                                    | B | 183.73   | BC |
| LB906-2                                                                                                          | 157.80         | A | 95.73    | AB | 243.93                                    | B | 192.13   | B  |
| Los números seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Tukey, $\alpha = 5\%$ ). |                |   |          |    |                                           |   |          |    |

Además, los hongos más grandes pueden constituir una ventaja para el mercado de productos frescos, ya que la recolección manual es un coste de producción importante, si no el principal: cuando los hongos son más grandes y más pesados, el acto individual de recolectar es más eficaz y por tanto, se mejora la productividad de la recolección.

Por tanto se evaluó el peso promedio de los hongos de la invención.

La tabla 13 muestra el peso promedio de hongos (g/hongo) para LB906 y LB811:

|                                                                                                                  | Primera oleada |     |          |    | Segunda oleada |    |          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----|----------|----|----------------|----|----------|----|
|                                                                                                                  | Ensayo 1       |     | Ensayo 2 |    | Ensayo 1       |    | Ensayo 2 |    |
| 512 (control)                                                                                                    | 10.13          | C   | 11.74    | B  | 7.08           | C  | 8.83     | C  |
| A15 (control)                                                                                                    | 10.96          | ABC | 12.68    | B  | 7.26           | C  | 8.76     | C  |
| LB811-1                                                                                                          | 10.83          | ABC | 13.43    | AB | 9.19           | AB | 9.94     | BC |
| LB811-2                                                                                                          | 11.49          | AB  | 12.55    | B  | 9.55           | AB | 10.64    | AB |
| LB811-3                                                                                                          | 11.84          | A   | 12.61    | B  | 10.20          | A  | 11.31    | A  |
| LB906-1                                                                                                          | 11.01          | ABC | 14.61    | A  | 8.80           | B  | 9.86     | BC |
| LB906-2                                                                                                          | 10.48          | BC  | 14.63    | A  | 9.36           | AB | 9.46     | BC |
| Los números seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Tukey, $\alpha = 5\%$ ). |                |     |          |    |                |    |          |    |

En este ensayo a pequeña escala, cuando se hace crecer LB811 en la misma sala de crecimiento en las mismas condiciones que el control comercial, su potencial de rendimiento es menor en comparación con los controles comerciales tanto en la primera como en la segunda oleada (tabla 11), ya que produce un menor número de hongos (tabla 12); sin embargo los hongos de LB811 tienden a ser más grandes tal como se indica por sus valores de peso promedio (tabla 13). Por tanto, su productividad de recolección mejora significativamente.

Cuando se hace crecer junto con el control comercial, LB906 muestra un rendimiento comparable (tabla 9), con un rendimiento mayor en la primera oleada. LB906 produce un número comparable de hongos en la primera oleada y menos hongos en la segunda oleada (tabla 10); estos hongos son más grandes tal como se muestra por los valores de peso promedio (tabla 11). Por tanto, su productividad de recolección mejora significativamente.

LB811 y LB906 se evaluaron adicionalmente en ensayos específicos a mediana y gran escala con el fin de confirmar que puedan lograrse resultados de rendimiento comparables a los controles comerciales, tal como se observó en los ensayos a pequeña escala (tabla 12, figuras 1 a 3).

Los resultados de los ensayos a mediana y gran escala para LB811 muestran que su rendimiento final puede ser comparable a los controles comerciales con mejores tiempos en la primera oleada (tabla 12, figuras 2 a 3).

Los resultados para LB906 muestran que su rendimiento final puede ser comparable a los controles comerciales con mejores tiempos en la primera oleada (tabla 14, figuras 2 a 3).

Tabla 14: Rendimiento agronómico (kg/m<sup>2</sup>) en ensayos a pequeña, mediana y gran escala para LB811, LB906 y A15 (ver la página siguiente)

| Escala  | Primera oleada        |                   |       | Segunda oleada      |                    |       | Total                |                      |       |
|---------|-----------------------|-------------------|-------|---------------------|--------------------|-------|----------------------|----------------------|-------|
|         | LB811                 | LB906             | A15   | LB811               | LB906              | A15   | LB811                | LB906                | A15   |
| Pequeña | 9.97 - 10.34 - 9.89   | 13.82-13.44       | 13.44 | 6.04 - 5.89 - 5.96  | 6.64-7.17          | 8.53  | 15.95 -16.21 - 15.86 | 20.42 - 20.60        | 21.99 |
| Pequeña | 8.46 - 8.23 - 9.82    | 11.48-12.00       | 10.57 | 7.70 - 7.02 - 6.80  | 7.63 - 6.72        | 8.53  | 16.13 -15.31 - 16.61 | 19.12 - 18.75        | 19.10 |
| Mediana | nd                    | 10.64-9.57 -10.19 | 12.22 | nd                  | 9.05 - 9.69 - 8.22 | 7.89  | nd                   | 19.87 - 19.26 -18.47 | 20.10 |
| Mediana | 14.17 - 14.20 - 11.94 | nd                | 10.21 | 7.57 - 8.68 - 10.15 | nd                 | 12.72 | 21.74 - 22.88 -22.09 | nd                   | 22.92 |
| Grande  | 15.48                 | 16.48             | 14.64 | 9.82                | 10.24              | 11.74 | 29.18                | 29.50                | 30.35 |
| Grande  | nd                    | 17.78             | 17.24 | nd                  | 10.41              | 11.64 | nd                   | 32.07                | 33.69 |

## 2.4. Genotipado

## 2.4.1. Huellas de SSR

## 5 a) Métodos

Se obtuvo el genotipo de 12 cepas mediante huellas de marcadores SSR (repetición de secuencia única, es decir, microsatélite):

- 10
- 3 heterocariones parentales: FS9.18, Somycel 76, híbrido Sylvan J10117.
  - 3 homocariones parentales: FS9.18s50, 76s14, J10117s62.
  - 2 híbridos de Somycel (heterocariones): LB811, LB906.
  - 4 controles (heterocariones, cepas comerciales): U1, Sylvan A15, Sylvan 512 y Sylvan 520.

15 Se prepararon cultivos en caldo de estas cepas a partir de placas, triturando tapones de cultivos de agar en medio de caldo de dextrosa de patata. Después de un periodo de incubación de una a unas pocas semanas a 24°C (dependiendo de la velocidad de crecimiento), se filtraron los cultivos en caldo (papel de filtro crepado cualitativo con retención de partículas de 40 µm). El micelio se secó por congelación: se congeló (nitrógeno líquido a -196°C) y se liofilizó hasta la sequedad.

20 Se extrajo el ADN total con un protocolo clásico de CTAB-cloroformo-álcohol isoamílico, las concentraciones de ADN se ajustaron a 25 ng/µl y se almacenaron (-20°C).

25 El genotipado se realizó utilizando 22 marcadores publicados microsatélites codominantes enumerados en la tabla 15 (ver Foulongne-Oriol *et al.* 2009 para conocer las secuencias de cebador y las condiciones de amplificación). Los cebadores directos se marcaron con uno de los siguientes colorantes fluorescentes (6-FAM, PET, VIC y NED) tal como sigue:

- 30
- 6-FAM: AbSSSR 12 14 23 36 58 64
  - PET: AbSSSR 05 13 39 43 56 57
  - VIC: AbSSSR 02 19 33 42 49
  - NED: AbSSSR 3145 59 60 65

35 La electroforesis capilar y la determinación del tamaño de los fragmentos se realizó en un secuenciador ABI 3130 (Applied Biosystems) utilizando el patrón interno GenScan™ 600 LIZ (Applied Biosystems) (Foulongne-Oriol *et al.*, 2012).

## b) Resultados:

40 Las tablas 15 y 15bis presentan las huellas de 4 controles comerciales (U1 y 3 derivados de U1, concretamente Sylvan A15, 512 y 520), 2 híbridos (LB811 y LB906), sus 3 progenitores heterocariotas (J10117, FS9.18 y 76) y sus 3 progenitores homocariotas (J10117s62, FS9.18s50 y 76s14) para 22 marcadores SSR.

45 Las huellas de U1, A15, 512 y 520 muestran resultados idénticos en un 100% para 22 marcadores y por tanto confirman la afirmación de falta de diversidad genética entre las cepas comerciales actuales (Foulongne-Oriol *et al.*, 2011, Sonnenberg *et al.*, 2011).

50 Por el contrario, LB811 difiere de todos los derivados de U1 por su genotipo en 4 marcadores de los 22 (18.2%): AbSSR 23 39 58 65.

50 LB906 difiere de todos los derivados de U1 por su genotipo en 5 marcadores de los 22 (22.7%): AbSSR 02 23 36 39 42.

55 LB811 y LB906 difieren entre sí por su genotipo en 5 marcadores de los 22 (22.7%): AbSSR 02 36 42 58 65.

Las huellas únicas de los 3 híbridos LB811, LB906 y J10117 en los 22 marcadores se detallan en la tabla 15.

Tabla 15: huellas de genotipo de U1 y 3 derivados de U1 comerciales con 22 marcadores microsatélites SSR.

| Marcadores | U1      | Sylvan A15 | Sylvan 512 | Sylvan 520 |
|------------|---------|------------|------------|------------|
| AbSSR02    | 188/188 | 188/188    | 188/188    | 188/188    |
| AbSSR05    | 329/332 | 329/332    | nd         | 329/332    |
| AbSSR12    | 171/171 | 171/171    | 171/171    | 171/171    |
| AbSSR13    | 212/212 | 212/212    | 212/212    | 212/212    |
| AbSSR14    | 167/167 | 167/167    | 167/167    | 167/167    |

| Marcadores | U1      | Sylvan A15 | Sylvan 512 | Sylvan 520 |
|------------|---------|------------|------------|------------|
| AbSSR19    | 191/191 | 191/191    | 191/191    | 191/191    |
| AbSSR23    | 170/176 | 170/176    | 170/176    | 170/176    |
| AbSSR31    | 167/167 | 167/167    | 167/167    | 167/167    |
| AbSSR33    | 192/192 | 192/192    | 192/192    | 192/192    |
| AbSSR36    | 149/157 | 149/157    | 149/157    | 149/157    |
| AbSSR39    | 186/186 | 186/186    | 186/186    | 186/186    |
| AbSSR42    | 177/179 | 177/179    | 177/179    | 177/179    |
| AbSSR43    | 231/231 | 231/231    | 231/231    | 231/231    |
| AbSSR45    | 193/203 | 193/203    | 193/203    | 193/203    |
| AbSSR49    | 174/174 | 174/174    | 174/174    | 174/174    |
| AbSSR56    | 225/225 | 225/225    | 225/225    | 225/225    |
| AbSSR57    | 257/257 | 257/257    | 257/257    | 257/257    |
| AbSSR58    | 167/169 | 167/169    | 167/169    | 167/169    |
| AbSSR59    | 197/201 | 197/201    | 197/201    | 197/201    |
| AbSSR60    | 206/208 | 206/208    | 206/208    | 206/208    |
| AbSSR64    | 104/104 | 104/104    | 104/104    | 104/104    |
| AbSSR65    | 188/213 | 188/213    | 188/213    | 188/213    |

Tabla 15bis: huellas de genotipo de los híbridos de la invención y sus progenitores con 22 marcadores microsatélites SSR.

| Marcadores | LB811   | LB906   | J10117  | FS9.18  | 76      | J10117s62 | Fs9.18s50 | 76s14 |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|-----------|-------|
| AbSSR02    | 188/188 | 188/192 | 188/188 | 188/192 | 188/192 | 188       | 188       | 192   |
| AbSSR05    | 329/332 | 329/332 | 329/332 | 329/329 | 329/332 | 332       | 329       | 329   |
| AbSSR12    | 171/171 | 171/171 | 171/174 | 171/171 | 171/171 | 171       | 171       | 171   |
| AbSSR13    | 212/212 | 212/212 | 212/212 | nd      | 212/212 | 212       | 212       | nd    |
| AbSSR14    | 167/167 | 167/167 | 167/167 | 167/167 | 167/167 | 167       | 167       | 167   |
| AbSSR19    | 191/191 | 191/191 | 191/191 | 191/191 | 191/191 | 191       | 191       | 191   |
| AbSSR23    | 176/176 | 176/176 | 176/176 | 176/176 | 170/176 | 176       | 176       | 176   |
| AbSSR31    | 167/167 | 167/167 | 167/167 | 153/167 | 167/167 | 167       | 167       | 167   |
| AbSSR33    | 192/192 | 192/192 | 192/192 | 192/192 | 192/192 | 192       | 192       | 192   |
| AbSSR36    | 149/157 | 149/149 | 149/149 | 149/157 | 149/149 | 149       | 157       | 149   |
| AbSSR39    | 186/188 | 186/188 | 186/188 | 186/186 | 186/186 | 188       | 186       | 186   |
| AbSSR42    | 177/179 | 179/179 | 177/179 | 177/177 | 179/179 | 179       | 177       | 179   |
| AbSSR43    | 231/231 | nd      | 231/231 | 210/231 | nd      | nd        | 231       | nd    |
| AbSSR45    | 193/203 | 193/203 | 193/203 | 193/195 | 193/195 | 203       | 193       | 193   |
| AbSSR49    | 174/174 | 174/174 | 174/174 | 174/174 | 174/174 | 174       | 174       | 174   |
| AbSSR56    | 225/225 | 225/225 | 225/225 | 225/225 | 225/225 | 225       | nd        | nd    |
| AbSSR57    | 257/257 | 257/257 | 257/257 | 252/257 | 257/257 | 257       | 257       | 257   |
| AbSSR58    | 165/169 | 167/169 | 169/169 | 165/165 | 167/167 | 169       | 165       | 167   |
| AbSSR59    | 197/201 | 197/201 | 197/201 | 197/197 | 197/203 | 201       | 197       | 197   |
| AbSSR60    | 206/208 | 206/208 | 206/208 | 208/208 | 208/208 | 206       | 208       | 208   |
| AbSSR64    | 104/104 | 104/104 | 104/104 | 104/104 | 104/111 | 104       | 104       | 104   |
| AbSSR65    | 197/213 | 188/213 | 213/213 | 188/197 | 188/188 | 213       | 197       | 188   |

5

LB811 y LB906 presentan un progenitor patentado Sylvan (J10117) y un progenitor comercial o previamente comercial (respectivamente, FS9.18 y 76).

10 LB906 presenta un progenitor patentado (J10117) y un progenitor blanquecino prehíbrido (76). Las huellas genotípicas muestran un polimorfismo entre los progenitores:

- Cuando se consideran los 2 progenitores heterocariotas, 11 marcadores de 21 (52.4%) muestran un polimorfismo.
- Cuando se consideran los 2 progenitores homocariotas:
  - 11 marcadores de 21 (52.4%) no muestran un polimorfismo entre los progenitores homocariotas,
  - 8 marcadores de 21 (38.1%) muestran un polimorfismo entre los progenitores homocariotas: AbSSR 02 05 39 45 58 59 60 65.

20

Estos marcadores pueden utilizarse para mostrar el árbol genealógico de LB906.

LB811 presenta un progenitor patentado (J10117) y un progenitor comercial (FS9.18). Las huellas genotípicas muestran un polimorfismo entre los progenitores:

- Cuando se consideran los 2 progenitores heterocariotas, 14 marcadores de 22 (63.6%) muestran un polimorfismo.

- Cuando se consideran los 2 progenitores homocariotas:

- 14 marcadores de 22 (63.6%) no muestran un polimorfismo entre los progenitores homocariotas,

- 9 marcadores de 22 (40.9%) muestran un polimorfismo entre los progenitores homocariotas: AbSSR 05 36 39 42 45 58 59 60 65.

Estos marcadores pueden utilizarse para mostrar el árbol genealógico de LB811.

Cuando se considera LB811 en comparación con sus progenitores heterocariotas, U1 y todos sus derivados (es decir, J10117, FS9.18, U1, A15, 512 y 520), 2 marcadores pueden discriminar LB811: AbSSR 58 y 65.

#### 2.4.2. Alelos de tipo apareamiento y genotipo en los marcadores moleculares P1N150

El marcador P1N150 está asociado al locus *MAT* (Xu *et al.*, 1993, Kerrigan *et al.*, 1993). Su secuencia está disponible a partir de la secuencia del genoma de referencia H97 V2.0 (Morin *et al.*, 2012) publicado por el Joint Genome Institute (JGI) del Departamento de Energía de los EE.UU. El extremo en 5' de este marcador comienza en la posición 868615 de la estructura 1. Las secuencias alélicas de los alelos 1, 2, 3, 4 y 7 de P1N150 se facilitan en SEC ID N°: 1 a 5, respectivamente.

U1 y todos sus derivados (incluyendo Sylvan A15, 512 y 520) se caracterizan por un perfil de genotipo heteroalélico "1/2". Los heterocariones "blanquecinos" (incluyendo Somycel 76) se caracterizan por un perfil de genotipo heteroalélico "1/3" (Imbernon *et al.*, 1995).

Los progenitores heterocariotas J10117, FS9.18 y 76 se caracterizan respectivamente por los perfiles de genotipo heteroalélicos "2/4", "2/7" y "1/3".

Los progenitores homocariotas J10117s62, FS9.18s50h y 76s14 se caracterizan respectivamente por los perfiles de genotipo homoalélicos "4", "7" y "3".

El híbrido LB811 se caracteriza por un perfil de genotipo heterocariota "4/7" distintivo.

El híbrido LB906 se caracteriza por un perfil de genotipo heterocariota "3/4" distintivo.

Por tanto, J10117, LB811 y LB906 pueden distinguirse de todos los derivados de U1, de sus progenitores heterocariotas u homocariotas, y entre sí basándose en su genotipo de P1N150.

#### 2.4.3. Genotipado por PCR

La tabla 16 resume el material y los métodos utilizados para el genotipado por PCR de las cepas de la invención en comparación con otras cepas híbridas o cepas de homocarión tales como J10165 (tal como se da a conocer en los documentos US20100218294 y US2100154079), J11500 (tal como se da a conocer en los documentos WO/2015/114612) y J9277 (tal como se da a conocer en los documentos US20080182321 y US2010154079).

| Marcador | Cebador directo | Cebador inverso | Parámetros de PCR |                            |                     | Alelos        |
|----------|-----------------|-----------------|-------------------|----------------------------|---------------------|---------------|
|          |                 |                 | Número de ciclos  | Temperatura de hibridación | Tiempo de extensión |               |
| P1N150   | 5'-             | 5'-             | 35                | 56°C                       | 1 min               | 1 (o 1T)<br>2 |
|          | AGGCRYCC        | GTTCGACG        |                   |                            |                     |               |
|          | CATCTTCAS       | ACGGACTG        |                   |                            |                     |               |
|          | C-3'            | C-3'            |                   |                            |                     | 3<br>4<br>7   |
|          | SEC ID 6        | SEC ID 7        |                   |                            |                     |               |

| Marcador       | Cebador directo                         | Cebador inverso                         | Parámetros de PCR |                            |                     | Alelos             |
|----------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|----------------------------|---------------------|--------------------|
|                |                                         |                                         | Número de ciclos  | Temperatura de hibridación | Tiempo de extensión |                    |
| ITS            | 5'-<br>TCCGTAGG                         | 5'-<br>TCCTCCGCT                        | 35                | 56°C                       | 1 min               | L1<br>L2<br>L4     |
|                | TGAACCTG<br>CGG-3'<br>SEC ID 8          | TATTGATAT<br>GC-3'<br>SEC ID 9          |                   |                            |                     | L6<br>L10          |
| MFPC-1-<br>ELF | 5'-<br>AYTCRCAA                         | 5'-<br>CATTCGGC                         | 35                | 55°C                       | 0.5 min             | E1<br>E2<br>E7     |
|                | MAACATAC<br>CTTCAAC-3'<br>SEC ID 10     | GATTTTCTC<br>A-3'<br>SEC ID 11          |                   |                            |                     | E8<br>E9           |
| AN             | 5'-<br>GACGATGC                         | 5'-<br>GGTCTGGC                         | 35                | 64°C                       | 2 min               | N1<br>N2<br>N5     |
|                | GGGACTGG<br>TGGAT-3'<br>SEC ID 12       | CTACRGGA<br>GTGTTGT-<br>3'<br>SEC ID 13 |                   |                            |                     | N6<br>N7           |
| AS             | 5'-<br>CCGCCAGC                         | 5'-<br>TCAGTCGG                         | 35                | 64°C                       | 2 min               | SD<br>SH<br>SC     |
|                | ACAAGGAA<br>TCAAATG-<br>3'<br>SEC ID 14 | CCCTCAAA<br>ACAGTC-3'<br>SEC ID 15      |                   |                            |                     | SB<br>SG           |
| FF             | 5'-<br>TCGGGTGG                         | 5'-<br>TTCCTTTCC                        | 35                | 64°C                       | 2 min               | FF1<br>FF2<br>FF4  |
|                | TTGCAACT<br>GAAAAG-3'<br>SEC ID 16      | GCCTTAATT<br>GTTTCT-3'<br>SEC ID 17     |                   |                            |                     | FF5<br>FF9<br>FF10 |

Las secuencias de nucleótidos de los cebadores directo e inverso se representan en SEC ID Nº 6 a 17.

5 Basándose en esta tecnología de genotipado, en la tabla 17 a continuación se recopilan los resultados (el alelo 1 se enumera como 1T en esta tabla con respecto al marcador P1N150 y los detalles de diversos alelos para este marcador se detallaron anteriormente). Los diversos alelos para los marcadores ITS, MFPC-1-ELF, AN, AS, FF difieren en su polimorfismo de secuencia.

Tabla 17. Combinaciones alélicas para diversas cepas sometidas a prueba para diferentes marcadores

| marcador   | J1011 7 | J10117 -s62 | FSfs9fs99 -18 | FS9 -18-s50 | LB811   | LB906   | A-15    | J9277   | J1016 5 | J1150 0 |
|------------|---------|-------------|---------------|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| P1N15 0    | 2/4     | 4           | 2/7           | 7           | 4/7     | 3/4     | 1T/2    | 1T/4    | 1/2     | 1T/2    |
| ITS        | I2/I6   | I2/I6       | I10/I10       | I10         | I2/I10  | I1/I2   | I1/I2   | I2/I4   | I2/I5   | I1/I4   |
| MFPC-1-ELF | E1/E8   | E1          | E7/E9         | E7          | E1/E7   | E1/E1   | E1/E2   | E1/E2   | E1/E1   | E1/E1   |
| AN         | N1/N7   | N1          | N6/N6         | N6          | N1/N 6  | N1/N 1  | N1/N 2  | N1/N 5  | N1/N2   | N1/N5   |
| AS         | SD/SH   | SH          | SB/SC         | SB          | nd      | SD/SH   | SC/SD   | SD/SG   | SC/SG   | SC/SD   |
| FF         | FF2/FF4 | FF4         | FF9/FF10      | FF9         | FF4/FF9 | FF2/FF4 | FF1/FF2 | FF2/FF2 | FF2/FF5 | FF1/FF1 |

Estos resultados muestran de nuevo que las cepas según la presente invención son genéticamente diferentes de cualquier cepa conocida.

La tabla 18 muestra el número de diferencias genéticas entre las cepas basándose en los marcadores de PCR sometidos a prueba.

|        | N.º de marcadores | A15 | LB811 | LB906 | J10117 | J10165 | J11500 | J9277 |
|--------|-------------------|-----|-------|-------|--------|--------|--------|-------|
| LB811  | 5                 | 5   |       |       |        |        |        |       |
| LB906  | 6                 | 5   | 5     |       |        |        |        |       |
| J10117 | 6                 | 6   | 5     | 4     |        |        |        |       |
| J10165 | 6                 | 5   | 5     | 4     | 6      |        |        |       |
| J11500 | 6                 | 4   | 5     | 4     | 6      | 5      |        |       |
| J9277  | 6                 | 5   | 5     | 4     | 6      | 6      | 5      |       |

Con este panel de 6 marcadores de PCR, cada una de las cepas muestra un perfil de genotipo único.

El número de alelos diferentes entre las cepas (comparaciones de pares) se presenta en la tabla 18 anterior.

#### Listado de referencias

Beelman R.B., *et al.*, 2008. Bioactive components in *Agaricus bisporus* of nutritional, medicinal or biological importance. Mushroom Science, XVII, 1-16.

Callac P., *et al.*, 1993. Morphological, genetic, and interfertility analyses reveal a novel, tetrasporic variety of *Agaricus bisporus* from the Sonoran Desert of California. Mycologia, 85: 835-851.

Callac P., *et al.*, 2003. A novel homothallic variety of *Agaricus bisporus* comprises rare tetrasporic isolates from Europe. Mycologia 95: 222-231.

Chen S. & Kanaya N., 2012. Protective effects of *Agaricus bisporus* against cancer and metabolic diseases. Mushroom Science XVI II, 28-33.

Coale C.W.J. & Butz W.T., 1972. Impact of selected economic variables on the profitability of commercial mushroom processing operations. Mushroom Science VII I, 231-237.

Donker H.C.W., *et al.*, 1996. NMR imaging of white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) at various magnetic fields. Magnetic Resonance Imaging 14 (10): 1205-1215.

Fletcher J.T. & Gaze R.H., 2008 Mushroom pests and disease control. A colour handbook. Manson Publishing. ISBN: 978-1-84076-083-4 [Cap. 1. Mushroom growing, págs. 7-17; Cap. 2. Mushroom growing systems, págs. 18-21; Cap. 6. Viral diseases, págs. 109-123]

Foulongne-Oriol M., *et al.*, 2011. *Agaricus bisporus* cultivars: Hidden diversity beyond apparent uniformity? In: Proceedings of the Seventh International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. (J.M. Savoie, M. Foulongne-Oriol, M. Largeteau, G. Barroso Eds). Vol. 2. págs. 9-16 I NRA, Francia.

Foulongne-Oriol M., *et al.*, 2012. Quantitative trait locus mapping of yield-related components and oligogenic control of the cap color of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology 78(7): 2422-2434. DOI: 10.1128/AEM.07516-11.

Foulongne-Oriol M., *et al.*, 2009. Novel microsatellite markers suitable for genetic studies in the white button mushroom *Agaricus bisporus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. DOI: 10.1007/S00253-009-2030-8.

Foulongne-Oriol M., *et al.*, 2012. Development of polymorphic microsatellite markers issued from pyrosequencing technology for the medicinal mushroom *Agaricus subrufescens*. FEMS Microbiol. Lett. 334: 119-126.

Fritsche G., 1983. Breeding *Agaricus bisporus* at the Mushroom Experimental Station, Horst. The Mushroom Journal, 122, 49-53.

Gao W., *et al.* 2013 Genetic variation and combining ability analysis of bruising sensitivity in *Agaricus bisporus*. PloS one, 8 (10). e76826.

Imbernon M., *et al.*, 1995. Allelic polymorphism at the mating-type locus in *Agaricus bisporus* var. *burnettii*, and confirmation of the dominance of its tetrasporic trait. Mushroom Science XIV, 1, 11-19.

Kerrigan R.W.K., *et al.*, 1994. The heterothallic life cycle of *Agaricus bisporus* var. *burnettii*, and the inheritance of its tetrasporic trait. *Exp Mycol* 18: 193-210.

5 Kerrigan R.W.K., *et al.*, 1993. Meiotic behavior and linkage relationships in the secondary homothallic fungus *Agaricus bisporus*. *Genetics*, 133: 225-236.

10 Morin E., *et al.*, 2012. Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 de Oct. de 2012; 109(43). 17501-6. DOI: 10.1073/pnas.1206847109. Epub 8 de Oct de 2012.

Rama T., *et al.*, 2000. Relationship between sporophore morphology and mushroom quality. *Mushroom Science*, XV (2): 725-731.

15 Rama T., *et al.*, 1997. Review on mechanical properties and morphology related to mushroom quality. *Plant Biomechanics*: 295-300.

Romaine CP. & Royse D.J., 2011. Biotechnology of mushroom (*Agaricus bisporus*) production. *Encyclopaedia of Biotechnology in Agriculture and Food* DOI: 10.1081/E- EBAF-120047309.

20 Savoie J.M., *et al.*, 2013. Genetics and genomics of cultivated mushrooms, application to breeding of Agarics. *Agricultural Applications*, 2ª Edición. *The Mycota XI*. F. Kempken (Ed.). © Springer-Verlag Berlín Heidelberg 2013.

25 Sonnenberg A.S., *et al.*, 2011. Breeding and strain protection in the button mushroom *Agaricus bisporus*. In: Savoie JM., Foulongne-Oriol M., Largeau M., Barroso G. (eds). *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushrooms Products*, vol. 1. Págs. 7-15.

30 Steinbuch E., 1978. Factors affecting the quality and shrinkage losses of processed mushrooms. *Mushroom Science* X, 759-766.

Velcko A.J., *et al.*, 2004. Expression of novel genes in *Agaricus bisporus* using an *Agrobacterium*-mediated transformation technique. *Mushroom Science* XVI, 591-597.

35 Xu J. *et al.*, 1993. Localization of the mating type gene in *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 9, 3044-3049.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SOMYCEL

5 <120> NUEVAS CEPAS DE HONGOS DE *AGARICUS BISPORUS* HÍBRIDAS

<130> B71654D34403

<150> Documento EP 15305073.7

10 <151> 23-01-2015

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 1114

<212> ADN

<213> artificial

20 <220>

<223> Alelo 1 de P1N150

<220>

25 <221> misc\_feature

<223> Alelo 1 de P1N150

<220>

30 <221> misc\_feature

<222> (1114)..(1114)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 1

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| taaccgagac tgtgctctcg taccaagcaa cctgggaatc accctgattt gcgttcattt  | 60  |
| taactagatt agctgccatc tcaattcggg cggtcaaagg cacgtactct tctcgtatct  | 120 |
| tttctccctt cgtcacgaga gcgctatact ctcgtcgaga cagaccatct agcagattcc  | 180 |
| ctatcaaatt actgtagcat tgctcccaag ttgtatacca gccattcctc tgacgcgttg  | 240 |
| ctccacaaaa agtcggaacc tcaaacccaa agccctcgtg gctcttgtag tgatgtaact  | 300 |
| cagttgccag cctcttcgct agaagatcgg aggcacccga agacagaggc gccatatcct  | 360 |
| tgtattccga aacaaagaaa ggcgtcccat cttcaccgtt accgtaggca atcatcctca  | 420 |
| gtaaaaagag ttttcaggca ttttcgggta tctcaggccc tgaacatagg ctgagaattg  | 480 |
| tcctctttct cgaacaatgc gagaacatga tcagccaaag ttcaggcaag ttgctttaaa  | 540 |
| tataatacat ttgttgggcc aagctcaggc tgtgttcagg catcgttcaa ggtgtaagaa  | 600 |
| cttcaactgt caccgacctt cagggtgcca atcgacccta aatcgaccct aaatcagcct  | 660 |
| gcattatcca gaattacgtt gaattgacct ggattagcct gatagatcct gataatatct  | 720 |
| tttactgaga atcatcgctg gcgcaagccc aggagctgcg gtacctatgg cttcgagtga  | 780 |
| tcgcgccttcg ccaagatact gctcagactc cgacggcgat cctgatttca cgaaatacgt | 840 |
| ttgaccagtt gatgactgaa ccttggggaag atttccggtg aactgagcat ctggatcgat | 900 |

# ES 2 929 896 T3

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | gctttgcaga ttttcgagta tgatacgagg tagcattgga attgggaaag gtttagaatt  | 960  |
|    | tctcaccgcg gagctccgga tcgtgctaataaatagtgacg tcagtgaacc tatcacggca  | 1020 |
|    | gtccgtcgtc gaactttggt cgaaccgaca ttccacgttt cccatccagt tctttttttc  | 1080 |
|    | atcccatgct gacaaatagc cgtggtccaa cacn                              | 1114 |
|    | <210> 2                                                            |      |
|    | <211> 877                                                          |      |
| 5  | <212> ADN                                                          |      |
|    | <213> artificial                                                   |      |
|    | <220>                                                              |      |
|    | <223> Alelo 2 de P1N150                                            |      |
| 10 | <220>                                                              |      |
|    | <221> misc_feature                                                 |      |
|    | <223> Alelo 2 de P1N150                                            |      |
| 15 | <220>                                                              |      |
|    | <221> misc_feature                                                 |      |
|    | <222> (1)..(1)                                                     |      |
|    | <223> n es a, c, g, o t                                            |      |
| 20 | <220>                                                              |      |
|    | <221> misc_feature                                                 |      |
|    | <222> (5)..(5)                                                     |      |
|    | <223> n es a, c, g, o t                                            |      |
| 25 | <220>                                                              |      |
|    | <221> misc_feature                                                 |      |
|    | <222> (876)..(877)                                                 |      |
|    | <223> n es a, c, g, o t                                            |      |
| 30 | <400> 2                                                            |      |
|    | ncaangcttg ccctggaatc atagtcaaga aargggacat aatcgagact gtactctcgt  | 60   |
|    | accaagcaac ctgggaatca ccctgatttg cgttcatttt aactagatta gctgccatct  | 120  |
|    | caattcggtc ggtcaaaggc acgtactttt ctcgatatctt ttctcccttc gtcacgagag | 180  |
|    | cgccatactc tcgtcgagac aggccatcta gcagattccc tatcaaatta ctgtagcatt  | 240  |
|    | gtccccaagt tgtataaccag ccattcctct gacgcgttgc tccacaaaaa gtcggaacct | 300  |
|    | caaaccctc ggcctcgttg ctcttgtagt gatgtaactc agttgccagc ctcttcgcta   | 360  |
|    | gaagatcaga ggcacccgaa gacagaggcg ccatatcctt gtattccgaa acaaagaaag  | 420  |
|    | gcattccatc ttaccggtta ccgtaggcaa tcatcgctgg cgcaagccca ggagctgcgg  | 480  |
|    | tacctatggc ttcgagtgat cgcgcttcgc caagatactg ctgagactcc gacggcgatc  | 540  |
|    | ctgattttcac gaaatacgtt tgaccagtcg atgactgaac cttgggaaga tttccggtga | 600  |
|    | actgagcatc tggatcgatc ctttgcagat tttcgagtat gatacgaggt agcattggaa  | 660  |
|    | ttgggaaagg tttggaattt ctaccgcgg agctccggat cgtgctaata atagtgcgt    | 720  |
|    | cagtgaacct atcacggcag tccgtcgtcg aactttggtc gaaccgacat tccacgtttc  | 780  |
|    | ccatccagtt atttttttca tcccatgctg acaaatagcc gtggtccaac acctataaaa  | 840  |
|    | acgacctcgc tcagcatgcg cttctgacat gtcacnn                           | 877  |
|    | <210> 3                                                            |      |
| 35 | <211> 545                                                          |      |
|    | <212> ADN                                                          |      |

<213> artificial

<220>  
<223> Alelo 3 de P1N150

5 <220>  
<221> misc\_feature  
<223> Alelo 3 de P1N150

10 <400> 3  
 atgaaaataa ctggatggga aacgtggaat gtcgggttcga ccaaagtctg acgacggact 60  
 gccgtgatag gttcactgac gtcattatta ttagcacgat ccggagctcc gcggtgagaa 120  
 attccaaacc tttcccaatt ccaatgctac ctcgatcat actcgaaaat ctgcaaagga 180  
 tccatccaga tgctcagttc accggaaatc ttcccaaggt tcagtcatca actggtcaaa 240  
 cgtatttcgt gaaatcagga tcgccgtcgg agtctgagca gtatcttggc gaagcgcgat 300  
 cactcgaagc cataggtacc gcagctcctg ggcttgccgc agcgatgatt gcctacggta 360  
 acggtgaaga tgggatgcct ttctttgttt cggaatacaa ggatatggcg cctctgtctt 420  
 cgggtgcctc tgatcttcta gcgaagaggc tggcaactga gttacatcag tacaagagcc 480  
 acgagggcct tgggtttgag gttccgactt tttgtggagc aacgcgtcag aggaatggct 540  
 ggtat 545

<210> 4  
<211> 598  
<212> ADN  
<213> artificial

15 <220>  
<223> Alelo 4 de P1N150

20 <220>  
<221> misc\_feature  
<223> Alelo 4 de P1N150

25 <400> 4  
 tcccaagttg tataaccagcc attcctctga cgcgtcgctc cacaaaaagt cggaacctca 60  
 aatccaaagc cctcgtggct cttgtactga tgtaactcag ttgccagcct cttcgctaga 120  
 agatcagagg caccgaaga caaaggcgcc atattcttgt attccgaaat aaagaaaggc 180  
 gcccacatctt caccgttacc gtaggcaatc atcgctggcg caagcccagg agctgcggta 240  
 cctatggcct cgagtgatcg cgcttcgccca agatactgct cagactccga cggcgatcct 300  
 gatttcacga aatacgtttg accagttgat gactgagctt tgggaagatt tccggtgaac 360  
 tgagcatccg gatcgatcct ttgcagattt tcgagtatga tacgaggtag cattggaatt 420  
 gagaaaggtt tggaatttct caccgcggag ctccgatcg tgctaataat agtgacgtca 480  
 gtgaacctat caccgcagtc cgtcgtcgaa ctttgggtcaa accgacattc cacgtttccc 540  
 atccagtact ttttttcac ccatgctgac aaatagccgt agtccaacac ctataaaa 598

<210> 5  
<211> 558  
<212> ADN  
<213> artificial

30 <220>

<223> P1N150 Alelo 7

<220>

<221> misc\_feature

5 <223> P1N150 Alelo 7

<400> 5

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| aatccaaagc cctcgtggct cttgtactga tgtaactcag ttgccagcct cttcgctaga | 60  |
| agatcagagg caccgaaga caaaggcgcc atattcttgt attccgaaat aaagaaaggc  | 120 |
| gccccatctt caccgttacc gtaggcaatc atcgctggcg caagcccagg agccgcggta | 180 |
| cctatggcct cgagtgatcg cgcttcgcca agatactgct cagactccga cggcgatcct | 240 |
| gatttcacga aatacgtttg accagttgat gactgagctt tgggaagatt tccggtgaac | 300 |
| tgagcatccg gatcgatcct ttgcagattt tcgagtatga tacgaggtag cattggaatt | 360 |
| ggtaaagggt tggaatttct caccgggag ctccggatcg tgctaataat agtgacgtca  | 420 |
| gtgaaactat caccggcagtc cgtcgtcgaa ctttggtaa accgacattc caggtttccc | 480 |
| atccagttct tttttccatc ccatgctgac aaatagccgt agtccaacac ctataaaaac | 540 |
| gacctcgaat ccaaagcc                                               | 558 |

10 <210> 6

<211> 18

<212> ADN

<213> artificial

15 <220>

<223> cebador directo

<400> 6

aggcrycca tottcasc 18

20

<210> 7

<211> 17

<212> ADN

<213> artificial

25

<220>

<223> cebador inverso

<400> 7

30 gttcgacgac ggactgc 17

<210> 8

<211> 19

<212> ADN

35 <213> artificial

<220>

<223> cebador directo

40 <400> 8

tccgtaggtg aacctgcgg 19

<210> 9

<211> 20

45 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador inverso

<400> 9  
 tctccgctt attgatatgc 20  
 5 <210> 10  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 10 <220>  
 <223> cebador directo  
 <400> 10  
 aytcrcaama acataccttc aac 23  
 15 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> cebador inverso  
 <400> 11  
 cattcggcga ttttctca 18  
 25 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador directo  
 35 <400> 12  
 gacgatgcgg gactggtgga t 21  
 <210> 13  
 <211> 23  
 40 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador inverso  
 45 <400> 13  
 ggtctggcct acrggagtgt tgt 23  
 <210> 14  
 <211> 23  
 50 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 55 <223> cebador directo  
 <400> 14  
 ccgccagcac aaggaaatcaa atg 23  
 60 <210> 15  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 65 <220>  
 <223> cebador inverso

<400> 15  
tcagtcggcc ctcaaaacag tc 22

5 <210> 16  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> artificial

10 <220>  
<223> cebador directo

<400> 16  
tcgggtgggt gcaactgaaa ag 22

15 <210> 17  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> artificial

20 <220>  
<223> cebador inverso

<400> 17  
25 ttccttccg ccttaattgt ttct 24

## REIVINDICACIONES

1. Cepa híbrida de *Agaricus bisporus* que presenta la cepa J10117 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4950, como primer progenitor y una cepa blanca de *Agaricus bisporus* como un segundo progenitor, seleccionándose dicha cepa híbrida en el grupo que consiste en:

- LB811, que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4945,
- LB906 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4946, y
- derivados de las mismas, en la que dichos derivados son híbridos de *Agaricus bisporus* que comprenden todos los marcadores moleculares SSR y/o las secuencias alélicas de P1N150 del híbrido LB811 que se ha depositado con el número de registro de CNCM I-4945 o del híbrido LB906 que se ha depositado con el número de registro de CNCM I-4946 o del híbrido J10117 que se ha depositado con el número de registro de CNCM I-4950,

en la que las combinaciones alélicas de P1N150 para LB811, LB906 y J10117 son las de la tabla 17,

y en la que los marcadores moleculares SSR para LB811, LB906 y J10117 son los de la tabla 15bis,

en la que dicha cepa híbrida presenta un rendimiento de preparación de conserva mejorado, definiéndose el rendimiento de preparación de conserva mejorado como un rendimiento de preparación de conserva superior, que es estadísticamente significativo a  $P < 0.05$  o  $P < 0.01$ , en comparación con el hongo a partir de una cepa de *Agaricus bisporus* A15 comercial de control.

2. Cepa híbrida de *Agaricus bisporus* según la reivindicación 1, en la que dichos derivados son células obtenidas a partir de dicha LB811 o de dicha LB906 mediante selección somática, selección en cultivo tisular, germinación de spora única, germinación de múltiples esporas, apareamientos entre micelios obtenidos a partir de esporas homocariotas o heterocariotas de estos híbridos, autofecundación, apareamiento repetido de vuelta al cultivo inicial, mutagénesis, conversión de rasgos, conversión de rasgos introgresivos, endogamia o transformación.

3. Cepa híbrida de *Agaricus bisporus* LB811, que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4945.

4. Cepa híbrida de *Agaricus bisporus* LB906 que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARÍS Cedex 15 el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4946.

5. Cultivo de hongo híbrido de *Agaricus bisporus* que comprende el híbrido de *Agaricus bisporus* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Producto que incorpora el cultivo según la reivindicación 5, en el que dicho producto se selecciona de entre el grupo que consiste en: micelio, blanco de hongo, inóculo, inóculo de cobertura y sustratos colonizados que incluyen grano, compost y materia particulada friable.

7. Homocariones obtenidos a partir del híbrido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o a partir del cultivo de hongo híbrido según la reivindicación 5.

8. Célula del cultivo de *Agaricus bisporus* según la reivindicación 5.

9. Hongo producido haciendo crecer una cosecha de hongos a partir del cultivo según la reivindicación 5.

10. Método de producción de hongos híbridos, comprendiendo dicho método:

- a) inocular un medio de crecimiento de hongo con un híbrido de hongo *Agaricus bisporus* híbrido según las reivindicaciones 1 a 4,
- b) mantener dicho medio de crecimiento inoculado en condiciones conducentes a la fructificación de hongo y
- c) recolectar hongos de dicho medio de crecimiento.

11. Método de producción de descendencia del cultivo de hongo híbrido según la reivindicación 5, que comprende las etapas de:

- 5           a) obtener esporas a partir de dicho cultivo de hongo híbrido,
- b) hacer germinar dichas esporas,
- c) transferir cultivos a partir de esporas en germinación a nuevos medios de crecimiento.

12. Procedimiento de producción de un nuevo cultivo de hongo híbrido, que comprende aparear el homocarión según la reivindicación 8 o el híbrido según las reivindicaciones 1 a 4 con un segundo homocarión o heterocarión de *Agaricus bisporus*.

13. Cepa híbrida de *Agaricus bisporus* J10117, que se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cedex 15, el 20 de enero de 2015, con el número de registro de CNCM I-4950.

14. Método de producción de una cepa de *A. bisporus* que produce hongos con rendimiento de preparación de conserva mejorado que comprende las etapas de

- 20           i. proporcionar material de propagación de una cepa híbrida de *A. bisporus* según la reivindicación 1;
- ii. hacer crecer dicho material y recuperar un material de reproducción a partir del mismo;
- 25           iii. cruzar el material de reproducción obtenido en ii) con el material de reproducción de una cepa de *A. bisporus* que no presenta el rasgo de rendimiento de preparación de conserva aumentado,
- iv. hacer crecer el material de propagación obtenido a partir del cruce y cosechar el material de propagación a partir de ahí y
- 30           v. hacer crecer hongos a partir del material de propagación cosechado bajo iii) y seleccionar una cepa de hongos que produce hongos con rendimiento de preparación de conserva mejorado, en el que el rendimiento de preparación de conserva mejorado se define como un rendimiento de preparación de conserva superior, que es significativo estadísticamente a  $P < 0.05$  o  $P < 0.01$ , en comparación con el hongo a partir de una cepa de *Agaricus bisporus* A15 comercial de control.

35

Figura 1

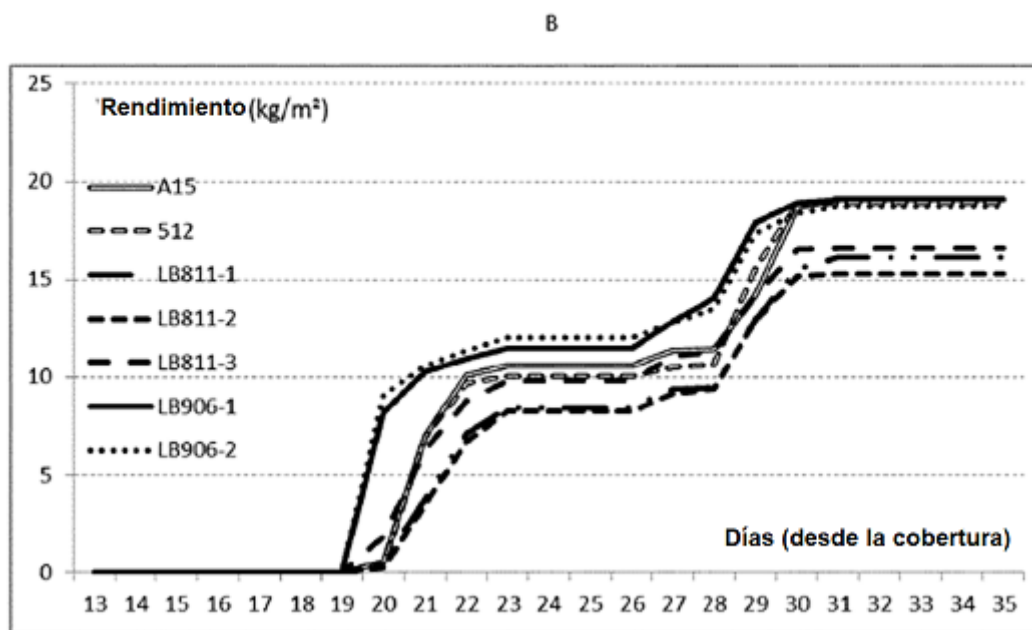
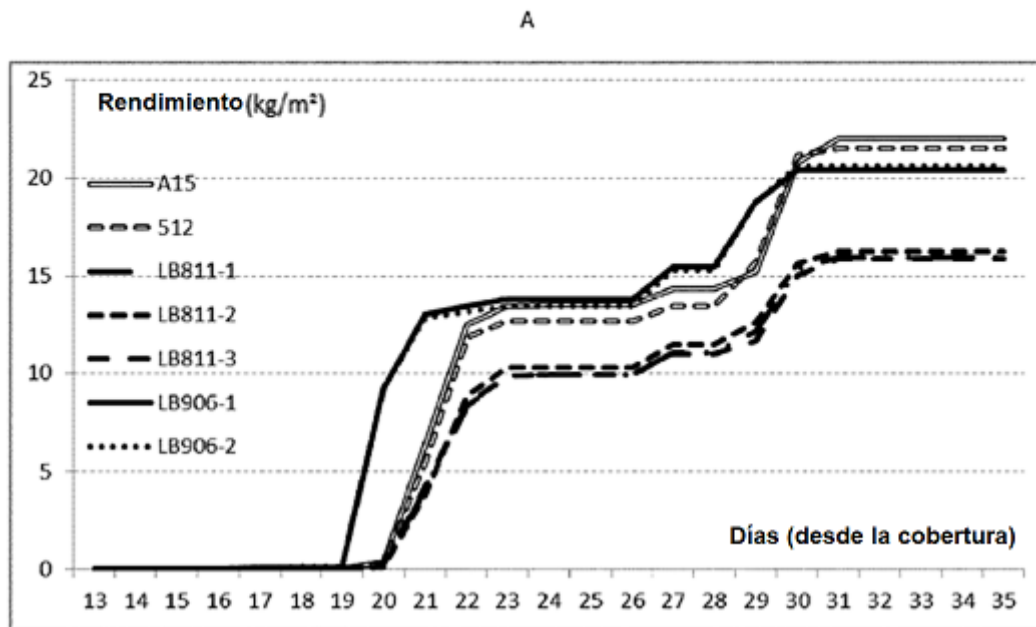
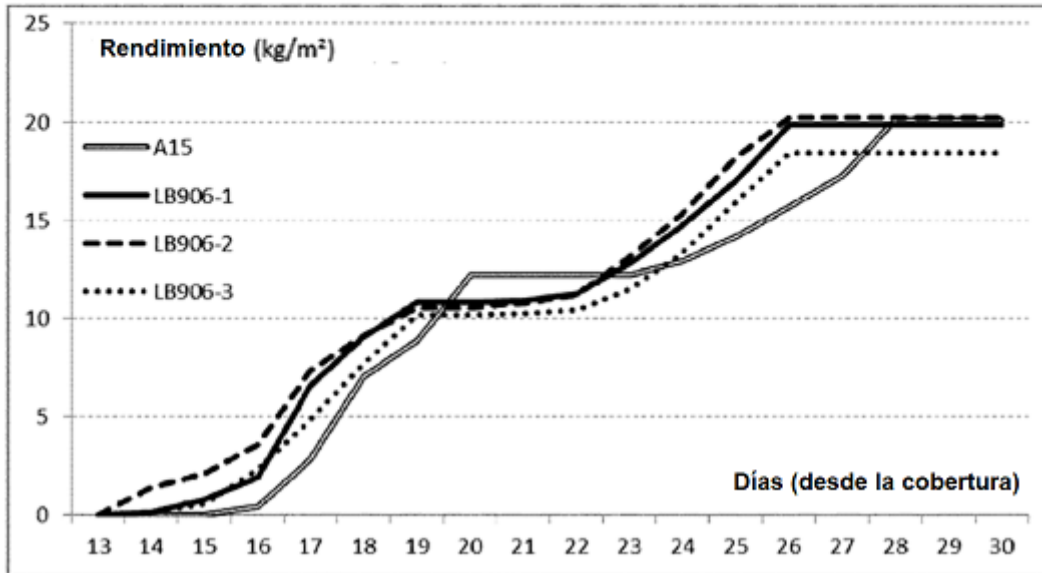


Figura 2

A



B

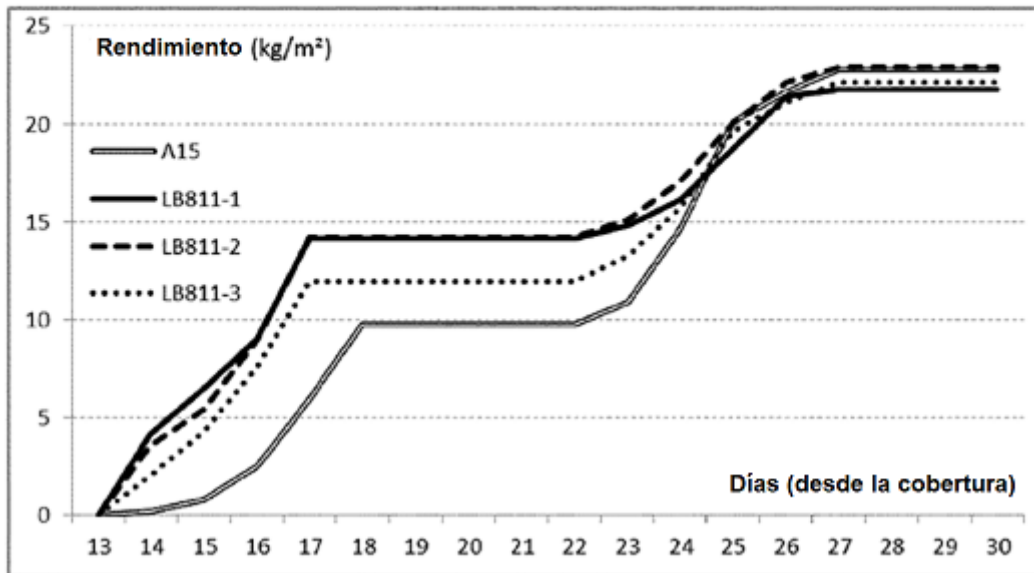
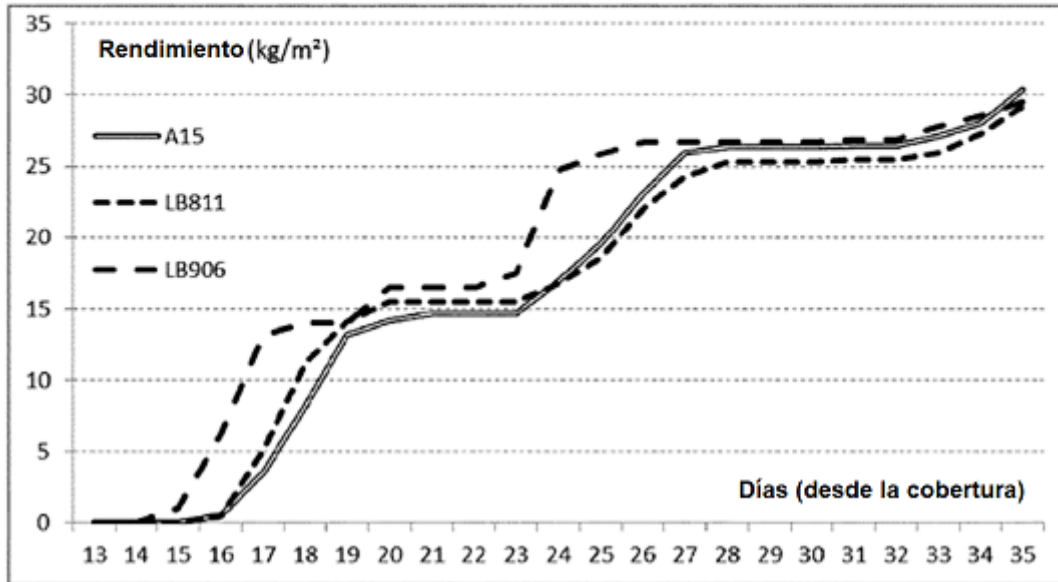


Figura 3

A



B

