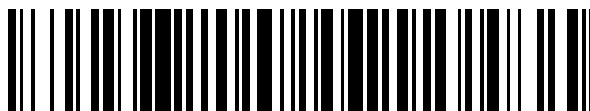


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 196**

51 Int. Cl.:

A01H 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2006 PCT/US2006/030436**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.02.2007 WO07019306**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2006 E 06789401 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 1993350**

54 Título: **Champiñones marrones para producción comercial**

30 Prioridad:

04.08.2005 US 705862 P
03.11.2005 US 267043

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2016

73 Titular/es:

AMYCEL, INC. (100.0%)
260 Westgate Drive
Watsonville, CA 95076 , US

72 Inventor/es:

ROBLES, CHRISTOPHER, WILLIAM y
LODDER, STEPHEN, CHRISTOPHER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 588 196 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

Champiñones marrones para producción comercial

5 Antecedentes de la invención

La variedad cultivada “botón blanco” de *Agaricus bisporus*, conocida como *A. bisporus* (Lange) Imbach (sin. *A. brunnescens* Peck), es la especie de champiñón en cultivo predominante en el mundo hoy en día. Después de muchos años en los que la venta de champiñones comerciales en los Estados Unidos estaba restringida principalmente a los champiñones *A. bisporus* botón blanco, ha habido una tendencia reciente al aumento de las ventas de los champiñones *A. bisporus* marrones de diversos tipos y de otras cepas así llamadas exóticas (otras especies que no sean *A. bisporus*), dado que tales champiñones tienen un sabor aumentado en comparación con el sabor insípido de los champiñones botón blanco. Sin embargo, muchos de estos champiñones de sabor más sabroso y exótico son difíciles de producir de forma comercial o solo pueden recolectarse en la naturaleza. Por ejemplo las setas Enoki, también denominadas enokitake (*Flammulina velutipes*), originadas en Japón en donde se recogían en la naturaleza, aunque en los Estados Unidos se cultivan sobre troncos de árboles vivos o muertos, raíces de árboles o ramas que se han recubierto de tierra. Las setas Shiitake (*Lentinus edodus*), también conocida como setas del bosque negro japonesas, se han cultivado comercialmente y están ampliamente disponibles en los supermercados así como en los mercados asiáticos ya sea frescas o secas, aunque su producción comercial es más difícil que la de *A. bisporus*, que crece en camas que se recolectan fácilmente. Recolectadas originalmente durante por lo menos dos mil años de árboles de madera dura en su país nativo, las shiitake con frecuencia se cultivan sobre leños artificiales hechos de serrín. La cagarria (*Morchella esculenta*), también conocida como colmenilla o morilla, se recoge en la naturaleza en zonas boscosas en primavera. Los escandinavos se refieren a la cagarria como “trufas del norte”. El rebozuelo (*Cantharellus cibarius*) crece en la naturaleza en el Pacífico Noroccidental en bosques de pinos y árboles caducifolios. Las trufas (*Tuber aestivum*), quizás el hongo más famoso del mundo y ciertamente el más caro, son hongos que crecen bajo tierra en zonas boscosas. Nunca se los ha cultivado de forma satisfactoria y buscarlos en la naturaleza es un desafío. Solo pueden localizarse con perros o cerdos que se han entrenado especialmente para reconocer el aroma de la trufa. Las trufas negras de Francia, conocidas como trufas de Perigord, son mejor conocidas por dar sabor al paté de *foie gras*. También están disponibles las trufas blancas de Alba, una región de Italia.

Como debería ser obvio a partir de la descripción anterior, la producción comercial de muchas cepas exóticas es difícil. Esta dificultad en la producción comercial se ha superado, en parte, mediante el desarrollo de cepas de *A. bisporus* con colores, aspectos y sabores similares que puedan utilizarse como reemplazo de las cepas de setas exóticas o silvestres descritas anteriormente (véase, por ejemplo, el documento US 2004/0144020). El consumidor exigente puede apreciar estas cepas de *A. bisporus* “exóticas” sin dejar de ser capaz de la producción en los procesos comerciales convencionales desarrollados para la producción de *A. bisporus*. Crimini (o cremini) es una cepa de *Agaricus bisporus*, similar a las cepas de champiñones *A. bisporus* blancas familiares encontradas en la mayoría de las tiendas de comestibles, pero que tiene color pardusco y es de textura más densa, con un pronunciado sabor a tierra. Las portabellas (que también se escribe portobellos), que sólo han estado ampliamente disponibles desde los 80, a veces se cree que es una cepa italiana de champiñones, pero realmente son criminis grandes que se han dejado crecer durante periodos de tiempo más prolongados. Debido al tiempo de crecimiento más prolongado, las portabellas tienen un sabor terroso agrio distintivo y textura carnosa, y en años recientes se ha visto un uso creciente, con frecuencia como sustituto de la carne en platos vegetarianos, además de utilizárselas en guarniciones o salsas por su sabor distintivo.

Las cepas blanca y marrón de *Agaricus bisporus* - que son variedades de la misma especie - tienen la misma genética compleja y biología inusual. *A. bisporus* produce predominantemente dos esporas por basidio, a diferencia de la mayoría de los hongos basidiomicetos que producen cuatro esporas por basidio. Con cuatro esporas por basidio, cada espora recibe uno de los cuatro núcleos haploides producidos por meiosis y germina para formar un micelio haploide (un homocarion). En *A. bisporus*, cada una de las dos esporas normalmente recibe dos núcleos post meióticos denominados como “a” y “b”. Hay buena evidencia (Evans H. J., en *Chromosoma* 10 115-135 (1959)); Summerbell, R. C., Castle, A. J., Horgen, P. A. y Anderson, J. B. en *Genetics* 123 293-300(1988)) de que las esporas de *A. bisporus* obtenidas de los basidios de dos esporas preferentemente contienen núcleos de tipo sexual complementario. Estas esporas germinan para producir micelio diploide auto fértil conocido como heterocarion, que contiene los dos núcleos a y b. Este heterocarion auto fértil puede, en las condiciones ambientales correctas, experimentar varios ciclos de fructificación denominados comúnmente como “oleadas” (*breaks*). Una cosecha de champiñones comprende el rendimiento total de varias oleadas sucesivas.

Además de las esporas autofértiles, se producen esporas no auto fértiles viables en una tasa del 1 al 20 %. Estas esporas homocarióticas se generan a partir de basidios con tres y cuatro esporas aberrantes. El micelio homocariótico obtenido de estas esporas puede utilizarse para el cruce controlado que es el fundamento de la reproducción de *A. bisporus*. El programa de reproducción tradicional de *Agaricus* utiliza el hecho de que los homocariones crecen de forma más lenta que los heterocariones. Esto permite la exploración de parentales adecuados en grandes poblaciones de esporas, los cuales pueden utilizarse después en cruces controlados (Kerrigan, R. W., Baller, L. M., Horgen, P.A. y Anderson, J. B), en *Mycologia* 84 575-579(1992). G. Fritsche utilizó de forma satisfactoria esta estrategia (descrita en *The Mushroom Journal* 122 49-53 (1983) y en *Genetics and Breeding of Agaricus*, Capítulo 1, 3-20, Pudoc (1991)) para

desarrollar las cepas U1 y U3. Desde su aparición en 1983 estas cepas han dominado la industria, ya sea como U1, como U3 o como derivados vendidos en todo el mundo por numerosas empresas de micelio en grano (*spawn*) (Castle, A. J., Horgen, P. A. y Anderson, J. B., en *Applied and Environmental Microbiology* 53 816-822 (1987); Loftus, M. G., Moore, D. y Elliott, T. J., en *Theoretical and Applied Genetics* 76 712-718 (1988)).

Estas cepas híbridas U1 y U3 y su progenie típica son los champiñones botón blanco hallados comúnmente en las tiendas de comestibles. Las cepas del champiñón *Agaricus bisporus* marrón del tipo portabella que están actualmente disponibles para el uso comercial incluyen, pero sin limitación, Sylvan SB65, Lambert 800, Lambert 801, Sylvan 295, Amycel 2400 y Amycel Bella. Estas son cepas genéticamente relacionadas de una clase general denominada con frecuencia en la industria como "marrones anticuadas". Cualquier mejora del color, aspecto, sabor y/o de los valores de producción de estas cepas sería comercialmente ventajosos.

Desarrollos recientes en la genética de los champiñones han permitido desarrollar nuevas cepas de champiñones a través del cruce, aunque todavía existe demasiada complejidad en el aspecto genético como para que el cruce de cepas no probadas se produzca de una manera predecible. La mayoría de los cruces iniciales tienen las características de los padres, y así no representan mejoras, o tienen características inesperadas que son menos convenientes que las de las cepas parentales. Sin embargo, una vez que se ha identificado y desarrollado una cepa conveniente, las técnicas de cultivo celular permiten la producción comercial de clones genéticos a través del micelio en grano de champiñones, y la identificación de marcadores genéticos en la nueva cepa permite seguir las características convenientes en su progenie y utilizarlas para seleccionar cepas convenientes para futuros cruces. Por lo menos una cepa nueva de champiñones ha sido materia objeto de una patente de plantas de Estados Unidos (N.º Planta 7.636), mientras que se han expedido patentes de utilidad sobre cepa específicas con características mejoradas (por ejemplo, patentes de Estados Unidos N.º 4.996.390, 5.304.721 y 5.832.659).

Todas las cepas marrones disponibles comúnmente para la venta en los Estados Unidos son genéticamente idénticas, excepto el híbrido Sylvan 600 (sin. X618). Existen varias ventajas en la introducción de mayor diversidad genética en la producción de champiñones marrones comerciales. La homogeneidad genética de los cruces marrones comerciales es especialmente problemática si aparece un patógeno de cultivos nuevo que provoque pérdidas devastadoras de cultivos. Dado que aproximadamente todas las cepas marrones comerciales son idénticas, ellas se verían igualmente afectadas.

Adicionalmente, el color del sombrero es una de las características físicas económicas más importantes de las cepas de *A. bisporus*. Todas las cepas marrones de *A. bisporus* actualmente disponibles tienen (más o menos) en general el mismo tono marrón, y el desarrollo de cepas marrones que tengan un color más oscuro sería económicamente ventajoso.

Por consiguiente, existe una necesidad de nuevas cepas de champiñones que tengan diversidad genética, así como aspecto, sabor y/o características de producción mejorados que superen a las de los champiñones portabella existentes. Mediante la introducción de germoplasma de champiñones silvestres en cepas de champiñones comerciales, los autores han desarrollado un nuevo linaje de reproducción. Los productos del linaje de los inventores proporcionan champiñones marrones de las variedades portabella y crimini que tienen buen sabor y aspecto, así como valores de producción excelentes.

Breve resumen de la invención

Es un objetivo de la invención proporcionar variedades marrones del champiñón *Agaricus bisporus* con características comerciales mejoradas con respecto a los champiñones comerciales marrones existentes. Concretamente, es un objetivo de la invención proporcionar champiñones que tengan una o más (más preferentemente todas) de las siguientes características (con respecto a *Agaricus bisporus* marrón que se está comercializando ahora):

- Productividad aumentada
- Más oscuros, color del sombrero más atractivo
- Sombrero más grueso
- No compatibilidad con cepas existentes o antagonismo con cepas existentes (barrera de enfermedad genética).

Estos y otros objetivos de la invención se han logrado proporcionando una cepa híbrida del champiñón *Agaricus bisporus* obtenida mediante el cruce de un champiñón de la cepa silvestre AA-0096 con una segunda cepa *Agaricus bisporus*, concretamente la cepa intermedia 4x29, en la que el champiñón de la invención (1) tiene (a) por lo menos una característica genética de la cepa silvestre AA-0096 no presente en la segunda cepa de *Agaricus bisporus* y (b) por lo menos una característica genética de la segunda cepa de *Agaricus bisporus* no presente en la cepa silvestre AA-0096 y (2) ya sea (a) tenga por lo menos una característica física seleccionada del grupo que consiste en color del sombrero, grosor del sombrero y productividad que sea estadísticamente mejor que la característica física correspondiente de la cepa de comparación Amycel 2400 y (b) sea genéticamente no compatible con la cepa de

comparación Amycel 2400.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se originó en un programa de reproducción que cruzó champiñones obtenidos de las cepas comerciales de *Agaricus bisporus* con cepas de champiñones silvestres. La cepa de champiñón silvestre específica que con el tiempo se encontró que proporciona las características genéticas deseadas se conoce como AA-0096. Esta cepa silvestre se describió anteriormente en la bibliografía científica debido a su genética exclusiva. La cepa AA-0096 también es conocida como BP-1 y ARP-023 y está disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) con el número de registro 76562 como un depósito no de patente. Los actuales inventores han re depositado esta cepa bajo el Tratado de Budapest, que rige el depósito de organismos para fines de patente en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md., USA, bajo el n.º de registro de la ATCC PTA-6903 (identificación de los inventores AA-0096, depositada el 3 de agosto de 2005). Se pueden seleccionar cepas de progenie específicas obtenidas cruzando AA-0096 con otras cepas de *A. bisporus* para tener por lo menos una (preferentemente las 4) de las características mejoradas descritas en el presente documento utilizando los procedimientos descritos en el presente documento. Los ejemplos de tales cepas incluyen la cepa BR06, que se describe con más detalle a continuación.

Como resultado del depósito en la ATCC detallado más arriba (y otros depósitos descritos a continuación relativos a realizaciones preferentes), cualquiera puede practicar la actual invención utilizando métodos convencionales de reproducción y/o producción de champiñones, utilizando ya sea las cepas ya depositadas o (en el futuro) los champiñones comerciales obtenidos de la cepa AA-0096 que hayan llegado al mercado, así como son bien conocidos los procesos para la clonación de champiñones a partir de champiñones disponibles en el comercio minorista (como en tiendas de comestibles). Se describe en la presente solicitud los procesos de clonación específicos (que producen cosechas genéticamente idénticas de champiñones) y los procesos de cruces (que producen progenie no genéticamente idéntica) que puedan utilizarse en la práctica de la invención. Por ejemplo, las características genéticas de la cepa preferente BR06 se pueden transmitir a los champiñones clonados sin cambio, o se puede preparar una nueva progenie de la cepa silvestre original que tenga las características comercialmente convenientes detalladas en el presente documento (denominadas como "derivados de AA-0096 comercialmente aceptables") utilizando las técnicas de reproducción generales descritas en el presente documento, y la progenie adicional (así como los cruces posteriores obtenidos de esta progenie) se puede seleccionar por las características comercialmente convenientes enumeradas.

Son bien conocidos los métodos para la producción de cepas de champiñón, ya sea como progenie directa (clones) de una cepa dada o como progenie híbrida por cruce con una segunda cepa. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.304.721, titulada "Method for the Production of High Proportions of Homokaryons in Breeding Stock of the Mushroom *Agaricus bisporus*" y la patente de Estados Unidos N.º 4.996.390, titulada "Novel Interspecific Mushroom Strains", así como numerosas publicaciones en la bibliografía científica, que incluyen Sonnenberg *et al.*, "An Efficient Protoplasting/Regeneration System for *Agaricus bisporus* and *Agaricus bitorquis*," *Curr. Microbiol.*, 17:285-291 (1988); May *et al.*, "Confirmation of Crosses Between Lines of *Agaricus brunnescens* by Isozyme Analysis," *Exp. Mycology*, 6:283-292 (1982); Herbraud *et al.*, "Protoplast Production and Regeneration from Mycorrhizal Fungi y Their Use for Isolation and Mutants," *Can. J. Microbiol.*, 34:157-161 (1988); Loftus *et al.*, "DNA Polymorphisms in Commercial and Wild Strains of the Cultivated Mushroom, *Agaricus bisporus*," *Theor. Appl. Genet.*, 76:712-718 (1988); Elliott, "The Genetics and Breeding of Species of *Agaricus*," en Flegg *et al.*, eds, *The Biology and Technology of the Cultivated Mushroom*, John Wiley and Sons, 1985, pág. 111-139; Castle *et al.*, "Crosses Among Hoynokaryons from Commercial and Wild-Collected Strains of the Mushroom *Agaricus brunnescens* (= *A. bisporus*)," *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:1643-1648 (1988); y Castle *et al.*, "Restriction Fragment Length Polymorphism in the Mushrooms *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*," *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:816-822 (1987).

Estas son simplemente algunas de las numerosas publicaciones en el campo de la producción y reconocimiento de cepas de setas y existen muchas publicaciones equivalentes para quienes estén menos familiarizados con este área de la tecnología y que les gustaría indagar más sobre el material adicional anterior (véase, por ejemplo, las publicaciones citadas en cada una de las patentes u otras publicaciones enumeradas anteriormente). Ahora que por la presente invención se ha colocado en manos de los expertos en la materia de producción de setas el material genético de las cepas recientemente desarrolladas, se puede practicar la invención (incluyendo el desarrollo de cepas progenie procedentes de las cepas parentales depositadas) simplemente utilizando las técnicas de reproducción de setas convencionales. En particular, la progenie de las cepas depositadas se puede preparar simplemente siguiendo los procedimientos mostrados en detalle en los Ejemplos que siguen.

Se analizaron numerosas cepas de champiñones silvestres para determinar si las cepas silvestres de champiñones podrían utilizarse para mejorar las cepas comerciales de champiñones *A. bisporus* marrones, la mayoría sin éxito en producir alguna variedad comercialmente viable. El heterocarion silvestre AA-0096 se ha elegido como una de las cepas de prueba debido a que es muy distinto genéticamente de los cultivares de champiñón comerciales comunes (Callac, P., Biliette, C., Imbernon, M. y Kerrigan, R. W., en *Mycologia* 85 835-851 (1993)). Sin embargo, estas diferencias genéticas la hacen impredecible en cuanto a qué resultados se obtendrían utilizando esta cepa en los intentos para producir cepas marrones comercialmente viables. Por ejemplo, aunque los experimentos realizados por los inventores mostraron que AA-0096 en general tenía buenas características agronómicas cuando se crecía en

condiciones específicas, tenía significativamente menor productividad en comparación con las cepas marrones comerciales en general disponibles cuando se crecen en condiciones convencionales para *A. bisporus*, haciéndola así una candidata poco probable para la producción de una cepa comercial satisfactoria.

5 Estos antecedentes genéticos dificultosos se hicieron incluso más evidentes cuando se prepararon los cruces iniciales de los inventores. Se realizaron varios cruces de prueba entre AA-0096 y las variedades de *A. bisporus* blanca o marrón comerciales. Ninguno de estos cruces de prueba produjo híbridos con características agronómicas aceptables. Todos los cruces entre AA-0096 y las cepas blancas comerciales produjeron champiñones de color crema o tostado, de color demasiado claro para su uso como champiñones marrones. Los cruces entre AA-0096 y los marrones
10 comerciales produjeron híbridos con productividad comercial no aceptable o, en algunos casos, ni siquiera produjeron champiñones. No fue hasta que los inventores cruzaron homocariotes de marrones comerciales y blancas comerciales, creando una "cepa de cruce intermedia", que fueron capaces de producir champiñones más oscuros y más productivos, introduciendo el material genético de AA-0096 a través de un segundo cruce con la cepa de cruce intermedia.

15 Una cepa de champiñón preferente de la invención contiene una mezcla de material genético procedente de la cepa silvestre AA-0096 y de la cepa marrón comercial conocida como Amycel 2400, así como material genético procedente un híbrido blanco comercial (un derivado de U1) que se introdujo mediante la formación de una cepa de cruce intermedia entre las cepas comerciales antes de la introducción de material genético procedente de la cepa silvestre.
20 Esta cepa de cruce intermedia particular, conocida en los ejemplos de los inventores como la cepa 4x29, por sí misma no produce champiñones que sean lo suficientemente oscuros para la producción comercial como un champiñón marrón. Además, la combinación de AA-0096 con la blanca comercial o la marrón comercial, por sí misma no produce cepas comercialmente aceptables. Por lo tanto, antes de la finalización del programa de reproducción no fue obvio que el color del sombrero más oscuro y la productividad aumentada podrían obtenerse a partir del uso de material genético
25 procedente de la cepa AA-0096.

Sin embargo, ahora que el programa de reproducción se ha completado, las características genéticas convenientes de la cepa AA-0096 se pueden incorporar en cepas de champiñones comerciales, formando inicialmente una cepa de cruce intermedia procedente de cualquiera de las cepas de *A. bisporus* blancos comerciales y cualquiera de las marrones comerciales. Después, la cepa de cruce intermedia se cruza adicionalmente con la cepa AA-0096 y las cepas resultantes se seleccionan por propiedades físicas como se describe en el presente documento. Las cepas comerciales de los champiñones de *A. bisporus* blancos o marrones no necesitan depositarse para que los aspectos más amplios de la invención se practiquen, dado que ellas simplemente pueden adquirirse en proveedores y/o minoristas, tal como tiendas de alimentación, y después se pueden cruzar para formar una cepa de cruce intermedia antes del cruce final con la cepa AA-0096. Sin embargo, para hacer posible la preparación de todos los posibles cruces de AA-0096 y la cepa de cruce intermedia específica (4x29) que desarrollaron los presentes inventores (que constituye una realización preferente de la presente invención), la cepa 4x29 también se ha depositado, bajo la normativa del Tratado de Budapest, en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md., USA, N.º de registro de la ATCC N.º PTA-6877 (identificación de los inventores 4x29 *A. bisporus*, depositado el 20 de julio de 2005).

40 Debe reconocerse que los champiñones de la invención son híbridos (equivalente a cruces), dado que se formaron mediante la hibridación de la cepa silvestre AA-0096 con una segunda cepa de *A. bisporus* (con la segunda cepa en algunos casos siendo en sí misma un cruce entre dos cepas comerciales de *A. bisporus*, tal como la cepa 4x29). Por lo tanto, la terminología utilizada en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 20040144020 recientemente publicada (que describe un cruce entre una cepa de *A. bisporus* silvestre distinta y una cepa comercial como siendo un "champiñón híbrido") se aplica igualmente bien a la presente invención. Tales diferencias en la terminología (y en las técnicas específicas utilizadas en esa solicitud) son simplemente indicativas de la diversidad de terminología y técnicas utilizadas en el campo de producción de champiñones.

50 Genética de los champiñones de la invención

Los champiñones dentro del ámbito de la presente invención que reciben el nombre de "clones", se pueden preparar por cualquiera de los procesos conocidos de clonación (así como los que puedan descubrirse en el futuro) a partir de un champiñón de la invención, ya sea a partir de una de las cepas depositadas o a partir de una cepa que sea una
55 progenie de las cepas depositadas. Estos clones se preparan sin un proceso de cruce sexual y tienen las mismas características genéticas y físicas que sus padres. Los champiñones dentro del ámbito de la presente invención que reciben el nombre de "progenie", en lugar de ser clones de los champiñones depositados, son cepas que se han obtenido mediante el cruce con una cepa depositada (por ejemplo, AA-0096 o BR06) o una de su progenie con una segunda cepa de champiñón, y se caracteriza por tener por lo menos una "característica genética" de la cepa de la invención que no esté presente como una característica genética correspondiente de la segunda cepa con la que se ha cruzado. Una "característica genética" es cualquier propiedad del material genético de una cepa de champiñón (habitualmente una secuencia génica) que se puede medir mediante una técnica analítica convencional. Los ejemplos de características genéticas incluyen bandas de RAPD, RFLP, AFLP o SCAR, como aparecen en geles utilizando técnicas analíticas convencionales. Estas técnicas analíticas bien conocidas se describen en numerosas publicaciones científicas, que incluyen las siguientes:

SCAR: Paran, I. y R.W. Michelmore (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993.

RAPD: Khush, R.S., Becker, E. y M. Wach (1992). DNA Amplification Polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Appl. Env Microbiol* 59:2971-2977.

5 RFLP: Castle, A.J., P.A. Horgen y J.B Anderson 1987. Restriction fragment length polymorphisms in the mushrooms. *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*. *Appl Env Microbiol* 53:816-822

AFLP: Mueller UG y Wolfenbarger LL (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol* 14:389-394.

10 Tales características genéticas (y la naturaleza exclusiva de las características genéticas de las cepas de la invención con respecto a las cepas no derivadas de AA-0096) se ejemplifican en las Tablas 1 y 2 de marcadores de RAPD. En la Tabla 1, las cepas que contienen un fragmento genético especificado se indican por un símbolo "+", mientras que las cepas que carecen de este fragmento se indican con un símbolo "-". Siguiendo esta convención, las cepas que comparten una característica genética (que puede ser ya sea la presencia o la ausencia de fragmentos genéticos específicos), tendrán el correspondiente símbolos "+" o "-" (es decir, +/+ o -/-). Se pueden observar varias características de genes distintas (que se muestran cómo un + para una cepa y un - para la otra) en las cepas de la invención con respecto a la cepa Amycel 2400 (una cepa marrón comercial que es uno de los parentales cruzados para fabricar la cepa de cruce intermedia). Se pueden observar diferencias únicas similares con respecto a la cepa de cruce intermedia parental 4x29 que contiene material genético procedente tanto de una cepa comercial marrón como de una blanca. Los fragmentos distintos de los de las cepas parentales 2400 o 4x29 se heredaron del parental AA-0096 y son exclusivos de su progenie. Por ejemplo, en las cepas AA-0096 y BR06 está presente un fragmento de 910pb que no está presente en 4x29 o Amycel 2400. Esta banda es solo una de las muchas bandas características que pueden utilizarse para identificar cepas de la invención.

Tabla 1

	4x29	2400	AA-0096	BR06
OP-C4 ₁₄₀₀	+	+	-	-
OPC-4 ₉₁₀	-	-	+	+
OPC-7 ₁₂₀₀	-	-	+	+
OPC-8 ₅₀₀	-	-	+	+
OPC-8 ₄₅₀	-	-	+	+
OPC-10 ₄₂₀	-	-	+	+
OPC-11 ₇₀₀	-	-	+	+
OPC-11 ₆₀₀	-	-	+	+
OPC-13 ₁₃₀₀	-	-	+	+
OPF-5 ₁₉₀₀	-	-	+	+
OPF-8 ₂₀₀	+	+	-	-
OPF-9 ₂₂₀₀	-	-	+	+
OPF-1 ₁₁₁₀₀	-	-	+	+
OPH-1 ₂₅₀₀	+	+	-	-
OPH-1 ₁₇₀₀	-	-	+	+
OPH-5 ₁₉₀₀	-	-	+	+
OPH-6 ₁₂₀₀	-	-	+	+
OPH-16 ₄₈₀	-	-	+	+
OPH-18 ₁₄₀₀	-	-	+	+
OPH-18 ₁₀₀₀	+	+	-	-
OPL-6 ₁₈₀₀	+	+	-	-
OPL-6 ₂₁₀₀	+	+	-	-
OPL-8 ₁₂₀₀	-	-	+	+
OPJ-4 ₁₅₀₀	-	-	+	+
OPJ-5- ₁₈₀₀	-	-	+	+
OPJ-5 ₁₂₀₀	+	+	-	-
OPJ-7 ₁₈₅₀	-	-	+	+
OPK-1 ₆₉₀	-	-	+	+

OPK-1 ₈₁₀	+	+	-	-
OPK-8 ₉₀₀	-	-	+	+

Tabla 2

Secuencias	
OPC-4	CCGCATCTAC (SEQ ID NO: 0001)
OPC-7	GTCCCGACGA (SEQ ID NO:0002)
OPC8	TGGACCGGTG (SEQ ID NO: 0003)
OPC-10	TGTCTGGGTG (SEQ ID NO:0004)
OPC-11	AAAGCTGCGG (SEQ ID NO:0005)
OPC-13	AAGCCTCGTC (SEQ ID NO:0006)
OPF-5	CCGAATTCCC (SEQ ID NO:0007)
OPF-8	GGGATATCGG (SEQ ID NO:0008)
OPF-9	CCAAGCTTCC (SEQ ID NO:0009)
OPF-11	TTGGTACCCC (SEQ ID NO: 0010)
OPH-1	GGTCGGAGAA (SEQ ID NO:0011)
OPH-5	AGTCGTCCCC (SEQ ID NO:0012)
OPH-6	ACGCATCGCA (SEQ ID NO:0013)
OPH-16	TCTCAGCTGG (SEQ ID NO:0014)
OPH-18	GAATCGGCCA (SEQ ID NO: 0015)
OPJ-4	CCGAACACGG (SEQ ID NO: 0016)
OPJ-5	CTCCATGGGG (SEQ ID NO: 0017)
OPJ-7	CCTCTCGACA (SEQ ID NO: 0018)
OPJ-9	TGAGCCTCAC (SEQ ID NO: 0019)
OPK-1	CATTCGAGCC (SEQ ID NO: 0020)
OPK-6	CACCTTTCCC (SEQ ID NO: 0021)
OPK-8	GAACACTGGG (SEQ ID NO:0022)
OPL-8	AGCAGGTGGA (SEQ ID NO: 0023)

Se pueden observar características genéticas exclusivas similares en los datos de SCAR expuestos en las Tablas 3-6. Por ejemplo, las Tablas 3 y 4 muestran que en la cepa BR06 se encuentra un fragmento de 550 pb, uno de la progenie de AA-0096, así como en la misma AA-0096, utilizando las secuencias de cebadores para R&D#9 descritas en la Tabla 5, pero no se encuentra en Amycel 2400 o Sylvan 600 (cepas marrones comerciales). Por consiguiente, esta secuencia se puede utilizar en el proceso de identificación de la progenie de AA-0096. Del mismo modo, cualquiera de los marcadores de la serie R&D exclusivos para AA-0096 identificados en las tablas en el presente documento se puede utilizar para identificar la progenie de AA-0096 cruzada con 4x29, y diferenciarlas de Amycel 2400, otras cepas marrones comerciales, o de futuras cepas de champiñones marrones creados utilizando programas de reproducción que no impliquen a AA-0096. Del mismo modo, se pueden encontrar fragmentos de genes exclusivos que distingan la progenie de una cepa de champiñón blanco (en el ejemplo de los inventores un derivado de U1), de otras cepas blancas comerciales o de futuras cepas de champiñones blancos creadas utilizando programas de reproducción que no impliquen a AA-0096.

Tabla 3: Variaciones de la cepa marrón comercial Amycel 2400

Marcador	Amycel 2400	BR06	AA-0096
R&D#17	480/450/396	460/450/396	460/450/396
R&D#9	520	550/520/510	550/520/510
R&D#70¹	480/120	500/290/120	500/290/120
R&D#55²	490/300/200/60	490/450/300/200/60	490/ 450 /300/200/60

¹- Para obtener los resultados el producto se cortó con la Enzima de Restricción Hinf I
²- Para obtener los resultados el producto se cortó con la Enzima de Restricción Taq I

Tabla 4: Variaciones de la cepa marrón comercial Sylvan 600

Marcador	Sylvan 600	BR06
R&D#17	480/450/396	460/450/396
R&D#9	510	550/520/510
R&D#70¹	520/510	500/290/120
R&D#55²	200	490/450/300/200/60
¹ - Para obtener los resultados el producto se cortó con la Enzima de Restricción Cfo1 ² - Para obtener los resultados el producto se cortó con la Enzima de Restricción RsaI		

Tabla 5: Secuencia de fragmentos de cebador

	R&D#17	R&D#9	R&D#70	R&D#55
Cebador directo 5'	aggtgcatgctgcctca (SEQ ID NO:0024)	gtcccggtgaccca (SEQ ID NO: 0026)	cctccaagaaaaccact (SEQ ID NO: 0028)	tggtcacagaaggtcctcag (SEQ ID NO:0030)
Cebador inverso 5'	tgggtgggatactcgctgg (SEQ ID NO: 0025)	gccatgagcgatcat (SEQ ID NO: 0027)	attccgagatcaccgaga ID NO: 0029)	cgcatacattccaagagcac (SEQ ID NO: 0031)

Tabla 6: Variaciones de otras cepas marrones comerciales

Marcador	Sylvan SB65	Sylvan 600	Lambert 800	Lambert 801	Amycel 2400	BR06	AA-0096
R&D#17	480/450/396	480/450/396	480/450/396	480/450/396	480/450/396	460/450/396	460/450/396
R&D#9	520	520	520	520	520	550/520/510	550/520/510
R&D#70¹	480/120	480/120	480/120	480/120	480/120	500/290/120	500/290/120
R&D#55²	490/300/ 200/60	490/300 200/60	490/300/ 200/60	490/300/ 200/60	490/300/ 200/60	490/450/300/ 200/60	490/450/300/ 200/60

1- Para obtener los resultados el producto se cortó con la Enzima de Restricción Cfo1

2- Para obtener los resultados el producto se cortó con la Enzima de Restricción Rsa1

La información genética característica identificada como se muestra en el presente documento (o mediante cualquier otra técnica) para otras cepas o especies de setas utilizadas en un programa de cruce se puede utilizar para ayudar a identificar la progenie de las cepas depositadas. En general, cuantas más bandas características estén presentes, más estrechamente la progenie se asemejará al parental. La clase de la primera generación de las cepas progenie obtenidas de AA-0096 en teoría compartirá numerosas características genéticas con AA-0096, lo que será evidente por el análisis de SCAR y el análisis de RAPD. Aunque no se necesiten cruces adicionales para obtener los champiñones de la invención, se pueden llevar a cabo cruces adicionales para añadir otras características genéticas o en un intento por distinguir el linaje de la cepa. Después de varios cruces, pueden estar presentes solo unas pocas bandas características (dependiendo de un proceso de reordenamiento aleatorio durante la meiosis). Las cepas preferentes retienen por lo menos 5, preferentemente por lo menos 10, bandas de RAPD exclusivas procedentes de AA-0096 o por lo menos 2, preferentemente por lo menos 5, bandas características de RFLP o de SCAR.

Aunque los actuales ejemplos describen la comparación de cepas de la invención con la cepa marrón comercial que es uno de sus ancestros a través del programa de cruce descrito en el presente documento, las comparaciones se pueden hacer con cualquier cepa para mostrar las diferencias de la progenie de AA-0096 con esa cepa.

Además de las bandas características asociadas con el material genético obtenido de AA-0096, una cepa de champiñón obtenida cruzando una cepa de la invención con una cepa de la invención con una cepa de champiñón distinta, tendrá características genéticas de la segunda cepa; por ejemplo, la cepa de champiñón, además de tener una banda de RAPD o de RFLP característica obtenida de AA-0096, tendrá por lo menos una banda de RAPD o RFLP en común con la segunda cepa (por ejemplo, Amycel 2400) que no esté presente como una banda de RAPD o RFLP correspondiente procedente de la cepa AA-0096. Estas bandas características serán útiles en la identificación de la segunda cepa que se ha cruzado con una cepa parental de la invención para proporcionar una cepa progenie de la invención.

Selección de la progenie deseada

Cualquier cepa progenie que proceda genéticamente de AA-0096 que conserve una característica comercialmente conveniente de las cepas de la invención, permanece dentro del ámbito de la invención. Tales cepas progenie marrones (con respecto al patrón) puede seleccionarse fácilmente mediante análisis del color del sombrero del champiñón, la medición del grosor del sombrero del champiñón, el antagonismo con la cepa marrón comercial 2400 y la productividad significativamente distintita después del cruce, así como la identificación de características genéticas. Las características comercialmente convenientes se pueden medir cuantitativamente utilizando las siguientes técnicas generales, que se ilustran mediante las técnicas específicas de los Ejemplos que siguen:

- Productividad: fructificar las cepas en un entorno controlado y recoger datos de peso sobre todas los champiñones producidos.
- Color del sombrero: medir el color de los sombreros utilizando un instrumento de análisis de color.
- Grosor del sombrero: medir el ancho del sombrero y dividir por el alto del sombrero para obtener una proporción.
- Antagonismo genético: intento de cruzar la cepa en consideración con cepas marrones y blancas comerciales existentes; las cepas genéticamente antagonistas no producirán cruces viables.

Algunas o todas estas características pueden estar presentes en la progenie de la invención, dependiendo de la clasificación genética. Toda la progenie tendrá bandas genéticas en común con AA-0096 y una o más de estas características físicas.

Color del sombrero

La blancura o el brillo se miden por la capacidad para reflejar todas las longitudes de onda de la luz visible. Siguiendo esta definición, las cepas de champiñón que reflejen menos luz se considerarían más oscuras o menos blancas. Las técnicas de medición específicas se exponen con detalle en los Ejemplos, pero se pueden utilizar también otras técnicas de medición, siempre y cuando se utilice la misma técnica para medir la blancura (oscuridad) de ambas cepas de la invención y la cepa de referencia Amycel 2400. Una dada cepa será suficientemente oscura para considerársela dentro del ámbito de la invención, cuando la cepa tenga una reflectancia de luz blanca significativamente menor que la de la cepa 2400 con un nivel de confianza de por lo menos el 95 % cuando se mide por una única técnica de medición de la reflectancia. El análisis estadístico es mediante técnicas convencionales tales como los descritas en N. M. Downie y R. W. Heath, Basic Statistical Methods, Harper & Brothers, New York, 1959 (véase especialmente el capítulo 12, pág. 123-139, titulado "Testing Difference Between Means"). La cepa 2400 tiene una reflectancia media típica del 60 %. Las cepas de la invención normalmente tienen una reflectancia menor del 58 % (diferencia significativa al nivel de confianza del 95 %), preferentemente menor del 56 %, más preferentemente menor del 54 %.

Productividad aumentada

La productividad de los champiñones se mide comparando las medias del rendimiento de cosecha total expresadas en kilogramos de champiñones producidos por metro cuadrado de superficie en cultivo. Los datos se recogen a lo largo de las tres "oleadas" convencionales del ciclo de crecimiento. Los detalles específicos del cultivo de los champiñones se exponen en los Ejemplos. Las cepas de la invención normalmente producirán lo mismo que 2400 (sin diferencia significativa al nivel de confianza del 95 %), preferentemente tienen un rendimiento que es el 5 % mayor que 2400 (diferencia significativa al nivel de confianza del 95 %), más preferentemente un rendimiento que es el 10 % mayor que 2400 (diferencia significativa al nivel de confianza del 95 %).

Grosor del Sombrero/Forma del Sombrero (FS)

La clase inventada produce champiñones marrones con sombreros gruesos de forma más abombada, proporcionándoles una forma distinta en comparación con Amycel 2400. Las mediciones del sombrero se pueden comparar entre champiñones de la invención seleccionados aleatoriamente y un champiñón marrón comercialmente disponible, tal como Amycel 2400. Los datos de medición normalmente se recolectan a partir de 20-50 champiñones recolectados crecidos y escogidos en condiciones de cultivo específicas y convencionales. La Forma del Sombrero (FS) se puede cuantificar midiendo en primer lugar la altura del sombrero (AS), la distancia desde la parte superior del sombrero adyacente al pie del champiñón hasta la parte superior de las laminillas, y dividiendo este resultado por el diámetro del sombrero (DS).

No compatibilidad

El micelio de cepas de setas compatibles tiene la capacidad de fusionarse entre sí (anastomosarse) y de compartir constituyentes nucleares. La anastomosis también facilita el transporte de nutrientes entre las dos cepas. Las cepas no compatibles se pueden definir como cepas en donde este tipo de fusión micelar no es posible o está reducida; en otras palabras, la anastomosis no puede producirse o está impedida. Se puede llevar a cabo un experimento para cuantificar este fenómeno. Los champiñones convencionales en cultivo utilizan dos sustratos inoculados, compost inoculado o de micelio en grano y cobertura inoculada o "cac" (*compost at casing*). Normalmente, ambos sustratos contienen la misma cepa de champiñón, que cuando se combina e incuba en condiciones de cultivo convencionales producen rendimientos comercialmente aceptables de champiñones. El micelio de la clase inventada, incluyendo BR06, que no es compatible con Amycel 2400 u otras cepas de champiñones marrones comerciales, proporcionarán distintos resultados. La combinación de estas dos cepas en el compost y la cobertura darán como resultado el crecimiento retrasado y menores rendimientos de champiñones, demostrando la no compatibilidad. La falta de anastomosis entre cepas tiene el potencial de limitar la infección y la propagación de enfermedades virales (Kerrigan, R., Mushroom News Volumen 53 Número 14-23 (2005)).

A diferencia de las primeras tres características comercialmente convenientes, en las que las propiedades mejoradas se puede decir que son "mejores" que las propiedades correspondientes de las cepas de referencia (mejores siendo más oscuras, más productivas y gruesas, respectivamente), la no compatibilidad es más que un absoluto: dos cepas son compatibles o no, aunque puede haber distintos grados de compatibilidad como se indica por el ensayo de co-crecimiento descrito en el párrafo precedente. Por consiguiente, aunque la presente invención consigue mejores propiedades comerciales de color de sombrero, productividad y grosor del sombrero en comparación con el patrón, la no compatibilidad se describe mejor como estando simplemente presente, en lugar de ser "mejor". Sin embargo, la resistencia a enfermedades será mejor en muchos casos cuando la enfermedad ataca a unas características del champiñón basándose en la genética de las cepas comerciales de *Agaricus bisporus* marrón actualmente disponibles (y sustancialmente idénticas genéticamente).

Herencia de los marcadores

Los datos de RAPD y SCAR mostrados anteriormente en las tablas muestran claramente la segregación de marcadores en BR06. Los inventores se concentraron en identificar locus heredados de AA-0096, dado que estos locus están ausentes en los champiñones marrones Amycel 2400. Sin embargo, los marcadores mostrados en los ejemplos no son los únicos marcadores que pueden utilizarse para caracterizar las cepas y las cepas progenie de la invención, y no debería considerarse que la invención se limita a los marcadores de ejemplo.

Novedad de las nuevas cepas híbridas

La exclusividad de los nuevos híbridos se muestra mediante los resultados de SCAR y RAPD. BR06 es el producto de un acontecimiento de fusión nuclear (o cruce) exclusivo y ha heredado marcadores de AA-0096 y 4x29. La presente invención, debido a su genética nueva, puede ofrecer resistencia mejorada a patógenos de setas conocidos y emergentes (la importancia de las características genéticas nuevas en proporcionar resistencia a enfermedades se discute en Kerrigan, R., Mushroom News Volumen 53 Número 14-23 (2005)). BR060 es una realización particularmente preferente de la invención y, además de ser representativa de la clase general de la progenie de AA-0096 con características mejoradas, también es representativa de la clase preferente de cruces entre la cepa de cruce intermedia 4x29 y el parental silvestre AA-0096. Todos los cruces entre la cepa de cruce intermedia 4x29 y el

parental silvestre AA-0096 que tengan por lo menos una característica mejorada indicada en el presente documento (preferentemente por lo menos dos, más preferentemente por lo menos 3 y muy preferentemente las cuatro), son miembros de esta clase preferente de cruces.

5 Producción de champiñones comerciales a partir de las nuevas cepas híbridas

Como los champiñones híbridos de la invención siguen siendo cepas de champiñón de *Agaricus Bisporus*, pueden crecerse utilizando procesos de cultivo de champiñones comerciales convencionales que se han desarrollado para *Agaricus bisporus*. Tales procesos son bien conocidos en la industria y no necesitan describirse aquí en detalle. Los ejemplos de técnicas para la producción de champiñones se muestran en numerosas patentes y publicaciones técnicas, incluyendo las citadas en el presente documento, mostrándose también detalles de la producción en los Ejemplos que siguen. En general, el proceso comprende inocular un medio de cultivo de champiñones con una cepa de champiñones de *Agaricus bisporus* híbrida de la invención, mantener el medio de cultivo inoculado en condiciones que conducen a la fructificación del champiñón y recoger champiñones del medio de cultivo después de que hayan alcanzado el nivel de madurez deseado (por ejemplo, para crimini o portabellas).

La invención se describe ahora de forma general, se proporcionan ejemplos específicos mostrando diversas realizaciones de la invención. Sin embargo, la invención no se limita a estas realizaciones específicas.

20 **Ejemplos**

Cepas

Como se indicó anteriormente, las cepas 4x29 y AA-0096 se pueden obtener ahora de la ATCC, junto con la cepa preferente BR06, que se ha depositado bajo las normativas del Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md., USA, N.º de registro de la ATCC PTA-6876 (identificación de los inventores BR06 A. *bisporus*, depositada el 20 de julio de 2005). Se utilizó micelio de la cepa de champiñón AA-0096 procedente de la colección de los inventores; cuando otros reproduzcan la presente invención, esta cepa se puede obtener a través de la ATCC. Se utilizó micelio de la cepa comercial Amycel 2400 (material que proporcionó Amycel, San Juan Bautista, Calif. 94045) y de la cepa comercial 901 (Lambert Spawn Company, PA) en la creación de las líneas de reproducción, incluyendo las cepas de cruce intermedias descritas anteriormente. Entre los ejemplos de las líneas de reproducción producidas mediante este cruce intermedio inicial está la cepa 4x29 utilizada en la preparación de determinadas realizaciones preferentes de la invención.

Todas las cepas se cultivaron, mantuvieron y seleccionaron sobre Agar Compost Lite (CL) a 21 grados C. El Agar CL comprende agar de dextrosa y patata (ADP; Difco) con extracto de levadura al 0,5 % (Sigma) y extracto de compost al 10 %. El extracto de compost se preparó mediante la infusión de volúmenes equivalentes (p/v) de compost de fase II y H₂O. El compost y el agua se autoclavaron dos veces durante 90 minutos y para preparar agar CL se añadió el extracto acuoso. El micelio en grano para champiñón se preparó utilizando granos de centeno inoculados con trozos de 2 cm² de agar CL colonizado. El micelio en grano se creció durante cuatro semanas y se agitó a intervalos bisemanales.

Compost y medios

Los heterocariones se fructificaron sobre compost de champiñón de fase II convencional. El compost se colonizó con micelio en granos de centeno inoculado durante trece a catorce días, con temperaturas de cama en el intervalo 21 °-27 °C y CO₂ entre 5000 y 10000 partes por millón (ppm). Después, las camas se cubrieron con una capa de 5 cm de formulación de cobertura (turba aproximadamente al 75 %/CaCO₃ al 25 %), y las camas recubiertas se rasgaron después de 5 días para estimular el crecimiento del micelio en la capa de cobertura. Dos días después del rasgado se airearon las camas (*flushing*), reduciendo la temperatura del aire a 16 °C y reduciendo el CO₂ a 1000 hasta 1500 ppm. Los champiñones aparecieron aproximadamente dos semanas después del aireado y durante la primera oleada las temperaturas de la cama se mantuvieron a 18°-21 °C. Para cada cosecha, el rendimiento se evaluó utilizando tres oleadas de producción.

Aislamiento de ADN para análisis por PCR

Para el aislamiento de ADN, los cultivos se crecieron en medio líquido MPYFE (Castle *et al.*, 1987) o sobre celofán encima de agar CL. El tejido recolectado se congeló a -70 °C y se liofilizó antes del aislamiento de ADN.

El ADN se preparó a partir de micelio liofilizado. En primer lugar, se molió el tejido liofilizado con una varilla de vidrio y se añadieron 0,6 ml de tampón de extracción de ADN a 65 °C (cloruro de sodio 0,7 M/sulfito de sodio 0,1 M/Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5/EDTA 0,05 M/ SDS al 1 %). Los tubos se mezclaron y colocaron a 65 °C durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 0,6 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y los tubos se mezclaron. Los tubos se colocaron en hielo durante 30 minutos, seguido de centrifugación a alta velocidad (12000 x g) durante 30 minutos.

Los sobrenadantes se colocaron en tubos frescos y se añadieron dos volúmenes de etanol. Después de mezclar, los tubos se centrifugaron a baja velocidad (2000 x g) durante 30 segundos. Los sedimentos se resuspendieron en 200 µl

de agua estéril y se añadieron 100 µl de acetato de amonio 7,5 M. Después, los tubos se mezclaron y se colocaron en hielo durante una hora.

5 A continuación, los tubos se centrifugaron a alta velocidad (12000 x g) durante 30 minutos y las sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos. Se añadió isopropanol (0,54 en volumen), y los tubos se mezclaron por inversión suave. Los sobrenadantes se retiraron y los sedimentos se lavaron con etanol al 70 %. Para finalizar, se retiró el etanol a través de centrifugación y pipeteo, y el ADN se resuspendió en 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5/EDTA 1 mM).

10 Obtención y aislamiento de homocariotes.

10 Todos los homocariotes utilizados en la invención se obtuvieron de homocariotes espontáneos identificados a partir de aislados de esporas individuales (AEI). Las esporas se recogieron a partir de champiñones y se diluyeron en H₂O que contenía Tween 80 al 1 %. La densidad de esporas se calculó sobre un portaobjetos hemocitómetro y las diluciones de esporas se sembraron en placa en ADP.

15 Identificación genética de ADN

20 Para ambos parentales (4x29 y AA-0096), para determinar la naturaleza homocariótica de los aislados de esporas individuales, se utilizaron marcadores de SCAR obtenidos de marcadores de RAPD (Paran, I. y R.W. Michelmore (1993); Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce; Theor. Appl. Genet. 85:985-993)

25 La compatibilidad de los homocariotes de ambas cepas se determinó usando el marcador MAT, utilizando técnicas descritas (Xu J, Kerrigan RW, Horgen PA, Anderson JB (1993) y realizando cruces de prueba.

25 Los homocariotes obtenidos de 4x29 se exploraron por color utilizando L43 SCAR descrito por Loftus, M., L. Bouchti King y C. Robles (2000) Science y Cultivation of Edible Fungi: 201-202.

30 La identificación genética de ADN de las cepas nuevas se determinó mediante análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando marcadores de regiones amplificadas caracterizadas de secuencia (SCAR) y marcadores RAPD. Las técnicas de identificación genética de ADN se adaptaron a partir de las descritas en Khush, R.S., Becker, E. y M. Wach (1992); DNA Amplification Polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*; Appl Env Microbiol 59:2971-2977, y Williams, J.A., Kubeliki, K., Livat, K., Rafalski, J. y S. Tingey. (1991); DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers; Nuclei Acids Research. 18:6531-6535.

35 Champiñones híbridos obtenidos de la cepa AA-0096 (sin. BP1)

40 Se llevaron a cabo experimentos iniciales para determinar si las cepas silvestres de *A. bisporus* podrían utilizarse para mejorar las cepas comerciales, concretamente para mejorar la cepa de *A. bisporus* marrón comercial utilizada para producir las variedades portabella (sin. portabello) y cremini (champiñones marrones no abiertos pequeños). Los productores de micelio en grano para setas de Estados Unidos venden diversas versiones genéticamente idénticas de esta cepa marrón. Para fines comparativos se utilizó la cepa denominada Amycel 2400 como la representante principal de esta clase.

45 El híbrido conocido como 4x29 (también disponible como N.º de acceso de la ATCC PTA-6877) se eligió como la variedad a cruzar con AA-0096 debido a su capacidad de producir champiñones con grosor de sombrero aumentado en comparación con Amycel 2400, un beneficio potencial para el rendimiento de cosecha. El híbrido 4x29 se creó combinando aislados de esporas individuales homocarióticos compatibles de la Amycel 2400 con un aislado de espора individual homocariótico de un híbrido blancuzco comercialmente disponible (la versión actual del híbrido Horst U1).

50 Se recogió un total de 105 aislados de esporas individuales homocarióticos de AA-0096. La constitución nuclear de los aislados se analizó utilizando marcadores de SCAR.

55 Se recogió un total de 250 aislados de esporas individuales homocarióticos de 4x29. La constitución nuclear de los aislados se analizó utilizando marcadores de SCAR. Debido a la naturaleza de este híbrido se emprendieron análisis adicionales utilizando marcadores de SCAR para determinar los locus de color heredados por cada homocariote.

60 Se cruzaron los homocariotes compatibles de AA-0096 y 4x29 y la progenie resultante se exploró por un color de sombrero más oscuro y el rendimiento aumentado. Varios de esta progenie, incluyendo un nuevo híbrido denominado BR06 (N.º de acceso de la ATCC PTA-6876), mostraron sombreros más oscuros y rendimiento aumentado en comparación con la cepa marrón comercial (Amycel 2400).

Datos de rendimiento

65 Se creció una serie de tres cultivos para comparar BR06 con la cepa marrón comercial Amycel 2400. Los cultivos se emprendieron en la Instalación de Prueba Intermedia de Amycel 2400. Ambas cepas se fructificaron en bandejas de

5 champiñones pequeñas de 0,167 m² sobre compost de champiñón de fase II convencional. El compost se colonizó durante 15 días con micelio en grano de centeno inoculado, con temperaturas de cama en el intervalo de 21 °-27 °C y CO₂ entre 5000 y 10000 partes por millón (ppm). Las camas se cubrieron después con una capa de 5 cm de formulación de cobertura (turba a aproximadamente el 75 %/CaCO₃ al 25 %) y las camas recubiertas se rasgaron después de cinco días para estimular el crecimiento del micelio en la capa de cobertura. Tres días después del rasgado las camas se airearon, reduciendo la temperatura del aire a 16 °C y reduciendo el CO₂ a 1000 hasta 1500 ppm. Los champiñones aparecieron aproximadamente dos semanas después del aireado. Los champiñones se recolectaron a lo largo de un periodo de tres semanas y los datos de rendimiento completos se recogieron utilizando un sistema diseñado específicamente para este fin. El rendimiento medio de las dos cepas expresado en kilos de champiñón producido por metro cuadrado para los tres ensayos se resume a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7

	BR06	Amycel 2400
Ensayo n.º1	31,02 ^a	26,57 ^b
Ensayo n.º2	30,93 ^a	25,56 ^b
Ensayo n.º3	32,14 ^a	27,35 ^b
Cualesquiera dos medias que tienen una letra en común no son significativamente distintas en el nivel de significancia del 5 %, utilizando análisis de prueba t convencional.		

15 Como puede observarse a partir de los datos, en cada caso BR06 superó de forma significativa la producción de la cepa Amycel 2400.

Mediciones de color

20 Los datos del color de la superficie de los champiñones se evaluaron con un cromámetro (Konica Minolta BC-10, Osaka, Japón), midiendo los parámetros L* y b*. L* es una variable de brillo y se extiende desde 0 (negro) hasta 100 (blanco). El valor b* representa la cromaticidad grado de amarillo-grado de azul.

25 El diámetro del sombrero de los champiñones de 8-10 cm se recogió de BR06 y Amycel 2400 en la misma fase de cultivo, y las mediciones se tomaron aleatoriamente en la parte superior de los sombreros. Se analizaron 30 valores de L* y b* para cada cepa utilizando el análisis de prueba t convencional (Paquete de Análisis de Datos de Microsoft EXCEL 2000). Los datos se analizan en la Tabla 8.

Tabla 8

	Amycel 2400	BR06
Valor L*	60,15 ^a	56,66 ^b
Valor b*	11,6 ^a	13,64 ^b
Cualesquiera dos medias que tienen una letra en común no son significativamente distintas en el nivel de significancia del 5 %, utilizando análisis de prueba t convencional.		

30 BR06 produjo champiñones que fueron menos brillantes (valor L* menor) y más amarillos (valor b* mayor) que Amycel 2400 marrón comercial.

Forma del Sombrero

35 Se emprendieron 4 experimentos para comparar la Forma del Sombrero (FS) de BR06 frente a Amycel 2400. La Forma del Sombrero es la proporción de la altura del sombrero (AS) y el diámetro del sombrero (DS). En todos los experimentos, se seleccionaron aleatoriamente 40 champiñones de cada tratamiento a partir de las bandejas experimentales pequeñas, se crecieron de acuerdo con las condiciones convencionales de cultivo de champiñones (condiciones resumidas anteriormente en Datos de Rendimiento). En todos los experimentos los champiñones se recolectaron en el mismo momento.

45 Los datos de todos los experimentos anteriores se resumen en la Tabla 9. El análisis estadístico de la proporción de la Forma de Sombrero se completó utilizando Microsoft Excel 2000. Como puede observarse en todos los experimentos, la cepa BR06 produjo champiñones con un valor de Forma de Sombrero más elevado que la Amycel 2400. Las diferencias de la Forma de Sombrero variaron desde 0,02 a 0,05. En la observación, los champiñones que produjo BR06 fueron perceptiblemente más gruesos, y esto se trasladó a los valores obtenidos a través de la medición.

Tabla 9

	BR06	Amycel 2400
Experimento n.º1	0,29 ^a	0,27 ^b
Experimento n.º2	0,26 ^a	0,22 ^b
Experimento n.º3	0,32 ^a	0,30 ^b
Experimento n.º4	0,30 ^a	0,25 ^b
Cualesquiera dos medias que tienen una letra en común no son significativamente distintas en el nivel de significancia del 5 %, utilizando análisis de prueba t convencional.		

No compatibilidad

5 Se completaron dos experimentos para demostrar la no compatibilidad entre BR06 y Amycel 2400. El tratamiento N.º 1 y el tratamiento N.º 3 son los tratamientos no mezclados (misma cepa en el compost y cobertura) y el tratamiento N.º 2 y el tratamiento N.º 4 son los tratamientos mezclados (distintas cepas en el compost y cobertura). Se crecieron 5 bandejas de cada uno de los tratamientos en pequeños cuartos de cultivo, de acuerdo con las prácticas convencionales de cultivo de champiñones (condiciones resumidas anteriormente en Datos de Rendimiento).

10 En el momento del rasgado y el aireado, el crecimiento del micelio del champiñón en la capa de cobertura de las bandejas de los tratamientos mezclados (N.º 2 y N.º 4) estaba enormemente disminuido en comparación con el crecimiento en los tratamientos no mezclados (N.º 1 y N.º 3). Durante la fructificación de los champiñones el número de puntas producidas por los tratamientos mezclados estaba enormemente reducido en los dos tratamientos mezclados (BR06/Amycel 2400 y Amycel 2400BR06) frente a los tratamientos no mezclados

15 Como puede observarse en las tablas, el rendimiento total para los tratamientos mezclados estaba enormemente reducido frente a los tratamientos no mezclados (el rendimiento se expresa como kilogramos de champiñones por metro cuadrado de superficie de cultivo).

20

Tabla 10

	Tratamiento n.º 1	Tratamiento n.º 2
Cepa en el compost	BR06	BR06
Cepa en la cobertura	BR06	Amycel 2400
Experimento N.º 1	31,56 ^a	17,57 ^b
Experimento N.º 2	23,76 ^a	9,05 ^b
Cualesquiera dos medias que tienen una letra en común no son significativamente distintas en el nivel de significancia del 5 %, utilizando análisis de prueba t convencional.		

Tabla 11

	Tratamiento n.º 3	Tratamiento n.º 4
Cepa en el compost	Amycel 2400	Amycel 2400
Cepa en la cobertura	Amycel 2400	BR06
Experimento N.º 1	29,23 ^a	7,55 ^b
Experimento N.º 2	24,05 ^a	10,79 ^b
Cualesquiera dos medias que tienen una letra en común no son significativamente distintas en el nivel de significancia del 5 %, utilizando análisis de prueba t convencional.		

25 La reducción del rendimiento cuando BR06 y Amycel 2400 se mezclan juntas indica una reducción de la anastomosis entre las dos cepas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Amycel, Inc.
- <120> Champiñones marrones para la producción comercial
- <130> SMK/FP6560858
- 35 <140> EP 06789401.4
- <141> 03-08-2006

	<150> PCT/US2006/030436	
	<151> 03-08-2006	
5	<150> US 60/705.862	
	<151> 04-08-2005	
	<140> US 11/267.043	
	<141> 03-11-2005	
10	<160> 31	
	<170> PatentIn versión 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 10	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 1	
25	ccgcatctac	10
	<210> 2	
	<211> 10	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 2	
35	gtcccgacga	10
	<210> 3	
	<211> 10	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
45	<400> 3	
	tggaccggtg	10
	<210> 4	
	<211> 10	
50	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
55	<400> 4	
	tgtctgggtg	10
	<210> 5	
60	<211> 10	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
65	<223> Cebador	

ES 2 588 196 T3

	<400> 5 aaagctgcgg	10
5	<210> 6 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 6 aagcctcgtc	10
15	<210> 7 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador	
	<400> 7 ccgaattccc	10
25	<210> 8 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador	
	<400> 8 gggatatcgg	10
35	<210> 9 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador	
	<400> 9 ccaagcttcc	10
45	<210> 10 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Cebador	
	<400> 10 ttgtacccc	10
55	<210> 11 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Cebador	
65	<220> <223> Cebador	

ES 2 588 196 T3

	<400> 11 ggtcggagaa	10
5	<210> 12 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 12 agtcgtcccc	10
15	<210> 13 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador	
	<400> 13 acgcatcgca	10
25	<210> 14 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador	
	<400> 14 tctcagctgg	10
35	<210> 15 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador	
	<400> 15 gaatcggcca	10
45	<210> 16 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Cebador	
	<400> 16 ccgaacacgg	10
55	<210> 17 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Cebador	
	<400> 16 ccgaacacgg	10
65	<210> 17 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador	

ES 2 588 196 T3

	<400> 17 ctccatgggg	10
5	<210> 18 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador	
15	<400> 18 cctctcgaca	10
20	<210> 19 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador	
30	<400> 19 tgagcctcac	10
35	<210> 20 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador	
45	<400> 20 cattcgagcc	10
50	<210> 21 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador	
60	<400> 21 caccttccc	10
65	<210> 22 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> Cebador	
75	<400> 22 gaacactggg	10
80	<210> 23 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
85	<220> <223> Cebador	

ES 2 588 196 T3

	<400> 23 agcaggtgga	10
5	<210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 24 aggtgcatg tcgtccctca	20
15	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador	
	<400> 25 tgggtgggat acttcgctgg	20
25	<210> 26 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador	
	<400> 26 gtcccgggtg gacca	15
35	<210> 27 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador	
	<400> 27 gcatgagcg atcat	15
45	<210> 28 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Cebador	
	<400> 28 cctccaaga aaaccact	19
55	<210> 29 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Cebador	
65	<210> 29 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador	

	<400> 29 atttccgaga tcaccgaga	19
5	<210> 30 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 30 tggtcacaga aggtcctcag	20
15	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador	
25	<400> 31 cgcatacatt ccaagagcac	20
	LISTADO DE SECUENCIAS	
	<110> Amycel, Inc.	
30	<120> Champiñones marrones para la producción comercial	
	<130> SMK/FP6560858	
35	<140> EP 06789401.4 <141> 03-08-2006-08-03	
	<150> PCT/US2006/030436 <151> 03-08-2006	
40	<150> US 60/705.862 <151> 04-08-2005	
45	<140> US 11/267.043 <141> 03-11-2005	
	<160> 31	
	<170> PatentIn versión 3.3	
50	<210> 1 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador	
60	<400> 1 ccgcatctac	10
	<210> 2 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220>	

ES 2 588 196 T3

	<223> Cebador	
5	<400> 2 gtcccgcga	10
	<210> 3 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador	
15	<400> 3 tggaccggtg	10
	<210> 4 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador	
25	<400> 4 tgtctgggtg	10
	<210> 5 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador	
35	<400> 5 aaagctgcgg	10
	<210> 6 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador	
45	<400> 6 aagcctcgtc	10
	<210> 7 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Cebador	
55	<400> 7 ccgaattccc	10
	<210> 8 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
60		
65		

ES 2 588 196 T3

	<220> <223> Cebador	
5	<400> 8 gggatatcgg	10
10	<210> 9 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Cebador	
20	<400> 9 ccaagcttcc	10
25	<210> 10 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador	
35	<400> 10 ttgtacccc	10
40	<210> 11 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebador	
50	<400> 11 ggtcggagaa	10
55	<210> 12 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Cebador	
65	<400> 12 agtcgtcccc	10
70	<210> 13 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
75	<220> <223> Cebador	
80	<400> 13 acgcatcgca	10
85	<210> 14 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	

ES 2 588 196 T3

	<220> <223> Cebador	
5	<400> 14 tctcagctgg	10
10	<210> 15 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Cebador	
	<400> 15 gaatcgcca	10
20	<210> 16 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador	
	<400> 16 ccgaacacgg	10
30	<210> 17 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Cebador	
	<400> 17 ctccatgggg	10
40	<210> 18 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebador	
	<400> 18 cctctcgaca	10
50	<210> 19 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador	
	<400> 19 tgagcctcac	10
60	<210> 20 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
65		

ES 2 588 196 T3

	<220> <223> Cebador	
5	<400> 20 cattcgagcc	10
10	<210> 21 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Cebador	
20	<400> 21 caccttccc	10
25	<210> 22 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador	
35	<400> 22 gaacctggg	10
40	<210> 23 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebador	
50	<400> 23 agcaggtgga	10
55	<210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Cebador	
65	<400> 24 aggtgcatg tcgtccctca	20
70	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
75	<220> <223> Cebador	
80	<400> 25 tgggtgggat acttcgctgg	20
85	<210> 26 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	

ES 2 588 196 T3

	<220> <223> Cebador	
5	<400> 26 gtcccgggtg gacca	15
10	<210> 27 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Cebador	
15	<400> 27 gccatgagcg atcat	15
20	<210> 28 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador	
25	<400> 28 cctccaaga aaaccact	19
30	<210> 29 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Cebador	
35	<400> 29 attccgaga tcaccgaga	19
40	<210> 30 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebador	
45	<400> 30 tggcacaga aggtcctcag	20
50	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador	
55	<400> 31 cgcatacatt ccaagagcac	20

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de champiñón *Agaricus bisporus* híbrida obtenida cruzando un champiñón de la cepa silvestre AA-0096 con la cepa de cruce intermedia de *Agaricus bisporus* 4x29, en donde un cultivo representativo de dicha cepa 4x29 está depositado con el N.º de Registro de la ATCC PTA-6877, y en donde un cultivo representativo de dicha cepa silvestre AA-0096 se ha depositado con el N.º de Registro de la ATCC PTA-6903, y en donde dicha cepa de champiñón híbrida
- (a) tiene por lo menos una banda de RAPD, SCAR o RFLP de la cepa silvestre AA-0096 que no está presente en dicha cepa de cruce intermedia de *Agaricus bisporus*;
- (b) tiene por lo menos una banda de RAPD, SCAR o RFLP de dicha cepa de cruce intermedia de *Agaricus bisporus* que no está presente en la cepa silvestre AA-0096;
- (c) tiene por lo menos una característica física seleccionada del grupo que consiste en:
- color del sombrero más oscuro que un sombrero de la cepa marrón comercial Amycel 2400, grosor del sombrero que es más grueso que un sombrero de la cepa marrón comercial Amycel 2400 y productividad aumentada en comparación con la cepa marrón comercial Amycel 2400; y
- (d) es genéticamente no compatible con la cepa marrón comercial de comparación Amycel 2400.
2. El champiñón híbrido de la reivindicación 1, en donde dicho champiñón tiene por lo menos una banda de RAPD, una de SCAR o una de RFLP en común con la cepa AA-0096 que no está presente como una banda de RAPD, SCAR o RFLP correspondiente de la cepa marrón comercial Amycel 2400.
3. La cepa de champiñón híbrida de la reivindicación 2, en la que dicha cepa adicionalmente se **caracteriza por** tener por lo menos cinco bandas de RAPD, o dos de RFLP o SCAR en común con la cepa AA-0096, que no están presentes como las bandas de RAPD, RFLP o SCAR correspondientes de la cepa marrón comercial Amycel 2400.
4. La cepa de champiñón híbrida de la reivindicación 2, en la que dicha cepa adicionalmente se **caracteriza por** tener por lo menos una banda de RAPD, SCAR o RFLP en común con la cepa 4x29 que no está presente como una banda de RAPD, SCAR o RFLP correspondiente de la cepa AA-0096.
5. La cepa de champiñón híbrida de la reivindicación 1, en donde dicha cepa se **caracteriza por** al menos un marcador de RAPD⁺ presente en la cepa BR06 como se muestra en la Tabla 1.
6. La cepa de champiñón híbrida de la reivindicación 5, en donde dicha cepa tiene todas las características genéticas de la cepa BR06 como se muestra en las Tablas 3-6.
7. Un cultivo de champiñón híbrido de *Agaricus bisporus* en donde dicho cultivo de champiñón híbrido es un cruce de un primer cultivo de *Agaricus bisporus* con un segundo cultivo de *Agaricus bisporus*, en donde dicho primer cultivo de *Agaricus bisporus* es una cepa de tipo silvestre denominada AA-0096, habiéndose depositado un cultivo representativo de dicha cepa silvestre AA-0096 con el N.º de Registro de la ATCC PTA-6903, en donde dicho segundo cultivo de *Agaricus bisporus* es un cultivo de la cepa de cruce intermedia de *Agaricus bisporus* 4x29, en donde un cultivo representativo de dicha cepa 4x29 está depositado con el N.º de Registro de la ATCC PTA-6877, y en donde dicho cultivo produce un champiñón
- (a) que tiene por lo menos una banda de RAPD, SCAR o RFLP de la cepa silvestre AA-0096 que no está presente en dicha cepa de cruce intermedia de *Agaricus bisporus*;
- (b) que tiene por lo menos una banda de RAPD, SCAR o RFLP de dicha cepa de cruce intermedia de *Agaricus bisporus* que no está presente en la cepa silvestre AA-0096;
- (c) que tiene por lo menos una característica física seleccionada del grupo que consiste en: color de sombrero más oscuro que un sombrero de la cepa marrón comercial Amycel 2400, grosor de sombrero que es más grueso que un sombrero de la cepa marrón comercial Amycel 2400 y productividad aumentada en comparación con la cepa de champiñón marrón comercial Amycel 2400; y
- (d) es genéticamente no compatible con la cepa marrón comercial de comparación Amycel 2400.
8. El cultivo de champiñón híbrido de la reivindicación 7, en donde dicho cultivo de champiñón híbrido presenta antagonismo hacia cepas en un grupo de linaje Horst U1/U3.
9. Inóculo que comprende el cultivo de champiñón híbrido de la reivindicación 7.
10. Micelio en grano de champiñón que comprende el inóculo de la reivindicación 9.

11. Inoculante de cobertura que comprende el inóculo de la reivindicación 9.
12. Homocariones obtenidos del cultivo de champiñón híbrido de la reivindicación 7.
- 5 13. Un champiñón producido por fructificación del cultivo de champiñón híbrido de la reivindicación 7.
14. Un método de producción de champiñones híbridos marrones comerciales de la reivindicación 1 o de la reivindicación 7, método que comprende:
 - 10 inocular un medio de cultivo de champiñones con una cepa de champiñón *Agaricus bisporus* híbrida de la reivindicación 1 o de la reivindicación 7;
mantener dicho medio de cultivo inoculado en condiciones que conducen a la fructificación del champiñón; y
recoger champiñones de dicho medio de cultivo.
- 15 15. Una cepa de champiñón *Agaricus bisporus* híbrida BR06, en donde un cultivo representativo de BR06 está disponible en la ATCC con el N.º de Registro PTA-6876.
16. Una cepa de cruce intermedia de *Agaricus bisporus* 4x29, en donde un cultivo representativo de 4x29 está disponible en la ATCC con el N.º de Registro PTA-6877.