

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 924**

51 Int. Cl.:

**A01H 1/02** (2006.01)

**A01H 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2010 PCT/US2010/042289**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012 WO12008969**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2010 E 10854834 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2613623**

54 Título: **Métodos para la producción de champiñones AGARICUS BISPORUS sin esporas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.12.2017**

73 Titular/es:

**SYLVAN AMERICA, INC. (100.0%)  
198 Nolte Drive  
Kittanning, PA 16201, US**

72 Inventor/es:

**KERRIGAN, RICHARD, W.;  
VELCKO, ANTHONY, J., JR.;  
SPEAR, MARK, C. y  
WACH, MARK, P.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 647 924 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

Métodos para la producción de champiñones *AGARICUS BISPORUS* sin esporas

## Aplicaciones relacionadas

Ninguna.

## 5 Campo técnico

Esta divulgación se refiere a un método para la producción de champiñones. Más concretamente, esta divulgación se refiere a un método para la producción de una o más cepas del champiñón cultivado *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, que producen champiñones que expresan, o poseen en estado latente, una o más características seleccionadas del grupo formado por la ausencia de esporulación, esporulación reducida, desarrollo incompleto de esporas, liberación incompleta de esporas y lamelas más pálidas.

## Antecedentes de la invención

El hongo basidiomiceto *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach var. *bisporus* produce un champiñón (técnicamente, un basidioma agárico con un pileo, un pie (estípite), velo y lamelas). Este "champiñón botón" o "champiñón portobello" *Agaricus bisporus* es una especie de champiñón que se cultiva de forma amplia y extensa. Globalmente, la cosecha anual alcanza un valor de varios miles de millones de dólares. Los champiñones se cultivan comercialmente en un compost preparado especialmente, en espacios cerrados y ambientalmente controlados. Durante la maduración, se forman los primordios de los hongos y crecen sobre una capa no nutritiva llamada "suelo de cobertura" que se aplica sobre el compost. Las estructuras anatómicas de los champiñones experimentan una progresión de desarrollo que, si no es interrumpida, provoca que (1) la capa velar que cubre las lamelas (= "branquias") se estire y se rompa, (2) las lamelas queden expuestas a la atmósfera ambiental, y también que comiencen a adquirir una coloración más profunda y/u oscura, (3) las células basidiales que recubren las lamelas sufran una fusión nuclear (= cariogamia) seguida de meiosis, (4) aparecen esterigmas (estrechas estructuras esporogénicas) y primordios de esporas, que crecen sobre el vértice distal de los basidios, (5) uno o más núcleos postmeióticos haploides emigran a cada "basidiospora", (6) las esporas desarrollan una pigmentación marrón oscura en la pared, y las esporas maduras son liberadas forzosamente de los esterigmas y son transportadas por el aire. El desarrollo y la liberación de las esporas de hongos conjuntos constituyen y definen la esporulación.

Las cepas de *Agaricus bisporus* tradicionales utilizadas comercialmente se tomaban en un principio directamente de champiñones que brotaban naturalmente, o de composts "silvestres" encontrados en los que se observaba micelio de champiñones. Algunas de estas cepas más antiguas siguen presentes en cultivos, y por lo menos una de tales líneas, que produce champiñones con cabeza marrón, sigue utilizándose comercialmente. Desde la década de 1970, diversos laboratorios han desarrollado algunas técnicas para fusionar dos cepas distintas (son términos equivalentes troncos, líneas, variedades comerciales, etc.) para producir cepas "híbridas" nuevas que incorporen núcleos haploides de las dos cepas progenitoras distintas. Lo más frecuente, pero no de forma universal, es que el término "cepa" se aplique a cultivos heterocarióticos incorporando dos núcleos haploides complementarios en un citoplasma común. Un término general más inclusivo, cultivo, incluye no solamente los cultivos heterocarióticos, sino también los cultivos haploides, homocarióticos, aneuploides, etc.

La especie de champiñón *Agaricus bisporus* utiliza dos ciclos de vida complementarios que operan simultáneamente, mediante basidios y basidiosesporas (= esporas), en cada hongo. En un ciclo de vida, algunas esporas reciben dos núcleos haploides postmeióticos sexualmente complementarios, y esas esporas "heterocarióticas" pueden llevar a cabo el ciclo vital completo a partir de una única espóra germinativa; no obstante, solo se fusionan deficientemente con otros cultivos de esporas. Esto es un sistema de endogamia denominado "pseudohomotalismo", "homotalismo secundario" o "intramixis", y tales esporas pueden ser consideradas colonizadoras. En el otro ciclo de vida, algunas esporas reciben solo un núcleo haploide postmeiótico, y aunque tales esporas "homocarióticas" no pueden completar por sí solas el ciclo de vida, tienen la capacidad general de fusionarse y combinar material genético con muchos otros cultivos. Este es un sistema de exogamia denominado "heterotalismo" o "heteromixis", y tales esporas puede ser consideradas cruzadoras. Tras la fusión de, por ejemplo, dos cultivos de esporas homocarióticas compatibles, puede resultar un cultivo heterocariótico conteniendo dos núcleos haploides, capaz de completar el ciclo de vida. Menos frecuentemente, se producen también, en pequeñas cantidades, esporas que pueden recibir dos núcleos haploides postmeióticos sexualmente incompatibles (o "hermana" de segunda división), como informa Kerrigan et al. *Genetics* 133:225-236 (1993); funcionan como homocariotes pero son más heterogéneas genéticamente. Otras clases raras de esporas comprenden esporas aneuploides y esporas suficientemente distintas, citogenéticamente, de los estados de complemento cromosómico ordinarios  $n=1,0$  o  $n+n=2,0$ , para no ser de clasificación fácil; la supresión y el truncamiento de cromosomas puede producir este tipo de núcleos y esporas. No obstante, todo cultivo de esporas viable tiene por lo menos alguna posibilidad de participación en una fusión con otro cultivo, lo que conduciría a un cultivo y genotipo nuevos.

Aunque las esporas, algunas de las cuales germinan para producir los homocariotes haploides (n) deseados para la hibridación, son las que se usan con más frecuencia como fuente de los cultivos utilizados para crear nuevas cepas híbridas, pueden obtenerse otras fuentes de homocariotes utilizando métodos que provocan la repartición del contenido celular incluyendo el núcleo; las técnicas específicas incluyen la subdivisión de micelios de cultivos heterocarióticos (ej. métodos de reducción mecánicos, entre otros, microcirugía o cirugía láser para cortar puntas de hifa o fragmentos de micelio), regenerar protoplastos de cultivos heterocarióticos, etc.

Una fusión definida típicamente deriva de la anastomosis más plasmogamia de dos cultivos homocarióticos haploides compatibles, y se consigue en laboratorio colocando ("apareando") los dos cultivos en estrecha proximidad en un medio de cultivo estéril adecuado, y facilitando la anastomosis (= fusión de hifas creando una abertura continua a través de la pared celular hifal y la membrana plasmática) y la plasmogamia (= mezcla citoplásmica). Otras combinaciones de tipos de cultivo pueden resultar también en procesos de fusión que conduzcan a nuevas cepas híbridas, si bien tales métodos tienen en general una menor probabilidad de éxito y/o dan como resultado una o más cepas heterocarióticas híbridas indefinidas. Estos métodos incluyen el apareamiento de un cultivo heterocarión con un cultivo homocarión, apareamiento de dos cultivos heterocariotes, apareamiento de cultivos en los que por lo menos uno de ellos tiene como mínimo un núcleo que es aneuploide o es cariotípicamente ambiguo o indeterminado (es decir, respecto a ploidía), y preparar mezclas de esporas indefinidas, o esporas y micelio juntos. Todos estos casos requieren métodos microbiológicos llevados a cabo en el laboratorio por el investigador, utilizando manipulación axénica de materiales de cultivo puros en medios de cultivo y entornos estériles, para permitir que se produzca la anastomosis y la plasmogamia.

Cualquier método, incluyendo entre otros los descritos más arriba, que permita la reasociación de material genético de más de un cultivo y/o espора, y produzca un heterocarión con genotipo híbrido nuevo (biparental), puede producir un resultado equivalente. Los métodos microbiológicos utilizados para obtener, mantener y transferir cultivos incluyendo homocariotes, y que permitan la fusión vía anastomosis y plasmogamia entre cultivos de hongos basidiomicetos, serán denominados aquí "hibridación". "Progenitor" significa una cepa heterocariótica. No obstante, lo más frecuente es que se intenten fusiones de cultivos entre dos homocariotes haploides. Los cultivos homocarióticos se propagan por clonación, y pueden vivir y crecer indefinidamente, pero biológicamente constituyen el equivalente funcional de gametos tales como esperma o huevos. Es incorrecto llamar también a los homocariotes simplemente "progenitores", por lo que para una mejor distinción se les denominará aquí "progenitores homocariotes", como se expone en las definiciones más adelante.

Se cree que son poco frecuentes las mutaciones "sin esporas" que se producen naturalmente. Se conoce un reducido número de mutaciones que afectan negativamente a la esporulación en algunos hongos basidiomicetos. Esto no es inesperado, considerando que sin esporulación, se impide la reproducción del individuo afectado. El material genético de un individuo así, incluyendo todo lo que determina la característica de ausencia de esporas, no estará representado en la siguiente generación de descendientes, y por tanto, estos determinantes genéticos de ausencia de esporas, cuando se presentan espontáneamente, tienden a declinar en cuanto a frecuencia en las poblaciones naturales. En otras palabras, la selección natural contra la ausencia de esporas tiende a reducir la frecuencia de determinantes genéticos de ausencia de esporas (es decir, material genético determinante de una característica, por ejemplo, alelos en un locus genético) en la naturaleza. No obstante, si un hipotético alelo mutante semejante que cause ausencia de esporas, tiene un comportamiento genético recesivo, y es apareado con un alelo dominante funcional en una cepa heterocariótica (n+n), puede producirse esporulación y el alelo mutante "enmascarado" puede ser transmitido a generaciones futuras, y ser mantenido en la población, excepto si se aparea (en un individuo heterocariótico) con otro alelo recesivo para ausencia de esporas. Se sabe además, como en Zolan et al., Mol. Cell. Biol. 6: 195-200 (1986), que en algunos casos "esas escasas... esporas que se producen nunca resultan más de aproximadamente un 1% tan viables como las esporas más numerosas de cepas de tipo silvestre".

Los expertos saben que un reducido número de cepas de basidiomicetos "sin esporas" producen basidiomas (ej. champiñones) con solo un número reducido de esporas. Pero ninguna de esas cepas conocidas pertenece a la especie *Agaricus bisporus*. Por ejemplo, Okuda et al., Genome 52(5): 438-446 (2009), indican que una "cepa mutante sin esporas ... de [*Pleurotus*] *pulmonarius* ... produce un número extremadamente bajo de esporas". A falta de una definición universal precisa de "ausencia de esporas", y a los efectos de esta invención, la característica de "ausencia de esporas", o sea la condición o fenotipo "sin esporas", incluye las características específicas de no esporulación, esporulación reducida, desarrollo incompleto de esporas, liberación incompleta de esporas, y/o lamelas más pálidas como se define más abajo.

Se conoce un ejemplo de una mutación sin esporas que se produce naturalmente en el hongo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* como indican Eger et al, Patente USA 4 242 832. Esa patente presenta un proceso específico para producir homocariotes no recombinados (no postmeióticos) (denominados en este documento con el sinónimo de "monocariotes") de micelios heterocarióticos vegetativos de basidiomicetos. Se ha obtenido una cepa sin esporas designada como "42 x 11" vía endogamia fusionando dos aislados de espора única homocarióticos (haploides) (SSIs) de una única cepa comercial

de champiñón *Pleurotus*. Se interpreta que un determinante genético recesivo de una característica de sin esporas fue heredado por ambos descendientes del SSI homocariótico haploide (n), y cuando esos dos descendientes se aparearon, la cepa heterocariótica endogámica (n+n) resultante tenía un genotipo doblemente recesivo para el gen postulado como determinante de ausencia de esporas, y en consecuencia la característica de ausencia de esporas vino expresada y se observó en el fenotipo de champiñones formados por la cepa heterocariótica de nueva creación. Un inconveniente de este método es que tales descendientes comparten un único progenitor común y serán endogámicos (y por tanto no “híbridos” en el sentido de tener dos progenitores distintos), y es muy posible que, por ejemplo, sean homocigotos para alelos recesivos perjudiciales que pueden afectar negativamente a cualquier característica importante de la cepa.

Pero, de forma más general, tales mutaciones se obtienen mediante procesos mutagénicos. Esto se hizo con *Coprinopsis cinereus* como informan Zolan et al., *Methods Mol. Biol.* 558: 115-27, (2009) y en referencias citadas allí. Los mutantes no esporulantes resultantes han sido estudiados por distintos laboratorios, y se han observado varios tipos diferentes de mutaciones. En su artículo de 1986, Zolan et al. escribieron que “En consecuencia, hay muchas mutaciones que pueden producir ... ausencia de formación de esporas ...” incluyendo algunas que afectarían a la meiosis, y otras que no. Un inconveniente de la mutagénesis artificial es que se crean muchas mutaciones aleatorias, en lugar de una única mutación deseada, y es frecuente que las cepas mutagenizadas resultantes tengan múltiples defectos genéticos, y solo resulten adecuadas a efectos de investigación.

Mikosh et al., WIPO Publicación N°. W001/12850 AI describen un método de “utilización de una molécula de ácido nucleico o fragmento de ella” para marcar a alelos de genes en hongos basidiomicetos. Estos métodos de “Selección Asistida por Marcadores” (MAS) eran y son métodos bien conocidos por los expertos, y se ha abandonado su aplicación. Lo que Mikosh et al. demostraron de paso, utilizando MAS, fue un marcador que parecía ir ligado a una mutación de ausencia de esporas en el hongo *Pleurotus ostreatus*. Posteriormente, utilizando también marcadores genéticos, en el artículo de Okuda et al. 2009 se proponía una localización en el mapa cromosómico para una mutación “sin esporas” no especificada en la especie relacionada *Pleurotus pulmonarius*. Hay que señalar que los métodos de la presente invención no utilizan o requieren ninguna molécula o fragmento de ácido nucleico, ni ningún otro marcador o técnica MAS, para marcar alelos de ningún gen asociado hipotéticamente con la producción de un fenotipo sin esporas en champiñones de *Agaricus*.

Mikosh et al. (2001) señalan además, en un ejercicio totalmente imaginativo, que su invención “... proporciona un champiñón esencialmente sin esporas, obtenible mediante un método según la invención, por ejemplo... obtenido de ... cultivos de basidiomicetos como... *Agaricus bisporus*...” No obstante, su pretendida invención requería en realidad material de partida biológico sin esporas (expresadas o latentes) que necesariamente tenía que haber contribuido a la característica real de ausencia de esporas. Como ningún material genético de *Agaricus bisporus* determinante de una característica de ausencia de esporas en esa especie era conocido por Mikosh et al., su invención no fue de hecho capaz de proporcionar el *Agaricus bisporus* sin esporas como se pretendía, y su afirmación se considera una conjetura. De hecho, la divulgación de la presente aplicación es la única y la primera capaz de proporcionar un champiñón *Agaricus bisporus* macroanatómicamente normal, sin esporas. Además, como se ha indicado, los métodos de nuestra invención no se apoyan en métodos MAS para alcanzar su objetivo.

Mikosh et al. imaginan además la posibilidad de utilizar “ingeniería genética” o métodos de transformación mediados por ADN para silenciar o “noquear” un gen requerido para la esporulación de hongos basidiomicetos. Tales futuros desarrollos resultan fáciles de imaginar para los expertos en la materia, pero no fueron alcanzados nunca por Mikosh et al. ni, por cuanto saben los Solicitantes, por nadie más. Hay que señalar que en los métodos de la presente invención no se utiliza ningún método de ingeniería genética, y explícitamente no se silencia o “noquea” un gen requerido para la esporulación.

En base a experimentos con *Coprinopsis cinereus* publicados por Zolan et al., y otros, documentando la complejidad de los procesos meióticos y esporogénicos, el número de defectos genéticos posibles que pueden interrumpir el desarrollo y la liberación de esporas maduras, típicas y viables, y la forma en que esos genes frecuentemente no identificados interactúan con el resto del genotipo del organismo, existen expectativas de diversidad tanto en la naturaleza como en el grado de fenotipos “sin esporas” que pueden descubrirse. Según Mikosh et al. (2001) y Okuda et al. (2009), pueden producirse unas pocas esporas en cepas sin esporas de *Pleurotus*. En *Coprinopsis*, pueden producirse esporas no viables (Zolan et al. 1986). Como se explica más adelante, esta condición puede tener también un potencial valor, ya que es de esperar que impida la diseminación de virus de hongos por esporas transportadas por el aire, de las que se cree que son infecciosas solamente si son viables.

Cabe suponer la posibilidad de que se puedan producir esporas diminutas abortadas, o esporas inmaduras no pigmentadas. En otro caso, pueden desarrollarse esporas maduras que no se liberan debido a un defecto en el mecanismo de liberación de las esporas. La presente invención define más adelante el “desarrollo incompleto de esporas” incluyendo los anteriores estados y cualquier otro que inhiba la producción y/o liberación de esporas maduras, típicas y viables de champiñones por lo demás típicos con independencia de la cantidad de esporas.

En la literatura publicada sobre *Agaricus*, se cree que hay solamente unos pocos artículos que puedan parecer tener una relación remota con la presente invención. De hecho, esos artículos describen un fenómeno básicamente distinto relacionado con mutaciones que producen “monstruosidades anatómicas” que no tienen la anatomía habitual de champiñones típicos normales. Fritsche, *Mush. Sci.* 6: 27-47 (1967) presentó estudios sobre una serie de mutaciones espontáneas en un único cultivo de *Agaricus bisporus* y una serie de sus subcultivos. En los basidiomas mutantes (que en cuanto a forma no eran característicamente (macroanatómicamente) champiñones “agárlicos”) se impidió el desarrollo de estructuras anatómicas completas. En la primera mutación de la secuencia, se obtuvo una estructura irregular de casi champiñón que carecía de lamelas y de pie (tallo). Tras una segunda mutación, esos cuerpos sin pie y no lamelados adquirieron una forma regular, parecida a huevos de gallina. Dos mutaciones posteriores condujeron a la producción de masas amorfas de tejido no diferenciado totalmente distinto a un champiñón. En otros artículos, por ejemplo, en Umar et al., p. 563-570. *In* T. J. Elliott [ed.], *Science and cultivation of edible fungi*, Balkema, Rotterdam (1995), se informa de lo mismo o de otros tipos de “monstruosidades” irregulares que pueden derivar hipotéticamente de la que puede ser una mutación igual o similar, o distinta. En casos graves, las monstruosidades formadas carecen de características anatómicas, entre las cuales la carencia de lamelas. Técnicamente, los basidiomas que carecen de lamelas y basidios pueden ser incidentalmente sin esporas, pero no son macroanatómicamente normales como se define aquí. Por el contrario, el champiñón sin esporas deseado comercialmente es macroanatómicamente normal, y resulta completamente familiar para el consumidor.

En ausencia de meiosis, no se producirá recombinación en una cepa sin esporas, y sin esporas no hay modo inherente de que se produzca descendencia sexual. Ambos comportamientos presentan obstáculos para la creación de cepas sin esporas, y la falta de material genético nativo deseado disponible que provoque la ausencia de esporas sin incurrir en las consecuencias negativas de la mutagénesis aleatoria sobre la cepa constituye otro impedimento más. Antes del desarrollo de la presente invención, no se conocía evidencia de la existencia de la característica de ausencia de esporas o de determinantes genéticos naturales o artificiales de ausencia de esporas en el *Agaricus*.

La esporulación de champiñones cosechados comercialmente no es deseable por diversas razones. Se sabe que esporas de champiñones infectados con virus dsARN incorporan copias de virus, y las esporas transportadas por el aire pueden diseminar la infección dentro de instalaciones y entre ellas, dificultando mucho el control de enfermedades. Se sabe que las enfermedades víricas de las cosechas de champiñones *Agaricus* reducen la productividad, retrasan las cosechas y alteran el aspecto del producto en formas que reducen o eliminan su valor comercial. A concentraciones superiores de esporas de champiñón y otros hongos, como pueden producirse en instalaciones de producción de champiñones cerradas, existe el riesgo de una respuesta alérgica y/o trastornos respiratorios en humanos. En el *Agaricus*, las esporas tienen un color “marrón chocolate” oscuro (aproximadamente el 187A en el sistema de carta de colores RHS), y esporas oscuras sobre la superficie de las lamelas las oscurecen y contribuyen a conformar una impresión de vejez (excesiva madurez o falta de frescura) en los champiñones frescos. En los productos específicos con cabezas de champiñón abiertas, como “planos” o “portobellos”, la liberación de esporas tras la recolección y su transferencia a otros productos recolectados o al envasado, pueden deteriorar el aspecto y el valor comercial del producto fresco (“crudo” o no procesado). Las esporas oscuras sobre las lamelas pueden oscurecer también platos de comida húmeda que contengan champiñones maduros, deteriorando con frecuencia el aspecto del plato acabado.

Para contrarrestar muchos de esos problemas, los champiñones se han recolectado tradicionalmente aún no maduros, como “botones”, “copas” o “cabezas cerradas”. Pero cuanto más pronto se recolecte un champiñón, menor es su peso, por lo que las estrategias de recolección temprana pueden implicar una potencial penalidad en cuanto a producción y una pérdida de beneficios. En años recientes, ha ido creciendo un segmento de mercado para los champiñones abiertos, en parte porque puede considerarse que los champiñones maduros son más sabrosos. La producción comercial de champiñones abiertos incluye potencialmente todas las consecuencias higiénicas negativas y otras señaladas más arriba.

Son muy deseables los champiñones con lamelas más pálidas en cualquier fase de desarrollo, en relación y comparación con las cepas comerciales típicas. La palidez puede ser evidente o determinarse objetiva y cuantitativamente como se describe aquí.

En consecuencia, es necesaria una nueva cepa de champiñones capaz de producir champiñones visualmente (macroanatómicamente) típicos con una capacidad de esporulación muy reducida o nula, entendiéndose la producción y liberación de esporas maduras, típicas y viables, así como una productividad, un vigor, un *timing* y un aspecto aceptables. También es necesario un método que permita el desarrollo de cepas *Agaricus* sin esporas, proporcionando cepas con materiales genéticos nativos que (1) proporcionen la característica de ausencia de esporas a las cepas, (2) no interfieran con la recombinación meiótica, y además (3) mediante métodos adecuados puedan proporcionar descendencia recombinante a través de múltiples generaciones de hibridación. También es necesario un método para obtener descendencia postmeiótica en ausencia de esporulación.

### Resumen de la invención

La invención viene definida en las reivindicaciones. A los efectos de la presente invención, se han definido

los siguientes términos.

El término “cultivo” significa un producto del crecimiento de un microorganismo vivo en medios nutrientes preparados. Tal microorganismo puede incluir, por ejemplo, micelio fúngico, comprendiendo micelios que sean heterocarióticos, haploides, homocarióticos y aneuploides.

- 5 El término “cepa” significa cultivos heterocarióticos que tienen dos núcleos haploides complementarios (es decir, cultivos con un complemento cromosómico nuclear  $n+n$  como estado citogenético) en un citoplasma común; “heterocarión” es un término equivalente.

El término “homocarión” significa un cultivo haploide con un único complemento cromosómico nuclear ( $n$ ).

- 10 El término “progenitor” significa una cepa heterocariótica que aporta uno de los dos núcleos que se incorporan a una descendencia heterocariótica híbrida.

El término “progenitor homocarión” significa un cultivo homocariótico haploide (= homocarión) derivado de una cepa progenitora heterocariótica, y que puede funcionar como donante de uno de los dos núcleos haploides incorporados en una descendencia heterocariótica híbrida.

El término “cepa silvestre” o “cultivo silvestre” significa una cepa o un cultivo obtenidos de la naturaleza.

- 15 El término “germoplasma silvestre” significa el material hereditario o ADN de cepas y cultivos de procedencia natural, y también de cepas y cultivos aislados de fuentes naturales, y también ese material que puede haber sido transmitido a descendientes, incluyendo descendientes híbridos, a lo largo de cualquier número de generaciones.

- 20 El término “pedigrí” significa un grupo inclusivo o “familia” que está relacionado genealógicamente, se origina con los progenitores de una primera cepa híbrida, e incluye a todos los miembros de todas las generaciones descendientes de esa primera cepa híbrida.

El término “descendiente” significa que una cepa híbrida más reciente está relacionada genealógicamente en un linaje directo con una serie de cepas preexistentes, incluyendo, por ejemplo, padres y abuelos, por una o más generaciones de hibridación.

- 25 El término “derivado” significa que una cepa ha sido obtenida de una cepa preexistente por métodos de manipulación o selección que no incluyen la hibridación, pero incluyen, entre otros, la selección de esporas, la selección somática, la mutagénesis, la transformación mediada por ADN y la ingeniería genética.

El término “esporulación” significa el desarrollo y la liberación de esporas fúngicas.

- 30 El término “ausencia de esporas” significa un fenotipo sin esporas, incluyendo cualquiera de las características específicas de no esporulación, esporulación reducida, desarrollo incompleto de esporas, liberación incompleta de esporas y/o lamelas más pálidas, como se ha descrito más arriba y definido aquí.

- 35 El término “no esporulante” o “no esporulación” significa una característica o condición donde existe una reducción del 99% o más en el número de esporas maduras, típicas y viables liberadas, en relación con una cepa comercial de control, como Sylvan SB- 65, cepa control que está actualmente depositada en la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) Patent Depository collection según el Tratado de Budapest en Peoria, Illinois, EE.UU, y a la que se ha asignado el número de depósito NRRL 50409. Esta cepa fue depositada el 13 de julio de 2010. La cepa depositada se mantendrá en ese depósito durante un mínimo de 30 años a partir de la fecha de presentación de la solicitud, o durante la vida efectiva de la patente, lo que sea más prolongado, y será sustituida si es necesario. Esta cepa será hecha pública irrevocablemente y sin restricción o condición tras la emisión de una patente.
- 40

- 45 El término “esporulación reducida” significa una característica o condición donde hay una reducción del 50% al 99% en el número de esporas maduras, típicas y viables liberadas, en relación con el de la cepa comercial control Sylvan SB-65, cuando los champiñones que se comparan son básicamente del mismo tamaño, y con el mismo grado de expansión y maduración.

El término “desarrollo incompleto de esporas” significa la condición o condiciones que inhiben la producción y/o liberación de esporas maduras, típicas y viables de champiñones por lo demás típicos, con independencia de la cantidad de esporas, cuando los champiñones que se comparan son básicamente del mismo tamaño y con el mismo grado de expansión y maduración.

- 50 El término “liberación incompleta de esporas” significa la condición en la que no se liberan forzosamente esporas de los basidios.

- 55 El término “lamelas más pálidas” significa que las lamelas son visiblemente o de forma mensurable menos oscuras o menos pigmentadas en relación con la cepa de control Sylvan SB- 65, cuando los champiñones que se comparan tienen básicamente el mismo grado de expansión y maduración. La medición real de la palidez se comenta más adelante.

El término “macroanatómicamente normal” significa que a simple vista, todos los elementos anatómicos conocidos de un champiñón ordinario, incluyendo las lamelas y el pie, se presentan en su forma, lugar y

proporciones normales. Tal champiñón parecerá completamente normal a un consumidor.

Las ventajas de la presente invención sobre las técnicas existentes previamente relacionadas con los champiñones *Agaricus bisporus* y mutantes conocidos, que resultarán evidentes con la descripción que sigue, se obtienen con la invención tal como se define en las reivindicaciones. Un aspecto de la presente divulgación es proporcionar un champiñón *Agaricus bisporus* macroanatómicamente normal y sin esporas. Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un método para la producción de una o más cepas del hongo champiñón cultivado *Agaricus bisporus* que produzca champiñones sin esporas de acuerdo con las reivindicaciones. Los champiñones de la divulgación expresan, o poseen en estado latente, una o más de las características seleccionadas del grupo compuesto por no esporulación, esporulación reducida, desarrollo incompleto de esporas, liberación incompleta de esporas, y lamelas más pálidas, como se definen más arriba. En como mínimo una realización, los champiñones sin esporas son macroanatómicamente normales. En por lo menos otra realización, en los métodos de la presente invención no se utiliza ni requiere ninguna molécula de ácido nucleico, o fragmento de la misma, ni ninguna otra técnica de marcador o MAS, para marcar alelos de cualquier gen asociado hipotéticamente a la producción de un fenotipo sin esporas en champiñones *Agaricus*.

Se observará que por lo menos algunas de esas características se basan en una comparación con la cepa comercial de control Sylvan SB-65. Para proceder a una adecuada comparación entre dos cepas y garantizar consistencia en la comparación, deben evaluarse champiñones básicamente de igual tamaño y con el mismo grado de desarrollo y madurez, aplicando la misma metodología. Un experto en la materia podría determinar fácilmente si tal cepa es "no esporulante", sin indebida experimentación en la técnica, y con mayor frecuencia sería razonablemente capaz de evaluar la "esporulación" o "no esporulación" del champiñón mediante un simple examen microscópico de las lamelas, o a simple vista, por ejemplo, suspendiendo las cabezas de los champiñones sobre papel blanco en condiciones sin viento, y procediendo a una observación visual del depósito de esporas, o la ausencia del mismo, sobre el papel tras 24 horas o más de exposición. Además, si se requiere un método cuantitativo preciso, se pueden colocar objetivos idénticos, como cubreobjetos de vidrio, bajo las cabezas de los champiñones durante un intervalo estándar de 24 horas o más, las esporas pueden ser suspendidas en un volumen estándar de agua, proceder a uno o más pasos de dilución, y determinar la concentración de esporas utilizando cualquiera de los diversos dispositivos de recuento de células disponibles. En la comparación de los datos obtenidos, si el número de esporas contadas en una unidad de volumen de la suspensión de esporas del champiñón de control es 100 o más veces superior al obtenido en un volumen igual de la suspensión del champiñón que está siendo evaluado, este último champiñón es no esporulante.

Con los mismos métodos de comparación se pueden determinar las condiciones que se definen aquí cuantitativamente como esporulación reducida y liberación incompleta de esporas. Por ejemplo, en la comparación de los datos obtenidos, si el número de esporas contadas en una unidad de volumen de la suspensión de esporas del champiñón de control es 50 o más veces superior que, pero menos de 100 veces superior que el número obtenido en un volumen igual de la suspensión del champiñón que se evalúa, se dice que este último champiñón expresa la característica de esporulación reducida.

El desarrollo incompleto de esporas se observa fácilmente utilizando un microscopio compuesto para examinar muestras de lamelas, donde las esporas pueden ser medidas y fotografiadas, y se puede documentar sus formas y pigmentación. La viabilidad de las esporas puede determinarse transfiriendo una cantidad conocida de esporas suspendidas en dilución en agua a placas petri que contengan un medio, como PDA, y contando el número de colonias derivadas de las esporas germinadas tras 14 o 21 días.

La condición o característica de lamelas más pálidas puede ser establecida objetiva y cuantitativamente. Por ejemplo, con muestras determinadas de champiñones de tamaños y edad comparables, y utilizando un dispositivo como un Minolta Chroma Meter, registrando mediciones objetivas de color utilizando un sistema como el espacio de color L-a-b, empleado para medir el color de las lamelas de por lo menos diez champiñones para cada tratamiento, incluyendo el control, y usando un test adecuado, como un t-test, registrando una diferencia estadísticamente significativa en una escala pertinente, como la escala L, de forma que el conjunto de mediciones de control tenga, por ejemplo, un valor L inferior, a un nivel significativo de  $p \leq 0,05$ , se puede determinar que las lamelas del champiñón evaluado son más pálidas que las del champiñón de control.

Además, como se indica más arriba, los métodos de nuestra invención no están basados en los métodos Marker Assisted Selection para alcanzar sus objetivos. Identificando e incorporando germoplasma silvestre capaz de transmitir la característica, y supuestamente conteniendo determinantes genéticos de no esporulación, a nuevos pedigrís de cría, se ha hallado un método para crear cepas de champiñón híbridas de *Agaricus* que no esporulan, incluyendo cepas con otros atributos comercialmente aceptables y deseables. Empleando otro método de obtención de descendencia postmeiótica de cepas de champiñón sin esporas, pueden crearse pedigrís sin esporas que pueden ser recombinados y mejorados a lo largo de múltiples generaciones en ausencia de esporas.

Otro aspecto de la divulgación es proporcionar un método para obtener cepas sin esporas de champiñones *Agaricus bisporus* con atributos aceptables o incluso mejorados requeridos para su uso comercial. Específicamente, un aspecto de la divulgación consiste en proporcionar cultivos capaces de

producir champiñones con características y aspecto adecuados para su uso en diversos segmentos del mercado de champiñones comestibles comerciales, incluyendo champiñones cerrados y abiertos, champiñones frescos y procesados, champiñones enteros y trozos (cabezas, rodajas) de champiñón, champiñones con lamelas o sin lamelas, champiñones pequeños, medianos y grandes, y champiñones blancos, marrón claro y marrón oscuro, entre otros atributos variables, según requiera el mercado.

Uno o más de esos y otros aspectos de la divulgación se han alcanzado proporcionando un método para la producción de cepas de champiñones híbridas, comprendiendo el paso de permitir la fusión vía anastomosis y plasmogamia entre un primer cultivo de *Agaricus bisporus* seleccionado del grupo consistente en (a) un cultivo silvestre capaz de transmitir a la descendencia por lo menos una característica seleccionada del grupo consistente en no esporulación, esporulación reducida, desarrollo incompleto de esporas, liberación incompleta de esporas y lamelas más pálidas, (b) un cultivo derivado de él, y (c) un cultivo descendiente de él, y por lo menos un segundo cultivo. El método puede incluir además el paso de repartición celular inducida del contenido de células postmeióticas de un cultivo no esporulante para derivar cualquier cultivo utilizado para permitir la fusión. En una realización y para cualquiera de los pasos anteriores o ambos, se puede seleccionar el primer cultivo de *Agaricus bisporus* del grupo compuesto por un cultivo silvestre de *Agaricus bisporus* de la variedad tetraspórica *burnettii*, un cultivo derivado de él, y un cultivo descendiente de él. En otra realización, y para cualquiera de los pasos anteriores o ambos, el primer cultivo puede ser seleccionado del grupo compuesto por un cultivo silvestre de *Agaricus bisporus* JB-2, un cultivo silvestre de *Agaricus bisporus* JB-28, un cultivo derivado de JB-2 o JB-28, y un cultivo descendiente de JB-2 o JB-28. En otra realización, y según cualquiera de las anteriores realizaciones, por lo menos una característica viene expresada fenotípicamente en un miembro de un pedigrí. Y en otra realización más de la divulgación, según cualquiera de las otras realizaciones anteriores, por lo menos una característica es latente y no viene expresada fenotípicamente en un miembro de un pedigrí.

La cepa JB-2, como JB 2-VIS, ha sido depositada bajo el Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC), en Manassas, Virginia, y se le ha asignado el número de depósito ATCC 76072. Esta cepa fue depositada en 1990, y transferida al depósito de patentes el 30 de abril de 1993. La cepa depositada se mantendrá en el depósito por lo menos 30 años a partir de la fecha de presentación de la solicitud, o durante la vida efectiva de la patente, lo que sea más prolongado, y será sustituida si fuera necesario. Esta cepa será hecha pública irrevocablemente y sin restricción o condición tras la emisión de una patente.

Del mismo modo, la Cepa JB-28 ha sido depositada bajo el Tratado de Budapest en la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) en Peoria, Illinois, y se le ha asignado el número de depósito NRRL 50407. Este depósito fue efectuado el 13 de julio de 2010. La cepa depositada se mantendrá en el depósito por lo menos durante 30 años a partir de la fecha de presentación de la solicitud, o durante la vida efectiva de la patente, lo que sea más prolongado, y será sustituida si es preciso. Esta cepa será hecha pública irrevocablemente y sin restricción o condición tras la emisión de una patente.

Otros aspectos de la divulgación pueden conseguirse proporcionando cepas de champiñón *Agaricus bisporus* híbridas con una característica seleccionada de las del grupo compuesto por ausencia de esporas, esporulación reducida, desarrollo incompleto de esporas, liberación incompleta de esporas y lamelas más pálidas incorporada a ellas. Las características se han definido aquí más arriba. Más concretamente, los champiñones *Agaricus bisporus* híbridos pueden obtenerse procediendo a la fusión de un cultivo silvestre (o cultivos descendientes o derivados de él) capaz de transmitir y presumiblemente incorporando material genético determinante, la característica(s) de no esporulación, esporulación reducida, desarrollo incompleto de esporas, liberación incompleta de esporas, y/o lamelas más pálidas, con al menos un segundo cultivo. En una realización, el cultivo silvestre de *Agaricus bisporus* puede ser una cepa tetraspórica silvestre. En otra realización, el cultivo silvestre de *Agaricus bisporus* puede ser extraído de la clase que incluye cultivos JB-2 y JB-28, y/o progenie descendiente o derivada de cualquiera de los anteriores cultivos, con un segundo cultivo *Agaricus bisporus*, donde los champiñones producidos por los cultivos de la divulgación tienen una característica expresada y un fenotipo sin esporas, o una característica latente expresada en por lo menos algunos de sus descendientes. En una realización, las cepas híbridas no utilizan un homocarión MI como progenitor directo e inmediato.

En una o más realizaciones, cualquiera de las anteriores cepas híbridas puede ser incorporada en materiales seleccionados del grupo compuesto por champiñones frescos o procesados, esporas de champiñón, micelio de champiñones, preparaciones y extractos de champiñón, inóculo de champiñón, inóculo de cobertura, suelo de cobertura, compost inoculado, compost colonizado y compost postcosecha. En otras realizaciones, cualquiera de las anteriores cepas híbridas puede ser subdividida en una parte componente seleccionada de entre el micelio vegetativo, fragmentos de micelio, puntas de hifa, esporas, protoplastos, proteínas, ácidos nucleicos, materia de pared celular, citoplasma y componentes y extractos celulares.

En otra realización, la presente invención proporciona además un método para obtener descendencia viable recombinante homocariótica o heterocariótica de una cepa sin esporas de un hongo basidiomiceto, comprendiendo el paso de la repartición celular inducida del contenido de células postmeióticas en cultivos miceliales de crecimiento vegetativo. En una realización, el paso de la repartición celular inducida

se lleva a cabo mediante un método de formación y regeneración de protoplastos. En otra realización, el paso de repartición celular inducida se lleva a cabo por reducción mecánica. En una realización, las células postmeióticas son hifas vegetativas desarrolladas de explantes de tejido lamelar. En otra realización, las células postmeióticas son basidios.

## 5 Descripción breve de las ilustraciones

La Fig. 1 es una fotografía de un experimento de impresión de esporas mostrando la comparación de la falta de capacidad de esporulación entre una cepa de champiñón sin esporas J10263, y la capacidad de esporulación de un champiñón de la cepa de control Sylvan SB-65. En este ejemplo, el papel muestra todas las esporas liberadas de cada cabeza en un periodo inicial de 23,5 horas. Los límites trazados con tinta muestran el contorno de cada cabeza en relación con el papel.

La Fig. 2 es una fotografía de un experimento de impresión de esporas mostrando la comparación de la falta de capacidad de esporulación entre un champiñón de la cepa sin esporas J10263, y la capacidad de esporulación de un champiñón de las cepas comerciales de control Sylvan 856 y 8 IB. El intervalo de muestreo de esporulación fue aproximadamente de 24 horas.

## 15 Realización preferente para aplicar la invención

En el transcurso del desarrollo del programa de cría propiedad de Sylvan con cepas de *Agaricus bisporus* incorporando germoplasma nuevo silvestre, y germoplasma comercial establecido, se produjo una situación inesperada y fortuita. Todas las líneas reproductoras que se utilizaron esporulaban normalmente. Se observó con sorpresa, contrariamente a lo esperado y previsto, que esas líneas reproductoras podían dar un fenotipo sin esporas a la descendencia. Se sabe que la mayoría de fusiones entre la variedad taxonómica bispórica *bisporus* y la variedad taxonómica tetraspórica *burnettii* producen champiñones típicos esporulantes. No obstante, en raras ocasiones se observó una ausencia sin precedentes de esporulación en las lamelas de champiñones producidos por algunas cepas creadas de este tipo híbrido intervarietal.

Los primeros ejemplos de no esporulación en descendencia de champiñones *Agaricus bisporus* híbridos se observaron en el híbrido Sylvan J258 patentado, que tenía como un "progenitor homocarión", un homocarión obtenido de entre esporas del híbrido intervarietal registrado Sylvan J102 de primera generación, y como un segundo "progenitor homocarión", un homocarión de una cepa comercial (S-381). J102 tiene la cepa tetraspórica JB-2 como un progenitor y la cepa híbrido S600 patentada de Sylvan como el otro progenitor. Como se ha indicado previamente, JB-2 (como JB 2-MS) fue depositada en la ATCC el 2 de mayo de 1990, donde recibió la designación ATCC 76072. Fue convertida por la ATCC a un depósito bajo el Tratado de Budapest el 30 de abril de 1993 y continuará disponible públicamente según el Tratado de Budapest durante como mínimo la vida efectiva de cualquier patente que derive de aquí.

Para crear esas y otras cepas híbridas nuevas, un recipiente, como una placa de petri conteniendo un medio microbiológico estéril, como Agar de Patata y Dextrosa (suministrado por Difco), es inoculado asépticamente primero con un subcultivo de un "progenitor homocarión", seguido por una segunda inoculación aséptica de un segundo "progenitor homocarión", y dejando los dos inóculos en estrecha proximidad física. Los dos cultivos se mantienen en una incubadora limpia a 24C, permitiendo el crecimiento de hifas lejos de los puntos de inoculación. Se mantienen las condiciones para que hifas de los dos cultivos haploides crezcan en proximidad física entre sí. En ese punto se iniciará el proceso de anastomosis, incluyendo el crecimiento de hifas compatibles directamente entre sí, y culminando con el contacto físico y unión, o fusión, de pares de hifas compatibles. Según progresa la fusión, la pared celular en el centro de la zona de contacto se desmorona, dejando expuestas las dos membranas plasmáticas, que se fusionan también para abrir un canal citoplásmico entre las dos hifas. El establecimiento de la condición de continuidad citoplásmica es denominado plasmogamia, y da como resultado la asociación de dos núcleos haploides compatibles sexualmente en una única célula hifal. Las hifas que crecen de esa célula de fusión estarán pobladas por ambos núcleos, donado cada uno por uno de los dos homocariotes, y se establece así el crecimiento heterocariótico (n+n) de la nueva cepa híbrida. Este micelio híbrido puede ser transferido entonces a subcultivos tomados de la zona de fusión, para obtener un cultivo de la nueva cepa híbrida.

El segundo conjunto de ejemplos de no esporulación en descendencia de champiñones híbridos se registró en varios híbridos Sylvan registrados, en los que uno u otro de varios homocariotes obtenidos de esporas de la cepa J453 híbrida intervarietal de primera generación se utilizó como un "progenitor homocarión", y el homocarión MI derivado comercialmente fue el segundo "progenitor homocarión". J453 tiene la cepa tetraspórica silvestre JB-28 como un progenitor, y la cepa comercial S-381 como el otro progenitor. El cultivo homocariótico J453-s7, un progenitor de la cepa sin esporas J1901 de Sylvan, ha sido depositado en la NRRL bajo el Tratado de Budapest, y se le ha asignado el número de depósito NRRL 50406. Esta cepa fue depositada el 13 de julio de 2010. Las cepas biológicas depositadas señaladas aquí se mantendrán en el depósito durante como mínimo 30 años, o durante la vida efectiva de la patente, lo que sea más prolongado, y serán sustituidas si es necesario. Esta cepa será hecha pública irrevocablemente y sin restricción o condición tras la emisión de una patente. Los híbridos en los que se observó no esporulación incluyen J1901, J1902, J1906, J1923, y J1928; todos ellos producen champiñones de cabeza blanca.

Los champiñones producidos por ambas clases de cepas híbridas fueron macroanatómicamente normales, y por tanto fueron “verdaderos champiñones”. Por consiguiente, se supone que se podría observar esporulación normal en ellos.

5 Las cepas de champiñón sin esporas de la última clase (es decir, híbridos entre progenitores J453 y MI) fueron evaluadas y se observó que no eran adecuadas para la industria de los champiñones comestibles comerciales. Una deficiencia fue una tendencia a presentar hasta un grado excesivo, en comparación con cepas blancas comerciales control, un cambio de coloración tras ser manipulados. En la industria alimentaria de los champiñones esta característica no deseable es denominada “moretones”. No obstante, una de tales cepas híbridas cruzadas, la J1901, resultó lo suficientemente prometedora como para evaluar su idoneidad para fines no alimentarios. En experimentos no relacionados con el programa de cría cruzada de la cepa del cesionario registrado para el desarrollo de nuevos champiñones híbridos comestibles, se determinó que la cepa J1901 podía ser transformada con ADN exógeno de fuentes no champiñones, y que genes exógenos no de champiñones podían ser expresados para producir proteínas heterólogas en la cepa J1901. La cepa sin esporas *Agaricus* J1901 fue evaluada con este propósito, porque es deseable y en ocasiones requerida la contención de organismos genéticamente modificados, y la ausencia de esporas transportadas por el viento hace que la contención resulte más sencilla y segura. Este trabajo sobre la transformación utilizando ADN exógeno fue descrito en Velcko Jr. et al. (2004: Mush. Sci. 16: 591-597). Aunque J1901 es una cepa híbrida verdadera, resultado de una fusión definida entre dos homocariotes, las posteriores cepas derivadas transformadas por ingeniería, modificadas genéticamente, no son productos de un posterior proceso de cruce, y por consiguiente no son en sí mismas nuevas cepas híbridas.

25 Antes de las observaciones realizadas en esos dos casos indicados más arriba, se conocían cepas sin esporas de *Agaricus bisporus*. De hecho, teniendo en cuenta que todas las cepas ancestrales o parentales silvestres y comerciales representadas en los dos pedigrís citados anteriormente han esporulado normalmente, se esperaba que toda descendencia híbrida desarrollada esporulara también normalmente. La observación de ausencia de esporas que surge *de novo* en estos casos sugiere solamente que la característica de ausencia de esporas observada en esos dos pedigrís puede tener un carácter recesivo.

30 Para investigar el carácter hereditario de la característica de ausencia de esporas en otros híbridos incorporando otras cepas, el homocarión J453-s7 se fusionó con tres homocariotes: 56B-4186, TS5-s4, y TS5-sl9. Los tres híbridos resultantes (denominados J10259, J10261, y J10263 respectivamente) produjeron champiñones de cabeza marrón, macroanatómicamente típicos, con lamelas y no esporulantes. Tres cruces correspondientes del homocarión comercial UI-2 con los mismos otros tres homocariotes produjeron champiñones lamelados esporulantes. Así J453-s7 es un ejemplo de un homocarión de la presente invención que puede conferir el carácter de no esporulación en la siguiente generación, en por lo menos algunos cruces incluyendo los ejemplos estudiados hasta la fecha.

35 Para utilizar esos nuevos híbridos sin esporas en extensiones de los pedigrís en posteriores generaciones, se deben superar dos obstáculos. Como se ha señalado anteriormente, sin la producción de esporas no existe fuente de descendencia que se produzca naturalmente de la que aislar homocariotes postmeióticos recombinados. Nuevos estudios sobre el *Coprinopsis cinereus*, otro hongo basidiomiceto que forma champiñones, ha demostrado que muchas mutaciones que causan ausencia de esporas actúan sobre el ciclo celular impidiendo que la meiosis se produzca o complete normalmente, evitando que se produzca toda recombinación genética. En tales cepas, no solo la ausencia de esporas, sino también la ausencia de núcleos postmeióticos recombinados, impide la obtención de descendencia recombinada sexualmente con nuevos genotipos requeridos para la cría de nuevas y mejoradas cepas.

40 No se podía saber si las cepas sin esporas habrían conservado o no capacidad meiótica, ni si el ciclo meiótico avanzaría siguiendo un calendario que permitiría la generación de protoplastos conteniendo núcleos postmeióticos individuales. No obstante, se desarrolló e investigó un método para obtener tal descendencia postmeiótica, incluyendo homocariotes y heterocariotes, haciendo y regenerando enzimáticamente protoplastos de células hipotéticamente postmeióticas de lamelas axénicas de champiñones *A. bisporus* no esporulantes. Para poner en práctica nuestro método, básicamente como indica Kerrigan et al., Mycologia 84: 575-579 (1992), aplicado a lamelas más que a hifas, se prepara y esteriliza un tampón conteniendo un agente osmótico, como sucrosa 0,6 M, y se añade una cantidad efectiva de un enzima que digiere la pared celular como (en aquel momento) Novozyme 234 (Novo Labs).

45 A partes alícuotas de esta solución en pequeños tubos, por ejemplo tubos de microcentrifugación de 1,5 ml, se añaden trozos de lamela, de aproximadamente 3-5 mm<sup>2</sup>, obtenidos asépticamente de lamelas recubiertas todavía por el velo, de champiñones de una cepa sin esporas como la J10263. Se utilizan lamelas porque contienen el único tipo de células postmeióticas, los basidios, presentes en cepas sin esporas. Se procede a la incubación a una temperatura específica para la preparación enzimática durante un intervalo de tiempo suficiente, por ejemplo a temperatura ambiente durante aprox. 60 minutos. Los protoplastos (= pequeñas subunidades citoplásmicas “reparticionadas” limitadas por membranas plasmáticas), liberados de las hifas perforadas enzimáticamente y suspendidas en el tampón, son separados suavemente por filtración, a través de lana de vidrio y un paño de nylon de malla fina, de los restos de pared celular lamelar, y son recogidos por centrifugación suave en pequeños tubos, luego se

separan del enzima activo pipeteando la solución enzimática superpuesta, son resuspendidos en más solución tampón, y son transferidos suave y asépticamente a medios nutrientes sólidos estabilizados osmóticamente, como PDA + sucrosa 0,6M en placas petri. Los protoplastos se mantienen en una incubadora limpia a 24 C durante varios días hasta que empiezan a regenerarse las paredes celulares y se reanuda el crecimiento hifal. Se aíslan asépticamente las colonias regenerantes individuales, y se distribuyen individualmente para su análisis y caracterización, por ejemplo por comprobación de fertilidad (cultivo) (para identificar homocariotes), y por huellas digitales moleculares utilizando marcadores codominantes (para identificar genotipos recombinados postmeióticos).

Este método fue aplicado a las cepas Sylvan marrones híbridas no esporulantes J10259 y J10263. La cepa J10263 ha sido depositada según el Tratado de Budapest en la NRRL, y se le ha asignado el número de depósito NRRL 50408. El depósito fue realizado el 13 de julio de 2010. También éste se mantendrá en el depósito durante por lo menos 30 años, o durante la vida efectiva de la patente, lo que sea más prolongado, y se sustituirá si es necesario. Esta cepa será hecha pública sin restricción o condición tras la emisión de una patente.

Se ha conseguido con éxito la obtención de protoplastos de champiñones sin esporas producidos por las cepas J10263 y J10259, y regenerándolos anéxicamente en cultivos puros. Utilizando múltiples marcadores moleculares, se desarrollaron huellas digitales genéticas de los cultivos regenerantes de protoplastos, y se descubrieron cultivos individuales homocarióticos y heterocarióticos con genotipos recombinados que habían redistribuido los alelos parentales durante la meiosis, como se muestra en las Tablas 1 y 2 más abajo.

**Tabla 1**

**Genotipos de siete descendencias homocarióticas postmeióticas de híbrido Sylvan J10263**

	1	2	8	14	28	29	30	J453-S7	TS5-s19
Marcador:	A	A	A	A	A	A	A	A	[B]
PR6-HaeIII									
p33n5-P	B	B	B	A	A	B	A	A	[B]
PR2-HaeIII	A	A	A	A	B	B	B	A	[B]

La Tabla 1 muestra los genotipos 3-locus de siete cultivos homocarióticos obtenidos de protoplastos de lamela regenerados de champiñones sin esporas producidos por la cepa híbrida Sylvan J10263. Los protoplastos fueron preparados y regenerados como se describe más arriba. **A** y **B** son designados arbitrariamente y se les asignan alelos en los tres loci de marcador. Todos los marcadores son de dominio público y son empleados habitualmente por expertos en la materia. Los marcadores PR2 y PR6 fueron indicados primero por Callac et al., FEMS Microbiol. Lett. 146: 235-240 (1997). El marcador P33n5-P es una versión amplicón PCR del marcador RFLP denominado p33n5, indicado por Kerrigan et al., Genetics 133: 225-236 (1993), y llamado también en ocasiones PR-12 (P. Callac, com. pers.). Los genotipos de los "homocariotes parentales" (de J10263) J453-s7 (**=AAA**) y TS5-sl9 (=BBB, inferidos) se muestran a la derecha.

El número de genotipos posibles en tres marcadores no ligados entre núcleos postmeióticos y homocariotes es ocho (= dos a la tercera potencia; adviértase que se ha documentado algún vínculo entre PR2 y PR6 (Callac et al. 1997), lo que significa que cuatro de los ocho posibles genotipos resultantes se espera que sean relativamente más raros). Los dos genotipos "homocarión parental" (**AAA**, **BBB**) deberían estar presentes cada uno en el caso más simple en un octavo (12,5%) de los núcleos y homocariotes recombinados postmeióticos, pero no pueden ser distinguidos de los núcleos premeióticos en base a solo tres marcadores.

El regenerante de protoplastos N° 14 es un ejemplo de uno de esos dos genotipos (AAA). No obstante, de forma significativa, entre los seis regenerantes de protoplastos restantes se recuperaron en este experimento tres genotipos haploides distintos, nuevos y recombinados meióticamente: ABA en los N° 1, 2, y 8, AAB en los N° 28 y 30, y ABB en el N° 29. Por tanto, en esta pequeña muestra de siete homocariotes regenerados de lamelas de protoplastos sin esporas, se obtuvieron cuatro genotipos, tres de los cuales no coincidían con ninguno de los dos genotipos "homocarión parental". Esto demuestra que se produjo recombinación meiótica antes del proceso de formación de protoplastos, y que ese proceso repartió los cuatro núcleos postmeióticos de las células basidiales en nuevos compartimientos viables conteniendo menos núcleos, muy probablemente un núcleo haploide. Por tanto, nuestro método proporciona descendencia homocariótica postmeiótica de champiñones sin esporas. Aunque la Tabla 1 no presente datos sobre descendencia heterocariótica recombinante, se obtuvieron varias entre los regenerantes de protoplastos en este experimento. Esta técnica, aplicada a cepas no esporulantes,

incluyendo las descritas más arriba, subsana dos de los principales obstáculos para la cría de cepas sin esporas. Cepas homocarióticas obtenidas como se ha descrito más arriba han sido utilizadas en posteriores cruces con otras cepas diversas.

## **TABLA 2**

### **5 Genotipos de cuatro descendencias postmeióticas del híbrido Sylvan J10259**

Regenerante de protoplastos N°

2356J453-S7 56B-4186

Marcador:

PR6-HaeIIICCAHAC

10 PR7-RsaIHAHCAC

La Tabla 2 muestra los genotipos 2-locus de cuatro cultivos homocarióticos obtenidos de protoplastos regenerados de lamelas de champiñones sin esporas producidos por la cepa híbrida Sylvan J10259. Los protoplastos fueron preparados y regenerados como se ha descrito más arriba. A y C se designan arbitrariamente y se les asignan alelos en los dos loci de marcador. H designa al fenotipo heteroalélico de A+C, presente en J10259. Los marcadores son todos de dominio público, y son utilizados habitualmente por los expertos en la técnica. Los marcadores PR6 y PR7 fueron indicados primero por Callac et al., FEMS Microbiol. Lett. 146: 235-240 (1997). Los genotipos de los "homocariotes parentales" (de J10263) J453-s7 (=AAA) y 56B-4186 (=CCC) se muestran a la derecha. El regenerante N° 3 tiene un genotipo homoalélico consistente con que sea un homocarión, y es un homocarión no parental, por consiguiente postmeiótico recombinado. Los regenerantes N° 2, 5 y 6 son cada uno de ellos heteroalélicos en uno de los loci de marcador, pero homoalélicos en el otro locus, y cada uno de los tres es único. Representan descendencia heterocariótica recombinada que también es útil en métodos de selección para la mejora de la cepa *Agaricus bisporus*, por ejemplo en enfoques de selección de aislados de espóra única (SSI).

Se investigó la expresión de la característica de ausencia de esporas en varios híbridos sin esporas producidos según los métodos divulgados más arriba. Para realizar las observaciones, se extirpó una lamela que se colocó plana sobre un portaobjetos de microscopio de vidrio para hacer un "montaje seco" sin cubierta. Utilizando un microscopio óptico compuesto con objetivos de un aumento de 20X o 25 X, se pudieron observar los ápices basidiales. En las cepas esporulantes, pudieron observarse esterigmas y esporas en varios estadios de desarrollo en los ápices basidiales. En las cepas "sin esporas" como se define aquí, no se pudo observar un desarrollo normal de esporas. En lugar de ello se observó un espectro de expresión de la característica de "ausencia de esporas". En algunos híbridos, se observó escaso o nulo desarrollo de esterigmas o inicios de esporas en el vértice del basidio. En otros híbridos, se observó un grado limitado de desarrollo de esporas; pero las esporas fueron diminutas, no totalmente desarrolladas, y no fueron liberadas de los basidios como lo serían esporas normales. La esporulación en champiñones con lamelas viene definida por el desarrollo (normal, lo que significa característico y viable) y la liberación con éxito de esporas del basidio al aire. Se estableció la hipótesis de que los antecedentes genéticos específicos de cada uno de los asociados en el híbrido determinan el grado preciso de expresión de la característica de ausencia de esporas.

Se ha confirmado en numerosos experimentos que los híbridos sin esporas que hemos obtenido no producen un depósito de esporas detectable. Para hacerlo, se suspendieron sobre papel blanco muestras de cabezas de champiñón J10263 fresco los días 1, 2, 3, 4 y 5 tras la ruptura velar, sin contacto con el papel. Se colocó una cubierta de plástico permitiendo una ligera ventilación, bloqueando las corrientes de aire sobre la cabeza del champiñón y el papel. Los champiñones de control SB-65 esporularon normalmente, y las esporas de color marrón oscuro pudieron observarse fácilmente sobre el papel blanco. No se pudo observar depósito de esporas procedentes de los champiñones no esporulantes en ninguna fase del desarrollo. Esto se repitió a intervalos semanales en tres "descargas" sucesivas de champiñones de una única cosecha. En la Fig.1 y la Fig. 2 se muestran ejemplos de los resultados con la cepa sin esporas J10263, en comparación con champiñones de la cepa de control SB-65. Resultados similares de versiones simplificadas del experimento anterior con cepas sin esporas J1901 y J10259 tampoco produjeron huellas de esporas visibles sobre el papel blanco. Estos resultados confirman la condición de ausencia de esporas que hemos observado bajo el microscopio en diversas cepas de esos pedigrís.

Por tanto, ha quedado demostrado el éxito de la aplicación de un método práctico para el desarrollo de cepas no esporulantes de champiñones *Agaricus bisporus* empleando germoplasma silvestre capaz de otorgar una característica de ausencia de esporas en la descendencia, presumiblemente incorporando material genético que determine específicamente la característica de ausencia de esporas. Se ha demostrado que se pueden producir según este método, tanto champiñones de cabeza blanca como de cabeza marrón no esporulantes. También se ha demostrado que se ha desarrollado un método adicional para obtener descendencia homocariótica postmeiótica recombinante de champiñones *Agaricus* no

esporulantes, y que pueden obtenerse con éxito cruces de nueva generación utilizando esos homocariotes como progenitores en nuevos cruces. Este último método puede ser empleado en la obtención de descendencia homocariótica recombinante de basidiomas sin esporas de otros géneros, y potencialmente de todos los géneros, de basidiomicetos produciendo basidiomas carnosos, incluyendo champiñones con lamelas

5

Se entenderá además que el alcance de la invención no se limita necesariamente a métodos para la producción de cepas o cultivos de champiñones que carezcan de esporas, sino más bien a esos cultivos o cepas que se producen a partir de cultivos con por lo menos un progenitor, linaje o derivado que carece de esporas.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar si un cultivo de *Agaricus bisporus* contiene un determinante genético para por lo menos una característica de ausencia de esporas, seleccionada del grupo compuesto por no esporulación, esporulación reducida, desarrollo incompleto de esporas, liberación incompleta de esporas y lamelas más pálidas, comprendiendo este método:
- 5 facilitar la fusión vía anastomosis y plasmogamia entre un primer cultivo de *Agaricus bisporus* y un segundo cultivo de *Agaricus bisporus*, donde el segundo cultivo es un homocarión seleccionado del grupo compuesto por un cultivo *Agaricus bisporus* silvestre JB2, un cultivo silvestre *Agaricus bisporus* JB28, un cultivo derivado de JB2 o JB28, un cultivo descendiente de JB2 o JB28, WQ, S-381, S-600, M1, 56B-4186, TS5 s4 y cultivos descendientes o derivados de WQ, S-381, S-600, M1, 56B-4186 y TS5 s4, y que además se identifica como germoplasma capaz de transmitir a la descendencia por lo menos una característica de ausencia de esporas, seleccionada del grupo compuesto por no esporulación, esporulación reducida, desarrollo incompleto de esporas, liberación incompleta de esporas y lamelas más pálidas;
- 10 donde si la cepa híbrida de dicha fusión tiene una característica expresada de un fenotipo sin esporas, el primer cultivo contiene un determinante genético para por lo menos una característica de ausencia de esporas seleccionada del grupo compuesto por no esporulación, esporulación reducida, desarrollo incompleto de esporas, liberación incompleta de esporas y lamelas más pálidas.
- 15
2. Un método para la producción de una cepa híbrida de champiñón de *Agaricus bisporus* que contiene un determinante genético para por lo menos una característica de ausencia de esporas seleccionada del grupo compuesto por no esporulación, esporulación reducida, desarrollo incompleto de esporas, liberación incompleta de esporas y lamelas más pálidas, comprendiendo el método:
- 20 facilitar la fusión vía anastomosis y plasmogamia entre un primer cultivo de *Agaricus bisporus* y un segundo cultivo de *Agaricus bisporus* donde el segundo cultivo es un micelio fúngico seleccionado del grupo de micelios que son homocarióticos, heterocarióticos, haploides y aneuploides, y de preferencia es homocariótico, que ha sido seleccionado del grupo compuesto por un cultivo silvestre de *Agaricus bisporus* JB2, un cultivo silvestre de *Agaricus bisporus* JB28, un cultivo derivado de JB2 o JB28, un cultivo descendiente de JB2 o JB28, WQ, S-381, S-600, M1, 56B-4186, TS5 s4 y cultivos descendientes o derivados de WQ, S-381, S-600, M1, 56B-4186, y TS5 s4 y que se identifica además como germoplasma capaz de transmitir a la descendencia por lo menos una característica de ausencia de esporas, seleccionada del grupo compuesto por no esporulación, esporulación reducida, desarrollo incompleto de esporas, liberación incompleta de esporas y lamelas más pálidas; donde la cepa de champiñón híbrida de *Agaricus bisporus* contiene un determinante genético para por lo menos una característica de ausencia de esporas.
- 25
3. Utilización de una cepa de *Agaricus bisporus* capaz de transmitir a la descendencia por lo menos una característica de ausencia de esporas seleccionada del grupo compuesto por no esporulación, esporulación reducida, desarrollo incompleto de esporas, liberación incompleta de esporas y lamelas más pálidas en el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
- 30
4. Un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o el uso de la reivindicación 3, donde cualquiera de los cultivos es seleccionado del grupo compuesto por cultivos heterocariones, homocariones, aneuploides y cariotípicamente indeterminados.
- 35
5. Un método de una de las reivindicaciones 1 a 2 y 4, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, comprendiendo además inducir la repartición del contenido de células postmeióticas de un cultivo sin esporas para derivar cualquier cultivo utilizado para permitir la fusión.
- 40
6. Un método como se reivindica en la reivindicación 5, donde la repartición celular inducida se consigue mediante un método de formación y regeneración de protoplastos.
- 45
7. Un método para obtener descendencia homocariótica o heterocariótica recombinante viable de un cultivo sin esporas de un hongo basidiomiceto, comprendiendo:
- 50 inducir la repartición del contenido de células postmeióticas en cultivos miceliales de crecimiento vegetativo.
8. Un método como se reivindica en la reivindicación 7, donde la inducción de la repartición de contenido celular se consigue mediante:
- 55 - un método de formación y regeneración de protoplastos; o
- reducción mecánica.
9. Un método como se reivindica en las reivindicaciones 7 u 8, donde las células postmeióticas son:
- hifas vegetativas desarrolladas a partir de explantes de tejido lamelar; o
- basidios.

1/2

FIG. 1



