

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035884**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.27

(21) Номер заявки
201791591

(22) Дата подачи заявки
2016.01.22

(51) Int. Cl. *C12N 1/14* (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 15/00 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(54) **НОВЫЕ ГИБРИДНЫЕ ШТАММЫ ГРИБА AGARICUS BISPORUS**

(31) **15305073.7**

(32) **2015.01.23**

(33) **EP**

(43) **2018.01.31**

(86) **PCT/EP2016/051393**

(87) **WO 2016/116632 2016.07.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СОМИСЕЛЬ (FR)

(72) Изобретатель:
Родьер Анн (FR), Раклидж Ричард (GB), Битодо Стефани (FR)

(74) Представитель:
Осипов К.В., Хмара М.В., Ильмер Е.Г., Пантелеев А.С., Новоселова С.В., Липатова И.И., Дощечкина В.В. (RU)

(56) **US-A1-2010154079**

(57) Изобретение относится к области создания штаммов микроорганизмов, более конкретно, к созданию гетерокариотических гибридов грибов вида *Agaricus bisporus*. Более конкретно, изобретение относится к гибридным белым штаммам *Agaricus bisporus*, имеющим улучшенные характеристики для лиц, обращающихся с ними (а именно для производителей, переработчиков и потребителей). Данные гибриды, например, представляют собой депонированные штаммы CNCM I-4945 и I-4946, полученные при скрещивании депонированной линии CNCM I-4948. Изобретение относится к штаммам, происходящим от указанных гибридов, а также к потомкам, происходящим от указанных гибридов.

B1

035884

035884

B1

Область техники

Данное изобретение относится к области создания штаммов микроорганизмов, более конкретно, к созданию гетерокариотических гибридов грибов вида *Agaricus bisporus* (шампиньон двуспоровый). Еще более конкретно, данное изобретение относится к гибридным штаммам белого шампиньона *Agaricus bisporus*, обладающих улучшенными характеристиками для использующих его лиц (в частности, для производителей, переработчиков и потребителей). Данные гибриды, например, представляют собой депонированные штаммы CNCM I-4945 и I-4946, полученные при скрещивании депонированной линии CNCM I-4948. Данное изобретение относится к штаммам, полученным от указанных гибридов, а также к потомству, происходящему от указанных гибридов.

Предшествующий уровень техники

Agaricus bisporus (Lange) представляет собой микроорганизм (царство: грибы, отдел: Basidiomycota, класс: Agaricomycetes, порядок: Agaricales, семейство: Agaricaceae, род: *Agaricus*, секция: *Bivelares*, вид: *bisporus*). Данный микроорганизм остается наиболее широко культивируемым съедобным видом грибов, на долю которого приходится 38% мирового производства (веб-сайт международного общества изучения грибов (International Society for Mushroom Science, ISMS)). Грибы в основном продают в свежем или в переработанном виде (консервированными, пастеризованными или замороженными). Они являются ценным компонентом диеты благодаря привлекательному вкусу, запаху и питательным свойствам (белки, неперевариваемые волокна, витамины, минералы, аминокислоты) (Beelman et al., 2008). Они также обладают целебными свойствами, включая контроль над онкологическими и метаболическими заболеваниями (Chen & Kanaya, 2012).

В современном мире потребление грибов способствовало развитию индустрии с оборотом в несколько миллионов долларов (Morin et al., 2012). Если быть более точными, мировое производство грибов в 2013 г. достигло 7959979 т (статистическая база данных Организации по продовольствию и сельскому хозяйству, 2013).

Поскольку круглогодичное производство грибов в контролируемых условиях в закрытых помещениях на специализированных фабриках требует больших вложений, любые улучшения продуктивности или эффективности (прибыльности) приветствуются производителями. Повышение урожайности или уменьшение продолжительности цикла выращивания может положительно сказаться на обороте предприятий. Если брать шире, одновременное улучшение обоих факторов может потенциально оказать очень существенное финансовое воздействие и, таким образом, будет экономически целесообразным.

Первые истинно гибридные штаммы *A. bisporus*, полученные путем методичной селекции в 1980 г. в Голландии (Horst U1 - Horgonda и Horst U3 - Horgwitu), имели большой успех с коммерческой точки зрения и существенно повлияли на производство и маркетинг шампиньонов. На данный момент большинство, если не все промышленные разновидности *A. bisporus* var. *bisporus* с белыми шляпками, по существу, являются копиями (клонами) или производными Horst U1 (Foulongne-Oriol et al., 2011, Sonnenberg et al., 2011), а *A. bisporus* на самом деле является монолинейной культурой (Savoie et al., 2013), по меньшей мере, для белых штаммов. Это имеет особое значение на таких территориях, как Европейские страны, где на рынке очевидно преобладают промышленные виды с белыми шляпками. В 2013 г. почти все виды промышленных белых штаммов показали разительное сходство с Horst U1 на генетическом уровне (Savoie et al., 2013).

Однако отсутствие разнообразия культивируемых штаммов грибов расценивается как существенный риск и угроза для данной культуры. Действительно, из-за отсутствия на данный момент генетического разнообразия среди промышленных штаммов, не следует ожидать истинных различий по агрономическим характеристикам, качеству или производительности переработки грибов при их сравнении в одинаковых условиях. Кроме того, отсутствие генетического разнообразия среди промышленных штаммов создает существенный риск генетической эрозии (внезапной дезадаптации применительно к продукции, сбору или использованию), сказывающейся на управлении рисками, коммерческом риске и беспереывности поставок. Таким образом, отсутствие вариативности является риском с санитарной и экономической точек зрения. В связи с этим, несколько компаний запустили программы селекции, целью которых было получение нового генетического материала, способного обеспечить пользователям (производителям, переработчикам и потребителям) новые преимущества и возможности (диверсификация, сегментация).

Было предпринято несколько попыток селекции и выведения на рынок новых разновидностей белых шампиньонов (US 5832659, US 8663969), однако они оказались не очень успешными. Одним из препятствий к созданию белых штаммов является то, что очень большая доля диких разновидностей имеет коричневую окраску шляпок, которая является результатом положительного неполного доминирования и сложного взаимодействия между генами основного локуса и нескольких минорных локусов (Foulongne-Oriol et al., 2012). Вследствие этого, требуется по меньшей мере два поколения для того, чтобы вернуть селекционному материалу белую окраску шляпок. Следует также учитывать другие характеристики, такие как реакция на поверхностное травмирование (Gao et al., 2013), срок хранения и др. Таким образом, создание белых штаммов гораздо сложнее по сравнению с коричневыми штаммами.

На основе биологических, фенотипических и генетических параметров идентифицировали две раз-

ных ботанических разновидности *Agaricus bisporus*, имеющих другой тип жизненного цикла, нежели *A. bisporus* var. *bisporus*. *A. bisporus* var. *burnettii* (Callac, 1993) и *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* (Callac et al., 2003) имеют преимущественно гетероталлический и гомоталлический тип жизненного цикла соответственно. Это позволяет легче получить гомокарион благодаря более высокой относительной частоте регенерации из спорового отпечатка (Kerrigan et al. 1994). Однако, несмотря на то, что они демонстрируют способность к перекрестному оплодотворению с *A. bisporus* var. *bisporus*, их применение в схемах селекции оказалось разочаровывающим из-за существенных фенотипических недостатков, передающихся их потомству, требующих их исправления у последующих поколений для возврата к приемлемому для промышленности фенотипу.

Таким образом, рынок белых шампиньонов и, в частности, шампиньонов *A. bisporus* находится в ожидании инноваций, которые приведут к улучшению и диверсификации на любой стадии производственного процесса. Указанные инновации могут помочь производителям повысить рентабельность (добиться более высокой урожайности, более короткого жизненного цикла, более раннего сбора, большей простоты и скорости сбора и т.д.) и/или удовлетворить запросы со стороны цепи сбыта (лучший внешний вид, улучшенный или уникальный вкус, более длительная сохранность требуемых внешних характеристик и т.д.). В частности, целесообразно создать штаммы шампиньонов, у которых грибы первой волны будут иметь лучший внешний вид, например менее выраженную чешуйчатость шляпки и/или более белую окраску. Улучшение других свойств может сделать грибы более подходящими для механического сбора, консервирования и/или переработки пищевых продуктов. Наконец, во избежание трансмиссии вирусных заболеваний на предприятиях, где выращивают грибы, важно идентифицировать разновидности, способные останавливать распространение вирусов, т.е. вегетативно несовместимые грибы.

Данное изобретение удовлетворяет данные потребности, предлагая культуры новых гибридных штаммов шампиньона *A. bisporus*, демонстрирующие ряд улучшенных характеристик, выгодных производителям и потребителям.

В результате скрининга агрономической оценки, фенотипической оценки и выхода консервированного продукта у ряда потомков белых шампиньонов *A. bisporus* авторы изобретения обнаружили интересный гибрид, обладающий: i) высокой средней массой и ii) фенотипом, подходящим для механического сбора (грибы растут по-отдельности, хорошо распределены по поверхности грядки, ножка прямая) и/или для потребителя (гладкая шляпка белого цвета), и iii) увеличенным выходом консервированного продукта и агрономической оценкой (в том числе в крупных клинических испытаниях) по сравнению с существующими промышленными разновидностями. Кроме того, указанные гибриды вегетативно несовместимы с существующими промышленными штаммами белых шампиньонов. Другими словами, данные гибриды, предложенные в изобретении, демонстрируют улучшенную агрономическую оценку в сочетании с соответствующим фенотипом, удовлетворяющие производителей, переработчиков и потребителей.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Для ясного и полного понимания описания и формулы изобретения вначале предоставляется следующая информация.

Структура грибов.

Грибы состоят из филаментов (гиф), разделенных на сегменты (клетки). В отличие от вегетативного мицелия, спороносные гифы дифференцированы на различающиеся между собой ткани, образующие сеть переплетенных гиф, ветвящихся в разных направлениях, имеющих разный диаметр и плотность, если сравнивать между собой различные участки внутри ножки и шляпки или если сравнивать шляпку с ножкой (Rama et al. 1997, Rama et al. 2000). Воздушное пространство между гифами шляпки составляет до 50% от общего объема, его относительная доля больше в поверхностных слоях и меньше в более глубоких слоях. Указанное процентное отношение в гимениальных пластинках приблизительно на 25% меньше по сравнению с ножкой (Donker et al., 1996).

Плодовые тела *A. bisporus* представляют собой дифференцированные части макроскопических грибов, выполняющие функции полового размножения, спорофоры продают под названием шампиньонов.

В данном описании термин "гриб" обозначает в зависимости от контекста, в котором он употребляется, выполняющий функции размножения орган пластинчатых, или агариковых грибов, или культивируемый пищевой продукт с таким же наименованием.

"Споры" представляют собой выполняющие функции размножения пропагулы грибов. Живые споры в состоянии покоя представляют собой либо гетерокарионы, либо гомокарионы. Споры можно асептически собирать на стерильный материал, суспендировать в стерильной жидкой среде, разводить и высаживать на стерильную агаризованную питательную среду для получения проросших спор и культур, находящихся в спорах. Для проращивания спор можно использовать различные технологии с распылением летучего феромона: внесение живой культуры *Agaricus* на крышку чашки, культивируемой вверх дном, или сбоку чашки, или применение изовалериановой кислоты. Проросшие споры можно переносить на чашки со свежей агаризованной питательной средой с использованием диссекционного микроскопа с помощью стерильных инструментов для микроскопии, таких как диссекционные иглы или лезвия скальпеля. С помощью указанного способа можно получить гетерокариотическое и гомокариотическое потом-

ство гетерокариотического штамма, содержащего споры и культуры, находящиеся в спорах.

Другие части гриба включают шляпку, ножку, гимениальные пластинки, клетки (определяемые как компартменты гиф, включающие в себя ядро, митохондрии, цитоплазму, клеточную мембрану и клеточную стенку, включая перегородки), гифы и мицелий.

Селекция грибов.

Недавно был опубликован подробный обзор генетики и геномики культивируемых грибов, касающийся селекции агариковых, в том числе улучшения их идиоплазмы и генотипа (Savoie et al., 2013).

Как и другие виды грибов, *A. bisporus* имеет несколько способов размножения: вегетативное размножение (митоз), половое размножение (мейоз) и парасексуальное размножение (другие феномены). У большинства грибов базидомицетов в базидии образуется по четыре споры, каждая из которых получает одно ядро, и каждая из этих спор будет прорастать с образованием гаплоидного мицелия, обозначаемого гомокарионом, способного спариваться с другим гомокарионом.

Типичный жизненный цикл *A. bisporus* амфиталлический (псевдогомоталлический, вторичный гомоталлический) или гетероталлический, в зависимости от уровня плоидности спор, которые могут быть соответственно гетерокариотическими ($n+n$ хромосом) или гомокариотическими (n хромосом).

Используемый в данном документе термин "гомокарион" обозначает гаплоидную культуру с единственным типом (или соматической линией) гаплоидного ядра (обозначаемого в цитогенетике как n). Обычно он бесплодный (т.е. не образует плодовых тел), но может выполнять функцию гаметы при образовании анастомозов при половой совместимости. Несмотря на то что гомокарионы гаплоидны, их часто обозначают "линиями", передающими одинаковый генотип потомкам.

В отличие от них, "гетерокарион" относится к культуре, у которой в общей цитоплазме находятся два комплементарных типа гаплоидных ядер. Таким образом, он функционально и физиологически аналогичен диплоидным особям (но цитогенетически представлен как $n+n$, а не $2n$). В отличие от гомокарионов, он фертилен (т.е. способен к плодоношению). Гетерокарионы в селекции также называют "штаммами". В контексте изобретения гетерокариотические штаммы, полученные в результате контролируемых спариваний, также называют "гибридами".

Селекция *A. bisporus* var. *bisporus* сложнее по сравнению с другими видами грибов из-за их специфического жизненного цикла.

A. bisporus var. *bisporus* несет большинство двуспоровых гетерокариотических базидий, продуцирующих фертильные гетерокарионы, характеризующиеся преимущественно псевдогомоталлическим типом жизненного цикла. В ходе гетероталлического цикла образуются гомокарионы. *A. bisporus* var. *bisporus* имеет мультиаллельную однофакторную систему половой взаимной совместимости, находящейся под контролем локуса MAT (от англ. Mating Type, тип спаривания), характеризующегося набором 14 аллелей Mat. Однако два гомокариона могут спариваться (плазмогамия) и продуцировать гибридный гетерокариотический фертильный мицелий, только если они обладают половой совместимостью, т.е. если они несут различные аллели. Производители учитывают данный феномен при разработке схем селекции и планов скрещивания. Однако, поскольку гомокарионы продуцирует только небольшая часть спор, это осложняет и замедляет работу по селекции.

В данном описании термин "анастомоз" обозначает слияние двух или более гиф с образованием непрерывной цитоплазмы. Кроме того, существует термин "плазмогамия", который относится к установлению посредством анастомоза, непрерывности цитоплазмы, приводящей к образованию полового гетерокариона с обменом ядра, митохондрий, цитоплазмы и других внутриклеточных компонентов. Половое слияние двух культур посредством анастомоза и плазмогамии обозначается в данном документе "спариванием".

Термин "культура грибов" в данном описании обозначает микроорганизмы грибы, растущие на различной питательной среде и субстратах. Он относится к физическому штамму, линии, гомокариону или гетерокариону. Однажды получив культуру, ее можно репродуцировать вегетативным способом в лаборатории.

Процесс выращивания *A. bisporus*.

A. bisporus представляет собой сапрофит и осуществляет вторичное разложение лесной подстилки. Он растет на компосте, приготовленном из побочных продуктов или отходов сельского хозяйства (например, соломы), иногда с добавлением животного навоза (конского, куриного) и других добавок (источника кальция, например гипса). Фабрики по разведению грибов по всему миру объединяют как небольшие семейные фермы в развивающихся странах, требующие больших трудозатрат, так и автоматизированные системы в индустриализованных странах, связанных с большими капиталовложениями. В большинстве современных систем на каждой стадии процесса, начиная от внесения мицелия до производства компоста, выращивания, сбора и обработки, задействованы специализированные компании.

A. bisporus представляет собой микроорганизм, с которым можно обращаться в лабораториях в стерильных условиях, используя классические микробиологические методы (шкаф с ламинарным потоком и/или чистая зона, стерильная среда, инструменты, оборудование, упаковки и т.д.). Оптимальными условиями для него являются температура приблизительно 24°C, pH приблизительно 7. Мицелий или споры можно хранить в холодной комнате (например, при 2°C). Питательной средой может быть солодово-

пептозный агар, картофельный агар с декстрозой, картофельный агар с декстрозой и дрожжевым экстрактом, специальный агар с компостом для агариковых и т.д.

Посевной мицелий представляет собой носитель (как правило, вареное зерно или синтетические продукты), инокулированный в аспетических или стерильных условиях чистой культурой штамма. Другими словами, "мицелий" в данном документе относится к культуре грибов, обычно чистой культуре гетерокариона, носителем которой является стерильный субстрат, который представляет собой сыпучий и диспергируемый зернистый материал (например, зерно злаков).

Более конкретно, процесс выращивания начинается со смешивания мицелия с компостом (внесения мицелия) с последующей вегетативной фазой (разрастанием мицелия или III фазой). Инокулированный компост инкубируют от 13 до 19 дней в контролируемых условиях с поддержанием оптимальной температуры, концентрации CO₂ и относительной влажности воздуха. В течение этой фазы мицелий получает питательные вещества из компоста, наращивает биомассу и колонизирует среду. Выделение тепла компостом в процессе метаболизма вначале увеличивается, а затем, после его полной колонизации, уменьшается. Значение pH снижается от приблизительно 7,5 до 6, а цвет среды изменяется от коричневого (компост) до белого (мицелий).

Затем поверхность компоста покрывают слоем инертного материала, известного под названием "покровная почва" (от англ. casing) (например, торфом или почвой с определенным значением pH или смесью, например торфа и известняка), данный процесс также обозначают термином гобтировка. В некоторых случаях мицелий смешивают с покровной почвой (фирменными продуктами или колонизированным компостом) для стимуляции колонизации слоя покровной почвы и образования плодовых тел. Параметры выращивания аналогичны тем, которые применяют при проращивании мицелия.

В селекции грибов "слой покровной почвы" обозначает слой непитательного материала (торф, почву или смесь), который наносят на верхнюю поверхность массы колонизированного компоста для развития плодовых тел грибов. Покровная почва с инокулюмом ("кейсинг инокулюм" от англ. Casing inoculum) обозначает инокулируемый материал, включающий в себя культуру грибов, обычно определенного гетерокариотического штамма, подходящий для смешивания со слоем покровной почвы.

Регуляция условий выращивания запускает переход от вегетативной фазы к репродуктивной фазе и образованию плодовых тел. Это обычно включает контролируемое снижение температуры и относительной влажности наряду с подачей свежего воздуха (аэрацией) для снижения уровня CO₂. На данной стадии также можно применять методы физического рыхления поверхности, орошения и химического стресса.

Грибы обычно появляются на 7-14 день от начала аэрации до сбора первых плодовых тел. Стадия снятия или сбора урожая зависит от физиологического развития гриба и корректируется для конкретного рынка в зависимости от требований производителя.

После снятия или сбора начинают расти другие грибы в виде групп, следующих друг за другом приблизительно с недельными интервалами. Период образования грибов в составе цикла плодоношения, разделенный интервалами, когда они не образуются, в данном описании обозначают "волной плодоношения". В последующих волнах урожая обычно снижаются. В современных производственных системах обычно бывает две или три волны, в более традиционных - больше.

Скороспелость (сроки созревания) обычно выражается как время от гобтировки до снятия урожая. Условия выращивания (климат, полив) между волнами плодоношения также тщательно контролируют для образования необходимого для грибов надлежащего качества и регулируют время сбора следующих друг за другом волн плодоношения.

Наконец, урожай убирают, использованный компост вывозят, на фабрике производят очистку и запускают новый производственный цикл.

Наиболее современные фабрики, получающие компост III фазы (с разросшимся мицелием) и производящие выращивание 2 волн плодоношения, имеют множество культивационных камер и в течение года могут осуществлять до 13 последовательных циклов выращивания в каждой камере.

Грибы, предназначенные для рынка, собирают вручную, а предназначенные для переработки собирают механическим способом. Для ручного сбора необходим период сбора урожая от 3 до 5 дней (поэтапно), тогда как для механического сбора требуется равномерность (единственная операция). Этого можно добиться благодаря относительно гладкому переходу от вегетативной к репродуктивной фазе либо благодаря более быстрому переходу соответственно, что будет влиять на число и, следовательно, на размер грибов.

Ключевыми регулирующими факторами, обеспечивающими надлежащее количество (урожай) и качество снимаемых или собираемых грибов, также являются влажность покровной почвы, правильная организация сбора и соблюдение гигиены во избежание появления вредителей и заболеваний. Более длинные циклы плодоношения повышают риск эпидемий заболеваний и появления вредителей. Первые волны плодоношения всегда будут более чистыми, чем вторые и тем более третьи волны плодоношения.

Урожайность определяют, как массу снятых (или собранных) грибов на единицу площади или, точнее, как массу снятых (или собранных) грибов на массу пастеризованного компоста, т.е. выраженную в процентах.

Переработка грибов после сбора.

Переработка предназначена для сохранения таких пищевых продуктов, как овощи, путем увеличения их срока хранения, например, в результате консервирования, пастеризации, замораживания, лиофилизации, высушивания. Это представляет особый интерес для грибов из-за того, что они имеют короткий естественный срок хранения (приблизительно 5 дней после сбора), особенно когда запасы превосходят спрос.

Переработку организуют в несколько стадий. Во время консервирования дегазация включает в себя помещение грибов в условия вакуума с последующей предварительной обработкой водой и добавками, в результате чего воздух удаляется и заменяется жидкостью. Бланширование представляет собой погружение грибов в горячую или кипящую воду с добавками: нагревание делает их менее подверженными разрушению. Грибы можно заготавливать целиком или в нарезанном виде. На последней стадии грибы пастеризуют или стерилизуют. Пастеризация представляет собой нагревание грибов до 95°C для увеличения срока хранения (несколько месяцев в охлажденном состоянии), тогда как стерилизация представляет собой автоклавирование грибов при температуре до приблизительно 125°C для увеличения срока хранения (несколько лет при комнатной температуре). Охлаждение и вымачивание могут иметь место на различных стадиях процесса. Контейнерами могут быть жестяные и стеклянные банки, пакеты и т.д.

Эффективность процесса консервирования можно рассчитать. Выход консервированного продукта представляет собой соотношение массы консервированного продукта в конце процесса по сравнению с массой свежего продукта, введенного вначале, и может выражаться как соотношение, в процентном выражении и т.д.

Выход консервированного продукта % = (общая масса сухого вещества/исходная масса образца) × 100 (Beelman et al. 1973).

Уварка, т.е. потеря массы обработанного продукта, происходящая во время бланширования и термической обработки, вызывает уменьшение выхода консервированного продукта. Поскольку продажу консервированного продукта осуществляют на основе сухой массы, избыточная уварка приводит к существенным экономическим потерям для переработчиков. Исследование затрат и выручки показало, что для предприятия среднего размера снижение уварки на 5% позволит повысить выручку на 20% и увеличить почасовую выручку относительно затрат на 21,8% (Coale et al. 1972). Следует отметить, что штаммы беловатого цвета (такие как Somysel 76) отличаются большей потерей массы после консервирования (т.е. меньшим выходом консервированного продукта) по сравнению с гладкими белыми штаммами. Кроме того, у них более низкое качество (ткань шляпок менее белая, пластинки быстрее приобретают коричневую окраску) (Steinbuch 1978, Fristche, 1983).

На выход консервированного продукта влияют многие факторы: категория грибов (диаметр шляпки), стадия (физиологическая зрелость), волна, техника сбора, условия хранения (время и климатические параметры) и т.д., а также параметры технологического процесса. При больших объемах переработки оптимизация сырья и процессов является первостепенной заботой консервных фабрик, и увеличение выхода консервированного продукта приветствуется в промышленности, особенно при ограниченности ресурсов. Отсутствие генетического разнообразия у существующих промышленных штаммов ограничивает возможности улучшения и совершенствования параметров технологического процесса.

Урожайность важна как для рынка, так и для переработки, а выход продукции наиболее важен для предприятий, заготавливающих грибы.

В современных системах урожайность и выход продукции берут в расчет материальной стоимости урожая, т.е. финансовых результатов, например стоимости собранного урожая, помноженной на стоимость переработки. Улучшение урожайности или выхода продукции может повлиять на финансовые результаты и, следовательно, одновременное улучшение обоих этих параметров может иметь очень большое финансовое значение. Финансовую эффективность можно рассчитать как отношение сухой массы переработанных грибов к массе пастеризованного субстрата при внесении мицелия (%) или как сухую массу переработанных грибов/м² убранный площади.

Получение потомков.

Первой стадией при развитии потомков определенного штамма является получение спорового отпечатка гриба данного штамма. Гриб снимают с деланки на соответствующей стадии (когда частное покрывало натягивается, но еще не отрывается) и помещают в асептическую камеру (например, стакан) на стерильный лист (например, автоклавированную вощеную бумагу) при комнатной температуре. В течение нескольких дней гриб созревает, и споры начинают осыпаться на бумагу. Споровый отпечаток можно хранить в холодильнике после упаковки в стерильную чашку или пробирку.

Следующие стадии выполняют в стерильных условиях (ламинарный шкаф, чистая зона). Готовят чашки Петри с соответствующей средой, либо с мицелием *A. bisporus*, либо с изовалериановой кислотой, оба варианта стимулируют прорастание спор.

На второй стадии готовят раствор спор, высаживают на заранее подготовленные чашки Петри и культивируют в течение нескольких дней (инкубатор).

На третьей стадии, как только начинается прорастание, собирают отдельные споры (только что проросшие) (диссекционный микроскоп в стерильном ламинаре), используя стерильные инструменты

(например, диссекционные иглы), переносят по-отдельности в новые чашки и культивируют (инкубатор).

Вегетативная несовместимость.

Вегетативная совместимость/несовместимость (также обозначаемая "несовместимость гетерокарионов" или "распознавание свой/чужой") представляет собой феномен, отличный от половой совместимости. Он проявляется на гетерокариотической стадии как антагонистический феномен, который предотвращает образование анастомоза и слияние цитоплазмы у двух различных гетерокарионов. При выращивании бок о бок двух вегетативно несовместимых гетерокарионов будет наблюдаться замедление роста и/или развития грибов, тогда как у двух совместимых гетерокарионов будет наблюдаться нормальный рост и сроки развития.

Вегетативная несовместимость может быть преимуществом с точки зрения гигиены фабрик по выращиванию грибов. Посадки грибов может поражать ряд вирусных заболеваний, наиболее распространенными являются вирус X (MVXD) и вирус Ла Франс (LIV) (Fletcher & Gaze, 2008). Известны два возможных способа передачи вирусов:

от мицелия к мицелию через слияние гиф (анатомоз) с передачей клеточного содержимого, через споры грибов, которые прорастают и передают вирус здоровому мицелию через анастомозы.

Анастомоз между штаммами вирусов играет ключевую роль в передаче вирусов. Эпидемии распространяются через фрагменты жизнеспособного мицелия, оставшегося на или в оборудовании или через переносимые потоком воздуха фрагменты при обращении с инкубированным нефасованным компостом (во время или в конце разрастания мицелия, во время рыхления или гобтировки ...). Таким образом, заболевание может распространяться по фабрике или между фабриками.

После того как фабрика оказывается инфицированной, применение второго альтернативного штамма, обладающего вегетативной несовместимостью с обычно выращиваемым штаммом, может прервать инфекционный цикл. В этом случае считают, что второй штамм обладает свойствами, останавливающими распространение вируса.

Известно, что среди гибридов средней категории (производных U1) образуются анастомозы, т.е. штаммы являются вегетативно совместимыми. Напротив, беловатые штаммы неохотно образуют анастомозы с гладкими белыми, т.е. эти штаммы являются вегетативно несовместимыми (Fletcher & Gaze, 2008).

Гибриды по изобретению.

Данное изобретение относится к новым и уникальным гетерокариотическим гибридам *Agaricus bisporus* и способам их применения. Данные гибриды в данном описании далее обозначаются "J10117" (или "J 10117"), "LB811" (или "LB-811") и "LB906" (или "LB-906").

Культуру гибрида *Agaricus bisporus* J10117 депонировали в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция. Дата депонирования 20 января 2015 г. Указанное депонирование произведено компанией SOMYCEL до даты подачи данной заявки. Депонирование соответствует всем требованиям Будапештского договора. Номер доступа CNCM I-4950. Депонированная культура будет поддерживаться в депозитории в течение 30 или 5 лет после последнего запроса или в течение срока действия патента, в зависимости от того, какой из сроков больше и будет замещаться по мере необходимости в течение указанного периода.

Гибрид *Agaricus bisporus* J10117 может скрещиваться с любым штаммом *Agaricus bisporus*. Указанный штамм, например, может быть белым или коричневым штаммом *A. bisporus*.

В предпочтительном воплощении указанный белый штамм представляет собой U1 или его производное, или любой эквивалентный белый штамм (т.е. либо идентичный, либо принадлежащий той же производной родовой группе, либо обладающий функциональным сходством). Другие белые штаммы включают традиционные беловатые (OW, от англ. off-white) штаммы, например, такие как Somysel 9.2, Somysel 76 или Somysel 611 или гладкие белые (SW, от англ. Smooth-White) штаммы, например, такие как Somysel 53. Эти и другие беловатые штаммы образуют производную родовую группу, обладающую генетической идентичностью, и являются функционально эквивалентными и взаимозаменяемыми. Культуру гибридного штамма Somysel 76, описанного в данном изобретении, депонировали в коллекции службы сельскохозяйственных исследований (NRRL) 1815 North University Street, Peoria, Иллинойс, 61604 США 18 февраля 2014 г. под номером доступа NRRL 50903. В другом предпочтительном воплощении указанный белый штамм представляет собой Fungisem FS 9.18, имеющийся на рынке.

В предпочтительном воплощении указанный коричневый штамм представляет собой Sylvan 800 или Sylvan 856. Гомокариотические линии были получены из гибридов J10117, Somysel 76 и FS9-18, и гибридные потомки были получены в результате обычного спаривания указанных линий. Любопытно, что две из них (а именно LB811 и LB906) демонстрируют улучшенный выход консервированного продукта и более высокую агрономическую ценность (по показателям массы грибов, размера шляпки, сроков и т.д.), а также соответствующий фенотип, удовлетворяющий производителя и потребителя (насыщенность белой окраски, гладкость, форму шляпки, диаметр ножки, см. "Примеры" ниже). Кроме того, они оказались вегетативно несовместимыми со всеми протестированными промышленными штаммами, включая их родителей J10117, Somysel 76 и FS9-18.

Первым родителем LB811 и LB906 является J10117. Более конкретно, первым родителем гибрида

LB811 является штамм J10117, а вторым родителем является штамм FS9-18. Кроме того, первым родителем гибрида LB906 является штамм J10117, а вторым родителем является штамм Somycel 76.

В первом аспекте данное изобретение относится к гибридным штаммам грибов, первым родителем которых является штамм J10117, а вторым родителем является белый или коричневый штамм *Agaricus bisporus*. В предпочтительном воплощении указанный белый штамм представляет собой U1 или его производное или штамм типа OW или штамм типа SW. В более предпочтительном воплощении указанный белый штамм представляет собой штамм OW, выбранный из группы, состоящей из Somycel 9.2, Somycel 76 или Somycel 611 и их производных. В другом более предпочтительном воплощении указанный белый штамм представляет собой Fungisem FS 9.18.

В частности, гомокариотические линии J10117s62, 76s14 и FS9-18s50 были получены из гибридов J10117, Somycel 76 и FS9-18 соответственно. Гибриды LB811 и LB906 были получены путем спаривания гомокариотической линии *Agaricus bisporus* J10117s62 (полученной из J10117) с гомокариотическими линиями (76s14 и FS9-18s50), полученными из имеющихся на рынке штаммов Somycel 76 и FS9-18 соответственно. Преимуществом этих двух гибридов являются улучшенные характеристики грибов первой волны, выход консервированного продукта, отдача урожая и агрономическая ценность (например, масса и размер грибов) и соответствующий фенотип, удовлетворяющий производителей и потребителей (например, диаметр ножки, насыщенность белой окраски и гладкость шляпки и т.д.).

В другом аспекте данное изобретение относится к способу получения гибридов по изобретению (J10117, LB811 и/или LB906).

В конкретном воплощении указанный способ включает стадии:

- а) получения спор указанной гибридной культуры грибов,
- б) проращивание указанных спор,
- в) перенос культур прорастающих спор в новую среду для выращивания.

Каждая стадия может осуществляться любым стандартным способом, как описано в данном документе.

Депонирование в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM).

Гибридную культуру гомокариона *Agaricus bisporus* J10117s62 депонировали в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция. Дата депонирования 20 января 2015 г. Указанное депонирование произведено компанией SOMYCEL до даты подачи данной заявки. Депонирование соответствует всем требованиям Будапештского договора. Номер доступа CNCM I-4948. Депонированная культура будет поддерживаться в депозитории в течение 30 или 5 лет после последнего запроса или в течение срока действия патента, в зависимости от того, какой из сроков больше, и будет замещаться по мере необходимости в течение указанного периода.

Гибридную культуру гомокариона *Agaricus bisporus* 76s14 депонировали в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция. Дата депонирования 20 января 2015 г. Указанное депонирование произведено компанией SOMYCEL до даты подачи данной заявки. Депонирование соответствует всем требованиям Будапештского договора. Номер доступа CNCM I-4947. Депонированная культура будет поддерживаться в депозитории в течение 30 или 5 лет после последнего запроса или в течение срока действия патента, в зависимости от того, какой из сроков больше, и будет замещаться по мере необходимости в течение указанного периода.

Гибридную культуру гетерокариона *Agaricus bisporus* FS9-18 депонировали в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция. Дата депонирования 20 января 2015 г. Указанное депонирование произведено компанией SOMYCEL до даты подачи данной заявки. Депонирование соответствует всем требованиям Будапештского договора. Номер доступа CNCM I-4949. Депонированная культура будет поддерживаться в депозитории в течение 30 или 5 лет после последнего запроса или в течение срока действия патента, в зависимости от того, какой из сроков больше, и будет замещаться по мере необходимости в течение указанного периода. Из гетерокариона получили гомокарионы, такие как FS9.18s50, которые использовали для создания LB811.

В предпочтительном воплощении гибриды по изобретению представляют собой гибриды *Agaricus bisporus* LB811, депонированный в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4945. Депонирование соответствует всем требованиям Будапештского договора. В частности, она будет поддерживаться в депозитории в течение 30 или 5 лет после последнего запроса или в течение срока действия патента, в зависимости от того, какой из сроков больше, и будет замещаться по мере необходимости в течение указанного периода.

В другом предпочтительном воплощении гибриды по изобретению представляют собой гибриды *Agaricus bisporus* LB906, депонированный в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4946. Депонирование соответствует всем требованиям

Будапештского договора. В частности, она будет поддерживаться в депозитарии в течение 30 или 5 лет после последнего запроса или в течение срока действия патента, в зависимости от того, какой из сроков больше, и будет замещаться по мере необходимости в течение указанного периода.

Ниже представлено краткое описание генотипа гибридов по изобретению по 22 простым коротким повторам SSR (от англ. Single Sequence Repeat) (более подробная информация о данных маркерах приведена в публикации Foulongne-Oriol et al., 2009). Поскольку гибриды включают два набора хромосом, в каждом локусе маркера имеется две копии аллеля.

В табл. 1 представлен фингерпринт 22 SSR-маркеров гибридов по изобретению.

Таблица 1

маркеры	LB811	LB906	J10117
AbSSR02	188/188	188/192	188/188
AbSSR05	329/332	329/332	329/332
AbSSR12	171/171	171/171	171/174
AbSSR13	212/212	212/212	212/212
AbSSR14	167/167	167/167	167/167
AbSSR19	191/191	191/191	191/191
AbSSR23	176/176	176/176	176/176
AbSSR31	167/167	167/167	167/167
AbSSR33	192/192	192/192	192/192
AbSSR36	149/157	149/149	149/149
AbSSR39	186/188	186/188	186/188
AbSSR42	177/179	179/179	177/179
AbSSR43	231/231	не опр.	231/231
AbSSR45	193/203	193/203	193/203
AbSSR49	174/174	174/174	174/174
AbSSR56	225/225	225/225	225/225
AbSSR57	257/257	257/257	257/257
AbSSR58	165/169	167/169	169/169
AbSSR59	197/201	197/201	197/201
AbSSR60	206/208	206/208	206/208
AbSSR64	104/104	104/104	104/104
AbSSR65	197/213	188/213	213/213

Профили маркеров, представленные в табл. 1, представляют небольшую часть геномной последовательности заявленных гибридов. Данные маркеры отобрали, поскольку они расположены на большом расстоянии друг от друга и охватывают весь ядерный геном, и известно, что они позволяют различать разные промышленные штаммы грибов (Foulongne-Oriol et al., 2009).

Например, гибрид LB811 можно отличить от всех производных U1 по генотипу любого из четырех его маркеров, AbSSR 23, 39, 58 и 65. Кроме того, гибрид LB906 можно отличить от всех производных U1 по генотипу любого из пяти его маркеров, AbSSR 02, 23, 36, 39 и 42. Наконец, гибрид J10117 можно отличить от всех производных U1 по генотипу любого из шести его маркеров, AbSSR 12, 23, 36, 39, 58 и 65.

Гибриды и штаммы по изобретению можно отличить от промышленных штаммов, производных U1, таких как A15, а также от других гибридных штаммов или гомокариотических штаммов, таких как J10165 (описанный в US 20100218294 и US 2100154079), J11500 (описанный в WO/2015/114612) и J9277 (описанный в US 20080182321 и US 2010154079).

В табл. 2 представлена небольшая часть последовательности генома заявленных гибридов в сравнении с известными гибридами или штаммами и показано, что использование маркеров AbSSR, указанных выше, позволяет выявить множество генетических различий между ними.

Таблица 2

Фингерпринт 22 SSR-маркеров гибридов по изобретению и известных штаммов

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

В табл. 3 собраны и кратко представлены генотипические различия между исследованными штаммами.

Таблица 3

		A15	LB811	LB906	J10117	J10165	J11500	J9277
LB811	Кол-во различий	4						
	Кол-во маркеров	22						
LB906	Кол-во различий	5	5					
	Кол-во маркеров	21	22					
J10117	Кол-во различий	5	4	5				
	Кол-во маркеров	22	22	21				
J10165	Кол-во различий	3	7	5	7			
	Кол-во маркеров	22	22	21	22			
J11500	Кол-во различий	5	8	7	7	4		
	Кол-во маркеров	20	20	19	20	20		
J9277	Кол-во различий	5	7	7	9	5	8	
	Кол-во маркеров	22	22	21	22	22	20	

Данная панель из 22 SSR-маркеров демонстрирует, что каждый из штаммов обладает уникальным генотипическим профилем.

В таблице выше представлен ряд аллелей, различающихся между штаммами (попарное сравнение).

Каждый из штаммов имеет по меньшей мере один редкий или уникальный аллель:

LB811 имеет 2 таких аллеля: AbSSR58 (165), AbSSR65 (197),

LB906 имеет 1 такой аллель: AbSSR02 (192),

для J10117 имеет 1 такой аллель: AbSSR12 (174),

J10165 имеет 1 такой аллель: AbSSR56 (219),

J11500 имеет 3 таких аллеля: AbSSR12 (173), AbSSR14 (165), AbSSR42 (156),
J9277 имеет 2 таких аллеля: AbSSR45 (197), AbSSR57 (219).

Гибриды по изобретению также можно отличить от других штаммов грибов, анализируя различные аллели локуса MAT. *A. bisporus* имеет мультиаллельную однофакторную систему половой совместимости, находящуюся под контролем локуса MAT, у которого выявлено 14 аллелей (Xu et al., 1993, Imbernon et al., 1995). Фертильные способные к плодоношению гетерокарионы *A. bisporus* всегда гетерозиготны по локусу MAT, что обусловлено их половым размножением и жизненным циклом, и, таким образом, гетероаллельны по маркерам, сцепленным с локусом MAT, таким как маркер P1N150.

Гибрид LB811 имеет гетерокариотический профиль по маркеру P1N150 с генотипом "4/7".

Гибрид LB906 имеет гетерокариотический профиль по маркеру P1N150 с генотипом "3/4".

Гибрид J10117 имеет гетерокариотический профиль по маркеру P1N150 с генотипом "2/4".

Гибриды по изобретению можно четко идентифицировать путем анализа указанных SSR-маркеров или маркеров локуса MAT. Для этой цели можно использовать любые подходящие ПЦР-праймеры, которые фланкируют определенные маркерные области. Способы дизайна соответствующих ПЦР-праймеров и их применение хорошо известны в области техники. В этой связи также можно использовать способы секвенирования.

Производные гибридов по изобретению.

Данное изобретение также охватывает клетки "происходящие от" указанных выше гибридов. Данные клетки далее обозначаются "производными".

Некоторые приведенные в качестве примера способы получения указанных производных включают соматический отбор, отбор тканевых культур, моноспоровую селекцию, многоспоровую селекцию, спаривание мицелия, полученного от гомокариотических или гетерокариотических спор указанных гибридов, самооплодотворение, повторное спаривание с возвратом к исходной культуре, мутагенез, привнесение признака, интрогрессивное привнесение признака, инбридинг и трансформацию. В данном описании трансформация обозначает процесс внедрения нового генетического материала в геном исходной культуры биотехнологическими способами (Velcko et al., 2004). Интрогрессивное привнесение признака в данном описании представляет собой спаривание линии, представляющей интерес, со штаммом, в результате чего требуемый признак штамма, представляющего интерес, включается в генетический фонд другого штамма. Привнесение признака представляет собой избирательное внедрение генетических детерминант, отвечающих за один или несколько требуемых признаков, в генетический фонд исходного штамма при сохранении большей части генетического фонда исходного штамма. Доля исходного генотипа, который будет присутствовать у производных *A. bisporus*, варьирует от почти 100% в случае соматического отбора до 99,х% в случае модификации штаммов посредством ДНК-опосредованной трансформации, до 90-99,х% в случае моно- или многоспоровой селекции или какого-либо мутагенеза, до в среднем от приблизительно 75 до приблизительно 85% в случае спаривания потомков-сиссов (= самооплодотворение). В области техники известно множество способов установления генотипа для определения процентного соотношения ДНК исходной культуры, присутствующей в другой культуре.

В объем данного изобретения также входят культуры, существенно выигрывающие от использования при их создании линии, полученной от штаммов LB811 или LB906, такие как гибридные потомки (или потомство), имеющие в качестве родителя линию, полученную от штамма LB811 или LB906.

Гибридные потомки или линии (также обозначаемые "отпрыски" или "потомство"), полученные при использовании гибридов по изобретению, входят в объем данного изобретения и могут обозначаться "производными". Они могут быть гомокариотическими или гетерокариотическими.

Обычно гибридных потомков получают путем выращивания двух гомокарионов рядом друг с другом на одной чашке Петри, позволяя им расти (инкубатор) до установления контакта между ними. После скрещивания при наличии половой совместимости на границе контакта впоследствии развивается плотный ("stroma") или быстро растущий мицелий. Его кусочки можно переносить на новые чашки и культивировать (инкубатор).

В другом аспекте данное изобретение также относится к способу получения новой гибридной культуры грибов, включающему спаривание гомокариона, полученного от гибридов LB811 или LB906, или J10117, со вторым гомокарионом *A. bisporus*.

В другом аспекте данное изобретение также относится к способу получения новой гибридной культуры грибов, включающему спаривание гомокариона, полученного от гибридов LB811 или LB906, или J10117, со вторым гетерокарионом *A. bisporus*.

В другом аспекте данное изобретение также относится к способу получения новой гибридной культуры грибов, включающему спаривание гибридов LB811, LB906 или J10117, со вторым гомокарионом *A. bisporus*.

Гетерокариотические гибриды или гомокариотические линии, полученные данными способами, входят в объем изобретения так же, как и "производные гибридов".

В объем данного изобретения также входят гибриды или линии, полученные от штаммов LB811 или LB906, или J10117, имеющие генетический признак, введенный путем обратного интрогрессивного спаривания потомков с линией, полученной от штаммов LB811, LB906, J10117, или путем трансформации.

ции.

В данном воплощении производные гибридов можно однозначно идентифицировать по их генотипу, который преимущественно будет представлять собой выборку из такового одной исходной культуры (включая 22 SSR-маркера и маркер P1N150, описанные выше).

Гибриды LB811 and LB906 имеют общие молекулярные маркеры и/или последовательности с гомокарионом J10117s62 (см. табл. 4 ниже), поскольку они происходят от одной гомокариотической линии.

В табл. 4 представлены SSR-маркеры гибридов по изобретению и гомокариона J10117s62.

Таблица 4

SSR маркер	LB811	LB906	J10117s62
AbSSR02	188/188	188/192	188
AbSSR05	329/332	329/332	332
AbSSR12	171/171	171/171	171
AbSSR13	212/212	212/212	212
AbSSR14	167/167	167/167	167
AbSSR19	191/191	191/191	191
AbSSR23	176/176	176/176	176
AbSSR31	167/167	167/167	167
AbSSR33	192/192	192/192	192
AbSSR36	149/157	149/149	149
AbSSR39	186/188	186/188	188
AbSSR42	177/179	179/179	179
AbSSR43	231/231	не опр.	не опр.
AbSSR45	193/203	193/203	203
AbSSR49	174/174	174/174	174
AbSSR56	225/225	225/225	225
AbSSR57	257/257	257/257	257
AbSSR58	165/169	167/169	169
AbSSR59	197/201	197/201	201
AbSSR60	206/208	206/208	206
AbSSR64	104/104	104/104	104
AbSSR65	197/213	188/213	213

Кроме того, гомокариотический родитель J10117s62 имеет аллельный вариант "4" маркера P1N150 в локусе MAT.

Таким образом, данное изобретение также относится к гибридам *Agaricus bisporus*, содержащим (по меньшей мере в одном аллеле в каждом локусе) все молекулярные маркеры SSR и/или аллельную последовательность маркера P1N150 гомокариона J10117s62.

В другом воплощении данное изобретение относится к гибридам *Agaricus bisporus*, содержащим все молекулярные маркеры SSR и/или аллельные последовательности маркера P1N150 гибрида LB811, депонированного под номером доступа CNCM I-4945, или гибрида LB906, депонированного под номером доступа CNCM I-4946, или гибрида J10117, депонированного под номером доступа CNCM I-4950.

Указанные гибриды обладают такими преимуществами, как гладкая шляпка белого цвета, улучшенный выход консервированного продукта, улучшенная агрономическая ценность и соответствующий фенотип, удовлетворяющие производителей и потребителей.

Более конкретно, воплощением данного изобретения является гетерокарион *A. bisporus*, у которого в одном из аллелей в каждом локусе содержатся те же SSR-маркеры, что и у линии, происходящей от гибридов LB811, LB906 или J10117, по меньшей мере по 50% маркеров, перечисленных в табл. 1 выше. В других воплощениях данное изобретение охватывает гетерокарионы, у которых в одном из аллелей в каждом локусе содержатся те же SSR-маркеры, что и у линии, происходящей от гибридов LB811, LB906 или J10117, по меньшей мере по 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или, по существу, 100% маркеров, перечисленных в табл. 1 выше. В предпочтительном воплощении указанный гетерокарион *A. bisporus* дополнительно имеет последовательность аллельного варианта "4" (для клеток, происходящих от J10117-, LB811- и LB906) или "7" (для клеток, происходящих от LB811) или "3" (для клеток, происходящих от LB906) или "2" (для клеток, происходящих от J10117) по маркеру P1N150.

Клеточные культуры и продукты, включающие гибриды по изобретению.

В другом аспекте данное изобретение относится к гибридной культуре грибов *Agaricus bisporus*, содержащей любой из гибридов *Agaricus bisporus* по изобретению, описанных выше. Важно отметить, что

указанная гибридная культура грибов демонстрирует улучшенный выход консервированного продукта, улучшенную агрономическую ценность (отдачу урожая, массу и размер гриба и т.д.) и соответствующий фенотип, удовлетворяющий производителя и потребителя (насыщенность белой окраски, гладкость, диаметр ножки и т.д.). В частности, он является вегетативно несовместимым с белыми промышленными штаммами грибов.

В частности, данное изобретение относится к гибридной культуре грибов *Agaricus bisporus*, включающей

гибрид *Agaricus bisporus* LB811, депонированный в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4945, или его производные, или

гибрид *Agaricus bisporus* LB906, депонированный в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4946, или его производные, или

гибрид *Agaricus bisporus* J10117, депонированный в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4950, или его производные.

В другом аспекте данное изобретение относится к любому продукту, включающему указанную гибридную культуру грибов. В предпочтительном воплощении указанный продукт выбран из группы, состоящей из мицелия, грибницы, инокулума, покровной почвы с инокулумом (англ. casing inoculum) и колонизированного субстрата (например, зерен, компоста, слоя покровной почвы и сыпучих твердых частиц).

Указанные продукты можно получать стандартными способами, как указано выше.

В другом аспекте данное изобретение также относится к любой части указанных культур. Указанные части могут быть выбраны из группы, состоящей из гиф, спор и частей клеток, указанные части включают, например, ядра, митохондрии, цитоплазму, протопласты, ДНК, РНК, белки, клеточные мембраны и клеточные стенки, каждая часть присутствует либо в вегетативном мицелии культуры, либо в грибах, произведенных культурой, либо и в тех, и в других.

В предпочтительном воплощении данное изобретение относится к любой клетке культур *Agaricus bisporus*, описанных выше.

В другом предпочтительном воплощении данное изобретение относится к спорам, содержащим клетку культур *Agaricus bisporus*, описанных выше.

В более широком смысле, данное изобретение относится к любой культуре или продукту, включающему молекулярные маркеры SSR и/или последовательности аллелей маркера P1N150 линий, полученных от гибридов по изобретению. В предпочтительном воплощении указанная культура или продукт включает те же аллели, что и исходная линия, происходящая от LB811, LB906 или J10117, по меньшей мере по 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или, по существу, 100% SSR-маркеров или последовательности аллелей P1N150.

Гомокарионы гибридов по изобретению.

Гомокарионы представляют собой специфические производные гибридов по изобретению; они могут быть получены любыми стандартными способами. Примером является выделение моноспоровых изолятов в соответствующих условиях: споры гибридов по изобретению можно разводить в жидкой среде и высаживать на питательную агаризованную среду. Также можно применять альтернативные способы дегетерокариотизации (например, получение протопластов из мицелия или клеток).

В научной литературе описано несколько способов идентификации и селекции гомокарионов: фенотипические способы (медленный рост мицелия, различные характеристики мицелия), специфические способности (способность плодоносить, способность скрещиваться), генотипические способы (ферментативные маркеры, молекулярные маркеры, методики секвенирования ...) или различные комбинации.

В конкретном аспекте данное изобретение относится к гомокарионам (или гомокариотическим линиям), полученным от гибридов по изобретению или их производных.

В частности, данное изобретение относится к гомокарионам (или гомокариотическим линиям), полученным от

гибрида *Agaricus bisporus* LB811, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4945, или его производных, или от

гибрида *Agaricus bisporus* LB906, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4946, или его производных, или от

гибрида *Agaricus bisporus* J10117, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4950, или его производных.

Более конкретно, данное изобретение относится к гомокариону *Agaricus bisporus* J10117s62, депонированному в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue

du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4948. Депонированная культура будет поддерживаться в депозитории в течение 30 или 5 лет после последнего запроса или в течение срока действия патента, в зависимости от того, какой из сроков больше, и будет замещаться по мере необходимости в течение указанного периода.

Другим воплощением изобретения является гомокарион *A. bisporus*, содержащий те же самые SSR-маркеры, что и линия, полученная от гибридов LB811, LB906 или J10117, по меньшей мере по 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или, по существу, 100% маркеров, представленных в табл. 1 выше. В предпочтительном воплощении указанный гомокарион *A. bisporus* дополнительно имеет последовательность аллельного варианта "4" (для клеток, происходящих от J10117-, LB811- и LB906) или "7" (для клеток, происходящих от LB811) или "3" (для клеток, происходящих от LB906) или "2" (для клеток, происходящих от J10117) по маркеру P1N150.

Данное изобретение также охватывает культуры, включающие в себя указанные выше гомокарионы.

Получение грибов от гибридов по изобретению.

В следующем аспекте данное изобретение относится к грибу, полученному путем выращивания урожая грибов любой из описанных выше культур. Способы производства грибов подробно описаны выше. Они хорошо известны в области техники.

В следующем аспекте данное изобретение относится к способу получения гибридов грибов, указанный способ включает:

- а) инокуляцию среды для культивирования грибов гибридом шампиньона *Agaricus bisporus* по изобретению, а именно LB811, LB906 или J10117,
- б) поддержание указанной инокулированной среды для культивирования в условиях, благоприятных для плодоношения грибов, и
- в) сбор грибов с указанной среды для культивирования.

Применение гибридов по изобретению

Применение культуры грибов штамма LB811, LB906 или J10117 включает, помимо прочего, получение гомокариотических линий и других потомков из спор или протопластов LB811, LB906 или J10117, получение гибридных культур грибов, включающих линии, полученные из штамма LB811, LB906 или J10117, получение грибов из культур, включающих линии, полученные из LB811, LB906 или J10117, и получение частей грибов из культур, включающих линии, полученные из штамма LB811, LB906 или J10117.

Другие применения включают способы получения культуры грибов, которые включают спаривание гомокариотических линий *Agaricus bisporus*, полученных из штамма LB811, LB906 или J10117, или самих гетерокариотических штаммов LB811, LB906 или J10117 с другой линией грибов. Изобретение также относится к способам получения культур грибов, кодирующих в своем генетическом материале один или несколько признаков, интрогрессированных в линии, полученные от LB811, LB906 или J10117, посредством интрогрессивного привнесения признаков или трансформации, а также к культурам грибов, грибам и частям грибов, полученным посредством такой интрогрессии.

Кроме того, изобретение может включать гибридную культуру грибов, грибы, части грибов, включая споры или части культуры, полученные посредством спаривания гомокариотической линии, полученной из штамма LB811, LB906 или J10117, с другой линией грибов или интрогрессивного привнесения признаков линии, полученной из штамма LB811, LB906 или J10117.

Другие применения данного изобретения включают получение гомокариотических линий грибов, происходящих от линий грибов, полученных из штамма LB811, LB906 или J10117, а также способы создания других гомокариотических линий грибов, происходящих от линий грибов, полученных из штамма LB811, LB906 или J10117, и к получению инбредных линий грибов и их частей, полученных благодаря применению указанных способов.

Данное изобретение в следующем аспекте также относится к штамму *A. bisporus*, который позволяет получить грибы с улучшенным выходом консервированного продукта, где указанный улучшенный выход консервированного продукта контролируется генетической детерминантой, где указанный улучшенный выход консервированного продукта штамма *Agaricus bisporus* определяют как нормализованный выход консервированного продукта указанного штамма *A. bisporus* ($НВК_{штамма}$), превышающий 100, и где нормализованный выход консервированного продукта $НВК_{штамма}$ рассчитывают следующим образом:

$$НВК_{штамма} = ВК_{штамма} - ВК_{контроля} + 100$$

где $ВК_{штамма}$ и $ВК_{контроля}$ обозначают соответственно выход консервированного продукта штамма *A. bisporus* и выход консервированного продукта контрольного штамма *A. bisporus*, который не содержит указанной генетической детерминанты, и

где выход консервированного продукта измеряют для грибов, собранных на одинаковых стадиях потребительской спелости, в соответствии с процедурой, подробно описанной в примере 2.

В одном воплощении нормализованный выход консервированного продукта штамма $НВК_{штамма}$ составляет от 10,1 до 120, в частности от 100,5 до 120, более конкретно от 101 до 115, более конкретно от

102 до 115, еще более конкретно от 103 до 110, например приблизительно 110.

Штамм *Agaricus bisporus* по изобретению получают путем скрещивания штамма *A. bisporus* J10117 в качестве первого родителя со вторым штаммом *A. bisporus* в качестве второго родителя.

У штамма *Agaricus bisporus* по изобретению признак, отвечающий за повышенный консервный выход, контролируется генетической детерминантой, которая наследуется и может быть обнаружена у J10117.

В одном воплощении штамм *A. bisporus*, предложенный в данном изобретении и описанный выше в данном документе, имеет признак "повышенного выхода консервированного продукта", полученный от штамма *A. bisporus* J10117, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4950, или LB811, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4945, или LB906, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4946.

В одном воплощении изобретения признак "повышенный выход консервированного продукта" или штамм, обладающий указанным признаком, получают от любого из депонированных штаммов посредством выращивания потомков указанного штамма. В частности, признак "повышенный выход консервированного продукта" или штамм, обладающий указанным признаком, получают от любого из депонированных штаммов посредством: i) выращивания пропативного материала указанного штамма и выращивания из него зрелых грибов; ii) сбора фертильного пропативного материала и iii) выращивания грибов из культур, выращенных из пропативного материала, собранного в п.ii), и отбора штаммов, у которых вырастают грибы, обеспечивающие повышенный выход консервированного продукта.

В одном воплощении изобретение относится к материалу, получаемому от штамма грибов, предложенного в изобретении и описанного выше в данном документе, включающему, без ограничений, мицелий, грибницу, споры, протопласты, охарактеризованному в данном документе как "пропативный материал", или к любой другой части или продукту штамма, которые по-прежнему демонстрируют фенотип, обеспечивающий повышенный выход консервированного продукта, в частности, при вырастании в гриб.

Изобретение также относится к способу получения штамма *A. bisporus*, продуцирующему грибы с улучшенным выходом консервированного продукта, включающему стадии, при которых:

- i) берут пропативный материал гибридного штамма *A. bisporus* по данному изобретению,
- ii) выращивают указанный материал и выделяют из него репродуктивный материал,
- iii) скрещивают репродуктивный материал, полученный на стадии ii), с репродуктивным материалом штамма *A. bisporus*, который не обладает признаком повышенного выхода консервированного продукта, выращивают пропативный материал, полученный при скрещивании, и собирают пропативный материал, а также
- iv) выращивают грибы из пропативного материала, собранного на стадии iii), и отбирают штамм грибов, производящий грибы с повышенным выходом консервированного продукта.

В одном воплощении используемый в указанном способе по изобретению пропативный материал, такой как споры, происходит от штамма *A. bisporus*, выбранного из группы, состоящей из J10117, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4950, LB811, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4945, и LB906, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4946.

В одном воплощении штамм *A. bisporus*, не имеющий признака улучшенного выхода консервированного продукта, который скрещивают на стадии iii), может представлять собой любую разновидность штамма *A. bisporus*.

Соответственно можно трансформировать любой штамм *A. bisporus* в штамм *A. bisporus* по данному изобретению путем скрещивания любого штамма *A. bisporus* со штаммом *A. bisporus* по данному изобретению, т.е. с тем, который содержит генетическую детерминанту, отвечающую за формирование признака улучшенного выхода консервированного продукта.

Генетическую детерминанту, отвечающую за формирование признака по данному изобретению, получают из штамма *A. bisporus*, выбранного из группы, состоящей из J10117, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4950; LB811, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией

SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4945, и LB906, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4946.

Указанная генетическая детерминанта является наследуемой и передается из поколения в поколение способами, известными специалистам в области селекции растений/грибов или биотехнологии растений.

Приведенное в качестве примера воплощение указанного способа включает перенос путем интрогрессии генетической детерминанты, отвечающей за повышенный выход консервированного продукта, или последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей указанную детерминанту, от донорского штамма *A. bisporus* в реципиентный штамм *A. bisporus* путем скрещивания штаммов.

Таким образом, указанный перенос удобно осуществлять, используя традиционные способы селекции. Так, в некоторых воплощениях генетическую детерминанту интрогрессируют в промышленный штамм *Agaricus* с помощью маркер-вспомогательной селекции (MAS, от англ. marker-assisted selection, или MAB, от англ. marker-assisted breeding). MAS и MAB включают применение одного или нескольких молекулярных маркеров для идентификации и селекции тех штаммов-потомков, которые содержат генетические детерминанты, ассоциированные с требуемым признаком, т.е. улучшенным выходом консервированного продукта. Применительно к описанному объекту изобретения, такая идентификация и селекция основаны на селекции генетической детерминанты описанного объекта изобретения или ассоциированных с ней маркеров.

Штаммы *A. bisporus*, созданные согласно указанным воплощениям, могут с успехом наследовать большинство признаков штамма-реципиента и наследовать признак улучшенного выхода консервированного продукта от штамма-донора. Как обсуждалось выше, для интрогрессии генетической детерминанты, отвечающей за улучшенный выход консервированного продукта, в штамм-реципиент *A. bisporus* можно применять традиционные способы селекции. В некоторых воплощениях штамм-донор *A. bisporus*, демонстрирующий улучшенный выход консервированного продукта и содержащий генетическую детерминанту, кодирующую признак, отвечающий за улучшенный выход консервированного продукта, скрещивают со штаммом-реципиентом *A. bisporus*, который в некоторых воплощениях демонстрирует требуемые характеристики.

В способе рекуррентной селекции и обратного скрещивания признак улучшенного выхода консервированного продукта, т.е. генетическая детерминанта, отвечающая за формирование признака, может быть интрогрессирована в целевой штамм-реципиент (рекуррентный родитель) путем скрещивания рекуррентного родителя с первым штаммом-донором, отличающимся от рекуррентного родителя и обозначаемым в данном документе как "нерекуррентный родитель". Рекуррентный родитель представляет собой штамм, который не обладает улучшенным выходом консервированного продукта, но обладает характеристиками, приветствуемыми с коммерческой точки зрения. Штамм-донор может предпочтительно быть штаммом *A. bisporus*, выбранным из группы, состоящей из J10117, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4950; LB811, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4945, и LB906, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4946.

Таким образом, данное изобретение относится к применению генетической детерминанты для привнесения признака улучшенного выхода консервированного продукта, особенно на стадии потребительской спелости, штамму *A. bisporus*, не имеющему указанной генетической детерминанты, где указанную генетическую детерминанту получают из штамма *A. bisporus*, выбранного из группы, состоящей из J10117, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4950; LB811, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4945, и LB906, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4946.

Специалисту в области техники не составит труда осуществить изобретение с любым штаммом *A. bisporus*, а приведенные в данном описании информация и инструментарий позволяют осуществить данное изобретение. Депонированный штамм *A. bisporus* содержит генетическую детерминанту по данному изобретению. Любой из депонированных штаммов может быть использован специалистом в области техники в качестве источника генетической детерминанты, ассоциированной с улучшенным выходом консервированного продукта, особенно на стадии потребительской спелости.

Потомки, получающиеся в результате скрещивания между рекуррентным родителем и нерекур-

рентным родителем, могут быть обратно скрещены с рекуррентным родителем. В полученной популяции можно провести скрининг по улучшенному выходу консервированного продукта.

После скрининга отбирают штаммы, которые демонстрируют фенотип с улучшенным выходом консервированного продукта, или, в некоторых воплощениях, генотип и, таким образом, содержат необходимую генетическую детерминанту, отвечающую за повышенный выход консервированного продукта, и осуществляют обратное скрещивание с рекуррентным родителем в течение нескольких поколений для того, чтобы повысить степень инбредности штамма *A. bisporus*. В данном документе термины "интрогрессия", "интрогрессированный" и "интрогрессивный" относятся к способу, посредством которого один ген или множество генов, локус количественных признаков QTL или гаплотип одного вида, культивара или штамма привносятся в геном другого вида, культивара или штамма, в результате скрещивания этих видов. Скрещивание может быть естественным или искусственным. Процесс может необязательно быть дополнен обратным скрещиванием с рекуррентным родителем, в этом случае интрогрессия обозначает инфильтрацию генов одного вида в генетический пул другого вида в результате повторного обратного скрещивания межвидового гибрида с одним из его родителей. Интрогрессия может также быть описана как стабильная интеграция гетерологичного генетического материала в геном штамма-реципиента.

В данном описании выражение "признак" относится к характеристике или фенотипу, например окраске шляпки гриба или устойчивости к заболеванию или патогену. Наследование признака может быть доминантным или рецессивным, частичным или неполным доминантным. Признак может быть моногенным (т.е. детерминированным одним локусом) или полигенным (т.е. детерминированным более чем одним локусом) или может также быть результатом взаимодействия между генами или результатом взаимодействия одного или более генов с окружающей средой.

В данном описании выражение "фенотип" или "фенотипический признак" относится к внешнему виду или другим детектируемым характеристикам индивидуума, которые являются результатом взаимодействия его генома, протеома и/или метаболома с окружающей средой.

"Генетическая детерминанта" в контексте изобретения обозначает ген или локус в геноме или его части, способный улучшать выход консервированного продукта штамма грибов за счет влияния на экспрессию признака на уровне самой ДНК, на уровне трансляции, транскрипции и/или активации конечного полипептидного продукта, т.е. регулировать метаболизм в ткани гриба, что приводит к фенотипической экспрессии генотипа. Генетическая детерминанта является наследуемой, т.е. она может передаваться потомству в результате скрещивания.

"Штамм-донор *A. bisporus*" в контексте изобретения обозначает штамм *A. bisporus*, который обеспечивает генетическую детерминанту, ассоциированную с существенно лучшим выходом консервированного продукта.

"Улучшение выхода консервированного продукта" и "улучшенный выход консервированного продукта" в контексте данного изобретения относятся к грибу, который демонстрирует повышенный выход консервированного продукта, рассчитанный как в примере 2, статистически достоверный при уровне значимости P менее 0,05 или P менее 0,01, при сравнении с грибом контрольного штамма, в частности контрольного штамма A15, который представляет собой промышленный *A. bisporus*, имеющийся в свободном доступе и доступный для приобретения, или любой другой штамм, независимо от его происхождения (промышленный, коллекционный, дикий ...).

Выражение "стадия потребительской спелости" соответствует стадии зрелости гриба, на которой гриб достаточно развит, чтобы быть собранным, т.е. шляпка достаточно изолирована от ножки и размер соответствует обычной товарной категории.

Выражение "пропагативный материал" относится к любому материалу грибов, подходящему для выращивания и плодоношения, но не для скрещивания, и включающему, например, споры, мицелий, грибницу и протопласты. Данный материал является гетерокариотическим.

Выражение "репродуктивный материал" относится к материалу грибов, подходящему для скрещивания и способному к скрещиванию, но не способному к плодоношению. Данный материал является гомокариотическим и соответствует гомокариотам, т.е. гомокариотическому мицелию.

Соответственно на основе описания данного изобретения специалист в данной области, имеющий в своем распоряжении штамм, выбранный из группы, состоящей из J10117, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4950; LB811, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4945, и LB906, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4946, без труда придаст признак улучшенного выхода консервированного продукта по данному изобретению, т.е. генетическую детерминанту, обеспечивающую формирование указанного признака, любому другому штамму *A. bisporus* различных типов, используя способы селекции, хорошо известные в области техники. Признак по данному изобретению, например, передается штаммам *A. bisporus*, продуцирующим грибы различных

типов или форм, демонстрирующим различные уровни отдачи урожая.

В одном воплощении генетическая информация, определяющая формирование признака улучшенного выхода консервированного продукта, особенно на стадии потребительской спелости, по данному изобретению включает генетическую детерминанту, которая находится по меньшей мере в одном локусе, которую/ые получают из штамма *A. bisporus*, выбранного из группы, состоящей из J10117, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4950; LB811, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4945, и LB906, депонированного в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция, 20 января 2015 г. компанией SOMYCEL под номером доступа CNCM I-4946.

Данное изобретение относится к новому признаку гриба *A. bisporus*, который обеспечивает улучшенный выход для консервной промышленности при обработке собранных грибов. Генетическая детерминанта, поддерживающая указанный признак, не охарактеризована последовательностью ДНК, однако существует и является наследуемой. Данная генетическая детерминанта, содержащаяся в депонированном материале, представляет собой инструмент для привнесения требуемого признака улучшенного выхода консервированного продукта, описанного выше, в любой штамм *A. bisporus*, не обладающий указанным признаком. Данный признак может быть легко измерен и представлен в количественном выражении с помощью процедуры анализа, приведенной в примере 2 данного описания.

Депонирование осуществили для того, чтобы специалисты в области техники имели в распоряжении источник культуры, характеризующейся улучшенным выходом консервированного продукта, которую можно использовать для осуществления заявленного изобретения, следовательно, нет необходимости повторять схему селекции для создания штаммов, имеющих указанный признак, поскольку данный признак присутствует у депонированных штаммов и легко передается любому штамму *A. bisporus*.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано изменение общего урожая (кг грибов/м²) во времени (в сутках после гобтировки) в двух исследованиях малого масштаба (каждое исследование представлено на панели А или Б) LB811, LB906, а также контрольных штаммов A15 и Sylvan 512.

На фиг. 2 показано изменение общего урожая (кг грибов/м²) во времени (в сутках после гобтировки) в двух исследованиях среднего масштаба. Экспериментальные и контрольные штаммы культивировали одновременно в одной камере. А: три партии LB906 (в сравнении с A15); Б: три партии LB811 (в сравнении с A15).

На фиг. 3 показано изменение общего урожая (кг грибов/м²) во времени (в сутках после гобтировки) в двух исследованиях крупного масштаба.

Экспериментальные и контрольные штаммы культивировали одновременно в отдельных параллельных камерах. А: LB811 и LB906 (в сравнении с A15); Б: две партии LB906 (в сравнении с A15).

Описание примеров осуществления изобретения 1.

Получение гибридов по изобретению

1.1. Материалы.

LB906 представляет собой гибрид, полученный при скрещивании гомокариона J10117s62 и гомокариона 76s14.

Гибридную культуру гомокариона *Agaricus bisporus* J10117s62 депонировали в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция. Дата депонирования 20 января 2015 г. Номер доступа CNCM I-4948.

Культуру гибрида гомокариона *Agaricus bisporus* 76s14 депонировали в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция. Дата депонирования 20 января 2015 г. Номер доступа CNCM I-4947.

LB811 представляет собой гибрид, полученный при скрещивании гомокариона J10117s62 и гомокариона FS9-18-S50, происходящего от гетерокариона FS9-18.

Гомокарион J10117s62 описан выше.

Гибридную культуру гетерокариона *Agaricus bisporus* FS9-18 депонировали в национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) института Пастера, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 PARIS CEDEX 15, Франция. Дата депонирования 20 января 2015 г. Номер доступа CNCM I-4949.

1.2. Спаривание гомокариотических линий.

Скрещивание можно проводить в чашках. Каждый родительский гомокарион выращивают в чашках с агаризованной средой (картофельный агар с декстрозой, компост-агар ...). Кусочек агара от каждого родительского гомокариона переносят на свежую чашку, так чтобы инокулировать два гомокариона рядом на расстоянии нескольких сантиметров. Чашку инкубировали таким образом, чтобы два гомокариона росли до тех пор, пока не встретились. При их половой совместимости в точке контакта начинал расти новый мицелий, т.е. гибрид. Его кусочки можно переносить на новые чашки и инкубировать.

1.3. Лабораторная культура гибридных штаммов по изобретению.

Гибриды культивировали на чашках с компост-агаром (рН довели до 7) и переносили с чашки на чашку кусочки агара, которые вырезали с помощью пробойника. Чашки культивировали в инкубаторе при 24°C до полной колонизации от одной до двух третей чашки, а затем переносили в холодную комнату с температурой 2°C.

Все микробиологические операции осуществляли в стерильных условиях (ламинарный поток воздуха, стерильные инструменты, среда и упаковки).

2. Оценка свойств гибридов по изобретению.

2.1. Выход консервированного продукта.

Выход консервированного продукта можно оценить путем переработки грибов в промышленной производственной линии, пилотной производственной линии или установках научно-исследовательских лабораторий, воспроизводящих промышленный способ, измеряя при этом массу на каждой стадии процесса. Таким образом, любой может определить массу сухого продукта и рассчитать отношение массы консервированных грибов без сока, например, к массе свежих грибов, взятых в начале процесса. Таким образом, общий выход консервированного продукта можно рассчитать как комбинацию выхода в процентах после дегазации, охлаждения, бланширования и стерилизации.

Для сравнения различных способов обработки используют соответствующий дизайн экспериментов и статистический анализ.

При соблюдении указанных условий две или более разновидностей (например, гибридов, полученных благодаря программе селекции) можно сравнивать друг с другом или с контролем (например, промышленным штаммом).

В исследованиях выхода консервированного продукта способ может выглядеть следующим образом:

- получение грибов,
- определение массы каждой коробки,
- дегазация и гидратирование (отрицательное давление для обеспечения свободного поступления воды в грибы),
- определение массы каждой коробки,
- хранение в холодном помещении,
- определение массы каждой коробки,
- бланширование (12 мин при 90°C),
- охлаждение в коробке (15°C проточная вода),
- слив избыточной воды (2 мин),
- определение массы каждой коробки,
- нарезание слоями (6,25 мм в лабораторной ломтерезной машине),
- заполнение 580-мл банок грибами с массой нетто 330-340 г на банку,
- максимальное заполнение банок рассолом,
- закрывание банок,
- стерилизация банок (автоклав),
- хранение (минимум 5 дней),
- открывание банок,
- слив жидкости (2 мин),
- взвешивание.

У всех партий переработку осуществляли в рандомизированном порядке.

Данные для экспериментальных штаммов нормализовали, принимая значение выхода консервированного продукта в контроле за 100%, используя следующую формулу:

$$НВК_{штамма} = ВК_{штамма} - ВК_{контроля} + 100$$

где НВК - нормализованный выход консервированного продукта;

ВК - выход консервированного продукта.

В каждом исследовании в качестве контроля использовали Sylvan A15.

а) Выход консервированного продукта LB811 и LB906 оценивали в 2 исследованиях.

В первом исследовании грибы сортировали в зависимости от размера на мелкие (менее 45 мм) или крупные (более 45 мм) и изучали влияние размера грибов. Планировалось собрать все грибы в один день для доставки на консервный завод под кодовыми номерами, однако LB906 рос быстрее, и было принято решение осуществить сбор в течение 2 дней подряд и провести сравнение как для двух различных воздействий.

В табл. 5 и 5бис представлены сводные результаты, полученные в двух независимых исследованиях.

Таблица 5

Результаты статистического анализа выхода консервированного продукта (дисперсионный анализ и сравнение средних)

Код	Название штамма	Происхождение	Дата сбора	NCY (%)	*	Среднее (%)
1	A15	Коммерческий штамм <i>Sylvan</i>	D	100,00	B	109,87
2	LB811	Эксп. гибрид <i>Sylvan</i>	D	109,67	A	
3	LB906	Эксп. гибрид <i>Sylvan</i>	D-1	110,19	A	
4	LB906	Эксп. гибрид <i>Sylvan</i>	D	109,74	A	

*Данные с одинаковыми буквенными кодами статистически не различаются (тест Тьюки $\alpha=5\%$).

Таблица 5бис

Результаты статистического анализа выхода консервированного продукта (дисперсионный анализ и сравнение средних)

Код	Название штамма	Происхождение	Дата сбора	NCY (%)	*	Среднее (%)
1	A15	Коммерческий штамм <i>Sylvan</i>	D	100,00	B	99,98
4	512	Коммерческий штамм <i>Sylvan</i>	D	99,95	B	
2	LB811	Эксп. гибрид <i>Sylvan</i>	D	105,82	A	107,05
3	LB906	Эксп. гибрид <i>Sylvan</i>	D	108,28	A	

*Данные с одинаковыми буквенными кодами статистически не различаются (тест Тьюки $\alpha=5\%$).

Значения ВК для контроля A15 были сопоставимы с полученными ранее в слепых исследованиях.

В обоих исследованиях статистический анализ выявил высокую значимость влияния штамма и высокую значимость влияния размера (более крупные грибы обеспечивали более высокий ВК). Для LB906 влияние продолжительности хранения (обработка грибов в день D или D + 1) было незначимым.

В первом исследовании (табл. 3) результаты не продемонстрировали значимых различий между группами экспериментальных гибридов (среднее значение 109,87%). Однако при сравнении с промышленным контролем было обнаружено значимое различие (100,0%), при этом значения у экспериментальных гибридов были почти на 9,9% выше, что является существенным различием для консервной промышленности (как предположили Coale et al., 1972).

Во втором исследовании (табл. 3бис) грибы обрабатывали без учета их размера и, таким образом, влияние размера грибов не исследовали. Результаты не продемонстрировали значимых различий внутри группы промышленных штаммов (среднее значение 99,98%) или внутри группы экспериментальных гибридов (среднее значение 107,05%). Однако различия между экспериментальными и контрольными штаммами были значимыми, при этом у экспериментальных штаммов значения оказались в среднем почти на 7,1% выше по сравнению с контролем.

Увеличение выхода консервированного продукта на 9,9 и на 7,1% являются существенными различиями для консервной промышленности (как предположили Coale et al., 1972).

б) В аналогичных условиях оценивали выход консервированного продукта родительского штамма J10117.

В табл. 6 приведены результаты, полученные при сравнении выхода консервированного продукта J10117 и промышленных штаммов *Sylvan* A15 и *Sylvan* 512.

Анализ, проведенный во всех 3 исследованиях, подтвердил, что выход консервированного продукта J10117 был достоверно выше по сравнению со штаммами A15 и 512 (см. табл. 6).

Таблица 6

Показатели нормализованного выхода консервированного продукта (%) и результаты статистического анализа

Код	Название штамма	Происхождение	Нормализованный выход консервов (%)											
			Исследование 1				Исследование 2				Исследование 3			
			1 волна	*	2 волна	*	1 волна	*	2 волна	*	1 волна	*	2 волна	*
A	J10117	Эксп. гибрид	108,35	A	101,79	A	102,16	AB	109,37	A	109,43	A	108,09	A
B	A15	Промышл. штамм	100,00	B	100,00	B	100,00	BC	100,00	B	100,00	C	100,00	BC
C	512	Промышл. штамм	98,93	B	99,5	B	102,01	AB	98,25	B	107,25	B	99,70	C

Название штамма	Происхождение	Выход консервов (%)			
		Среднее значение для трех исследований			
		1 волна	*	2 волна	*
J10117	Sylvan Эксп. гибрид	106,58	A	106,41	A
A15	Sylvan Промышл. штамм	100,00	D	100,00	B
512	Sylvan Промышл. штамм	103,06	BC	99,15	B

Воздействия с одинаковыми буквенными кодами статистически не различались.

Затем провели более крупномасштабное исследование LB906. Исследования по выращиванию представляли собой одновременное культивирование на фабриках LB906 и контрольного штамма (512) параллельно в нескольких комнатах.

Грибы собирали механическим способом на одинаковых стадиях потребительской спелости и в день сбора доставляли на предприятие по консервированию грибов.

По получению, грибы гидратировали в вакууме и хранили в охлажденном виде до начала переработки.

Когда масса доставленных грибов каждого штамма превышала 3 т, их разделяли и обрабатывали партиями в банках для определения выхода переработанной продукции для каждого штамма в линии по производству консервированного продукта. Способ был аналогичен описанному выше.

ВК партии рассчитывали как отношение массы грибов в банках к массе свежих грибов. Массу грибов в банках рассчитывали путем умножения среднего значения массы сухого продукта в нескольких банках, выбранных из партии (от 13 до 20 банок на партию), на число банок, полученных в данной партии.

Во избежание систематической ошибки данные ВК включали в статистический анализ (Т-критерий Стьюдента) только в том случае, если время хранения партии было в пределах нормального диапазона для предприятия. Для LB906 и 512 в расчетах использовали 9 и 10 серий данных соответственно. НВК рассчитывали, как указано выше.

LB906 демонстрировал среднее значение НВК 103 по сравнению со 100,0 в контроле, т.е. показатель был выше на 3,0%, а различие было статистически значимым (таблица *).

Таким образом, это подтверждало существенное преимущество LB906 по показателю ВК.

Таблица ббис

Показатели нормализованного выхода консервированного продукта (НВК, %) и результаты статистического анализа

Название штамма	Данные нормализованного выхода консервов	Среднее различие	Т-критерий Стьюдента Вывод
512	100,0 ± 3,2 %	3,0 %	0,04 (< 0,05) достоверно
LB906	103,0 ± 3,5 %		

2.2. Вегетативная несовместимость.

При промышленном производстве грибов для более раннего появления и большей равномерности первой волны обычно производят добавление мицелия в слой покровной почвы (т.н. кейсинг, т.е. колонизированный компост или КИ, патентованный материал кейсинг-инокулум (покровная почва с инокулумом)). Эту практику можно использовать для исследования вегетативной несовместимости.

На практике компост заселяют мицелием штамма А, и он колонизирует компост (разрастание мицелия). В конце колонизации со слоем покровной почвы смешивают штамм Б, смесь наносят на поверхность компоста, и его мицелий колонизирует слой покровной почвы (разрастание мицелия покровного слоя). При нормальном режиме выращивания мицелий из компоста и мицелий из слоя покровной почвы будут образовывать анастомозы на границе раздела двух слоев, образуя в субстрате единую сеть мицелия. Будут образовываться примордии первой волны, расти и развиваться в грибы. Для определения вегетативной совместимости двух штаммов можно оценивать развитие мицелия, примордиев и грибов на поверхности (внешний вид и сроки).

Если два штамма А и Б являются вегетативно совместимыми, мицелий будет образовывать анастомозы, будут появляться примордии и грибы будут образовываться и развиваться в нормальном и ожидаемом временном интервале.

Если два штамма А и Б являются вегетативно несовместимыми, мицелий двух штаммов не будет

образовывать анастомозы, не будут появляться примордии и грибы не будут образовываться в нормальном и ожидаемом временном интервале. Антагонизм будет предупреждать или замедлять появление и развитие грибов.

Romaine & Roysse (2011), используя генетическую трансформацию, установили, что после образования анастомоза двумя совместимыми штаммами грибы первой волны будут иметь генотип штамма Б (растущего в покровной почве), тогда как грибы второй волны будут иметь генотип штамма А (разросшегося в компосте).

Исследуемые штаммы культивировали в лотках (1,4 м²), заполненных компостом, зараженным мицелием штамма А (так называемым основным мицелием). Лоток накрывали пластиковым листом с вставленными в него кольцами большого диаметра (диаметр 15,2 см, глубина 3,8 см), получив, таким образом, отдельные деланки. Все тесты на совместимость повторяли в 5 или 10 отдельных деланках.

В конце разрастания мицелия покровную почву смешивали с КИ (кейсинг-инокулумом, или покровной почвой с инокулумом) штамма Б при расходе 375 г/м² и вносили в круглые деланки для проверки совместимости комбинации А/Б.

Все комбинации штаммов А/Б тестировали на совместимость, когда А находился в компосте/Б в покровной почве и наоборот, когда Б находился в компосте/А в покровной почве. Комбинации А/А и Б/Б использовали в качестве контроля.

Все тестируемые деланки орошали водой в день внесения, затем культивировали в условиях, используемых при промышленном производстве грибов.

Ежедневный визуальный осмотр включал силу роста мицелия, появление примордиев и сроки созревания какого-либо урожая. В таблице, приведенной ниже, представлена оценка поверхности покровной почвы на 8 сутки (рост мицелия) и на 16 сутки (наличие примордиев и грибов).

Если при комбинации А/Б плодоношение не происходит или если имеет место только появление примордиев без дальнейшего развития или происходит задержка по сравнению с А/А или Б/Б, то А и Б считают вегетативно несовместимыми.

В табл. 7 показаны результаты, полученные для штаммов по изобретению в сравнении с контрольным штаммом А15 и родительскими штаммами.

Таблица 7

Вегетативная совместимость различных штаммов *Agaricus bisporus*

Рейтинг		Штамм в компосте						
		Вывод	A15	J10117	76	FS9.18	LB811	LB906
Штаммы в покровной почве	A15	8 сутки	Очень хороший рост	Рост отсут.				
		16 сутки	Грибы	Грибы отсут.				
		Вывод	Совместимы	Не совмест.				
	J10117	8 сутки	Рост отсут.	Очень хороший рост	Не опр.	Не опр.	Рост отсут.	Незначит. поверхн. рост
		16 сутки	Грибы отсут.	Грибы			Грибы отсут.	Грибы отсут.
		Вывод	Не совмест.	Совместимы			Не совмест.	Не совмест.
	76	8 сутки	Не опр.	Рост отсут.	Очень хороший рост	Рост отсут.	Не опр.	Рост отсут.
		16 сутки		Грибы отсут.	Грибы	Грибы отсут.		Грибы отсут.
		Вывод		Не совмест.	Совместимы	Не совмест.		Не совмест.
	FS9.18	8 сутки	Рост отсут.	Не опр.	Рост отсут.	Очень хороший рост	Рост отсут.	Рост отсут.
		16 сутки	Грибы отсут.		Грибы отсут.	Грибы	Грибы отсут.	Грибы отсут.
		Вывод	Не совмест.		Не совмест.	Совместимы	Не совмест.	Не совмест.
LB811	8 сутки	Рост отсут.	Рост отсут.	Рост отсут.	Рост отсут.	Очень хороший рост	Рост отсут.	
	16 сутки	Грибы отсут.	Грибы отсут.	Грибы отсут.	Грибы отсут.	Грибы	Грибы отсут.	
	Вывод	Не совмест.	Не совмест.	Не совмест.	Не совмест.	Совместимы	Не совмест.	
LB906	8 сутки	Хороший рост	Рост отсут.	Рост отсут.	Рост отсут.	Рост отсут.	Очень хороший рост	
	16 сутки	Грибы отсут.	Грибы отсут.	Грибы отсут.	Грибы отсут.	Грибы отсут.	Грибы	
	Вывод	Не совмест.	Не совмест.	Не совмест.	Не совмест.	Не совмест.	Совместимы	

В табл. 7бис показаны результаты, полученные для штаммов по изобретению в сравнении с контрольными промышленными штаммами (U1 и A15 и их производными 512, 520, 737), родительскими штаммами и другими штаммами (J9277, J10165, J11500).

Таблица 7бис

Вегетативная совместимость различных штаммов *Agaricus bisporus*

Рейтинг		Штамм в компосте												
		U1	A15	512	520	737	J10117	76	FS9.18	LB811	LB906	J9277	J10165	J11500
U1	9 сутки	Очень хороший рост	Очень хороший рост	Хороший рост	Очень хороший рост	Очень хороший рост	Рост отсут.							
	16 сутки	Грибы	Грибы	Грибы	Грибы	Грибы	Грибы отсут.							
	Вывод	Совместимы	Совместимы	Совместимы	Совместимы	Совместимы	Не совместимы	Не совместимы	Не совместимы	Не совместимы	Не совместимы	Не совместимы	Не совместимы	Не совместимы
A15	9 сутки	Очень хороший рост	Рост отсут.											
	16 сутки	Грибы	Грибы	Грибы	Грибы	Грибы	Грибы отсут.							
	Вывод	Совместимы	Совместимы	Совместимы	Совместимы	Совместимы	Не совместимы	Не совместимы	Не совместимы	Не совместимы	Не совместимы	Не совместимы	Не совместимы	Не совместимы

2.3. Агронимические показатели.

2.3.1. Окраска шляпки и характер поверхности.

Измерения проводили с использованием хромометра Minolta в цветовом пространстве, построенном на оппонентных цветах, с показателями насыщенности белого L и оппонентными цветами a и b.

Параметры: 30 грибов/штамм, 1 измерение (верх шляпки)/гриб, для 1 и 2 волн, на пике волны (перед сбором).

В системе L, a, b цвет описывают 3 компонентами: L (насыщенность белого, от 0 (черный) до 100 (белый)), a (от зеленого (-) до красного (+)), b (от синего (-) до желтого (+)).

Проводили дисперсионный анализ (F-критерий) и сравнение средних (тест Тьюки $\alpha=5\%$) для 3 переменных.

У грибов, произведенных гибридами по изобретению, оценивали характер поверхности (5 категорий: очень гладкая, гладкая, среднечешуйчатая, чешуйчатая, сильночешуйчатая) и внешний вид, т.е. восприятие окраски (5 категорий: очень белая, белая, беловатая, кремовая).

Грибы, произведенные LB811 и LB906, имели визуальную белую окраску шляпки.

LB811 и LB906 демонстрировали более высокие показатели L (насыщенности белого) в первой волне, у LB906 они были достоверно еще более высокими. Во второй волне значения L были сопоставимы с контролями в случае LB811, но достоверно чуть ниже в случае LB906.

Помимо цвета шляпки в строгом смысле слова, гладкость шляпки также создает впечатление, что грибы ярче и/или белее по сравнению с существующими промышленными штаммами, такими как Sylvan A15, которые выращивали в тех же исследованиях. Внешний вид или визуальные характеристики более важны для потребителей, чем абсолютные показатели цвета, поскольку они являются ключевым триггером совершения покупки.

Штамм U1 унаследовал промежуточный фенотип своих гладкого белого и беловатого (чешуйчатого) родителей (Fristche, 1981). Он бывает от слабочешуйчатого до среднечешуйчатого в первой волне и более гладким, начиная со второй волны. Все производные U1 обладают схожим фенотипом (например, A15 и 512).

Напротив, LB811 и LB906 стабильно были более гладкими, чем контрольный A15, культивируемый в тех же условиях, в первой, второй и третьей волнах, независимо от чешуйчатости (от мелкой до крупной) и места проведения клинических исследований (Франция, Англия, Бельгия).

В табл. 8 показана окраска поверхности и внешний вид грибов, произведенных гибридами по изобретению, по сравнению с контрольными штаммами 512 и A15.

Таблица 8

Сравнение 3 цветовых показателей и 2 визуальных оценок
для волн 1 и 2 в исследованиях 1 и 2 (контроли A15 и 512)

Параметр	Параметры измерения окраски						Внешняя оценка			
	L		A		b		Характер поверхности		Внешний вид	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1 волна										
512	92,04 C	92,38 D	-0,65 BC	-0,5 A	8,03 C	6,83 A	гладкая	гладкая	белый	белый
A15	91,97 C	92,65 CD	-0,57 B	-0,57 AB	8,90 A	7,31 AB	средне-чешуйч.	средне-чешуйч.	белый	белый
LB811	93,81 A	93,10 ABC	-0,75 C	-0,63 BC	8,51 ABC	8,25 CD	оч. гладкая	оч. гладкая	оч. белый	оч. белый
LB906	93,36 AB	93,66 A	-0,28 A	-0,73 D	8,21 BC	8,13 BC	оч. гладкая	оч. гладкая	оч. белый	оч. белый
2 волна										
512	93,83 ABC	93,62 A	-0,75 C	-0,69 BC	8,08 CD	7,50 CD	гладкая	гладкая	белый	белый
A15	93,40 A	93,94 A	-0,68 BC	-0,59 B	7,96 D	7,22 D	гладкая	гладкая	белый	белый
LB811	93,50 C	94,29 A	-0,75 C	-0,84 C	8,24 BCD	8,00 BC	оч. гладкая	оч. гладкая	оч. белый	оч. белый
LB906	92,12 D	90,61 B	-0,13 A	0,26 A	8,78 AB	9,16 A	оч. гладкая	оч. гладкая	оч. белый	оч. белый

2.3.2. Фенотипические характеристики.

а. Методы.

Морфологию грибов оценивали с помощью электронного штангенциркуля Mitutoyo со следующими параметрами: 100 грибов/штамм, 4 измерения, для 1 и 2 волн, на пике волны (после сбора).

Измеряли диаметр шляпки ($D_{\text{шляпки}}$), высоту шляпки ($V_{\text{шляпки}}$), диаметр ножки ($D_{\text{ножки}}$) и высоту ножки ($V_{\text{ножки}}$).

Для статистического анализа рассчитывали следующие соотношения:

$$\text{Соотношение 1} = D_{\text{шляпки}} / V_{\text{шляпки}}$$

$$\text{Соотношение 2} = V_{\text{ножки}} / D_{\text{ножки}}$$

Рассчитывали дисперсию (F-критерий) и сравнивали средние значения (тест Тьюки = 5%) для 6 переменных.

б. Результаты.

Морфология гибридов LB906 и LB811 охарактеризована в табл. 9.

Таблица 9

Диаметр шляпки/ножки и высота шляпки/ножки у гибридов по изобретению

Параметр	Параметры измерения окраски						Внешняя оценка			
	L		A		b		Характер поверхности		Внешний вид	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1 волна										
512	92,04 C	92,38 D	-0,65 BC	-0,5 A	8,03 C	6,83 A	гладкая	гладкая	белый	белый
A15	91,97 C	92,65 CD	-0,57 B	-0,57 AB	8,90 A	7,31 AB	средне-чешуйч.	средне-чешуйч.	белый	белый
LB811	93,81 A	93,10 ABC	-0,75 C	-0,63 BC	8,51 ABC	8,25 CD	оч. гладкая	оч. гладкая	оч. белый	оч. белый
LB906	93,36 AB	93,66 A	-0,28 A	-0,73 D	8,21 BC	8,13 BC	оч. гладкая	оч. гладкая	оч. белый	оч. белый
2 волна										
512	93,83 ABC	93,62 A	-0,75 C	-0,69 BC	8,08 CD	7,50 CD	гладкая	гладкая	белый	белый
A15	93,40 A	93,94 A	-0,68 BC	-0,59 B	7,96 D	7,22 D	гладкая	гладкая	белый	белый
LB811	93,50 C	94,29 A	-0,75 C	-0,84 C	8,24 BCD	8,00 BC	оч. гладкая	оч. гладкая	оч. белый	оч. белый
LB906	92,12 D	90,61 B	-0,13 A	0,26 A	8,78 AB	9,16 A	оч. гладкая	оч. гладкая	оч. белый	оч. белый

Показатели с одинаковыми буквенными кодами достоверно не различаются.

LB811 отличается более тонкой прямой ножкой и закругленной шляпкой.

Более конкретно, диаметр ножки был достоверно и стабильно меньше по сравнению с контролями, т.е. тонкая ножка была характерным признаком.

LB906 отличается более прямой ножкой и менее закругленной шляпкой по сравнению с промышленными контролями.

Более конкретно, соотношение 1 (диаметр шляпки/высота шляпки) было достоверно и стабильно меньше, чем у контролей, т.е. сплюснутая шляпка была характерным признаком.

Таким образом, гибриды по изобретению (J10117, LB906 и LB811) имеют соответствующий фенотип для механического сбора (прямая ножка, грибы растут по-отдельности и равномерно распределены по площади) и хорошее общее качество грибов.

2.3.3. Агрономические исследования.

а. Методы.

На разных фабриках провели исследования малого, среднего и крупного масштаба.

Разработали схемы экспериментов для проверки вертикального климатического градиента в каждой культивационной камере, делянки внутри каждого уровня рандомизировали. Число делянок и размер делянок увеличивалось от более ранних к более поздним стадиям скрининга.

В исследованиях малого масштаба делянки представляли собой кюветы 0,12 м² (от 2 до 15 делянок, распределенных между 5 уровнями), степень заполнения - 75,5 кг компоста/м², внесение мицелия - 0,7%, разрастание мицелия в кюветах 12 дней (II фаза), покровная почва - 53%, белый торф - 21%, черный торф - 9%, известняк - 17%, гипс, заращивание покровного слоя 9 дней и рыхление за 2 дня до аэрации.

В исследованиях среднего масштаба делянки представляли собой кюветы 1,45 м² (от 3 до 12 делянок, распределенных между 4 уровнями), степень заполнения - 83 кг компоста/м², внесение мицелия - 0,5%, разрастание мицелия в кюветах 15 дней (фаза II), покровная почва - 80% черный торф - 10%, белый торф - 10%, известняк, использованный при очистке сока сахарной свеклы, внесение инокулула в покровный слой - 375 г/м² и заращивание покровного слоя 8 дней.

В исследованиях крупного масштаба разрастание мицелия проводили в течение 16 дней в тоннеле (III фаза), внесение мицелия - 0,5%, лотки - 1,5 м² (20 или 25 делянок/штамм, распределенных между 5 уровнями), заполняли по 90 кг инкубированного компоста/м² с внесением добавок 1,33 кг/м² (MC Substradd), покрытых 100% торфом, внесение инокулула в покровный слой - 300 г/м² и заращивание покровного слоя 7 дней.

В каждое исследование включали промышленный контроль (Sylvan A15). На ранних стадиях скрининга (маломасштабные, среднемасштабные и крупномасштабные исследования) новые штаммы и контроли выращивали в одной камере (смешанные камеры). На более поздних стадиях (среднемасштабные и крупномасштабные исследования) контроль культивировали одновременно в идентичной параллельной камере (отдельные камеры), используя практику культивирования, адаптированную для каждого штамма, способствующую их росту и продуктивности, и оценивали их оптимизированные возможности.

Полив адаптировали в зависимости от каждого воздействия и делянки.

Грибы собирали на каждой делянке на стадиях 2-3 и ежедневно регистрировали воздействие и массу.

В исследованиях малого масштаба помимо величины урожая ежедневно регистрировали количество грибов на делянку.

Скороспелость (сроки созревания) оценивали, начиная как с даты сбора первых грибов, так и с даты пика первой волны (день, когда масса собранных грибов была максимальной), сравнивая данные штамма с данными промышленного контроля.

Способность давать урожай оценивали как массу грибов на единицу площади (т.е. кг/м²) в исследованиях малого, среднего и крупного масштаба, в сравнении с 1-2 промышленными контролями (Sylvan A15, Sylvan 512) с соответствующим дизайном экспериментов, включая внутренние репликаты.

Составляющие урожая (количество грибов и средняя масса грибов=масса/количество) оценивали в

исследованиях малого масштаба.

б. Результаты.

Улучшенные сроки являются преимуществом при возделывании культур в том, что касается качества грибов и с экономической точки зрения, поскольку в начале уборочного периода грибы меньше подвержены нападению вредителей и заболеваниям по сравнению с более поздними днями первой волны и последующим волнам урожая.

При этом существование практически во всем мире монокультуры *A. bisporus* представляет серьезное ограничение для производителей грибов по диапазону имеющихся в их распоряжении характеристик культуры (Romaine & Royle, 2011) и, следовательно, такие уникальные признаки, как сроки созревания и распределение урожая по времени в ходе уборочного периода могут рассматриваться как преимущество в существующих условиях.

В табл. 10 показаны сроки созревания LB811 и LB906 в исследованиях малого, среднего и крупного масштабов (представленные в сравнении с промышленным контролем Sylvan A15).

LB906 превосходит промышленный контроль по такому показателю, как сбор первых грибов, в 66% тестов, а по такому показателю, как пик первой волны, в 64% тестов. Таким образом, LB906 можно охарактеризовать как ранний штамм в сравнении с контролем.

LB811 превосходит промышленный контроль по такому показателю, как сбор первых грибов, в 48% тестов, а по такому показателю, как пик первой волны, в 60% тестов. Таким образом, LB811 можно охарактеризовать как ранний штамм в сравнении с контролем, хотя и в меньшей степени, чем LB906.

На фиг. 1-3 показано изменение общего урожая во времени для гибридов по изобретению в сравнении с промышленными контролями (A15, Sylvan 512) в исследованиях малого, среднего или крупного масштабов.

Как показано на фиг. 1 (А и Б), 2А и 3 (А и Б), LB906 всегда превосходит промышленные штаммы A15 и Sylvan 512 по срокам. Кроме того, LB906 также превосходит LB811 по срокам в исследованиях малого (см. фиг. 1А и 1Б) и крупного масштаба (см. фиг. 3А).

Что касается LB811, на фиг. 2Б и 3А показано, что он превосходит по срокам контрольные штаммы в исследованиях среднего масштаба и крупного масштаба, хотя и не демонстрирует преимущества в исследованиях малого масштаба (фиг. 1А и 1Б).

Таким образом, эти графические материалы демонстрируют улучшенные сроки (т.е. более ранний сбор грибов первой волны), больший вклад первых дней первой волны в общий урожай и способность гибридов по изобретению давать урожай в сравнении с промышленными контролями.

Таблица 10

Сроки созревания LB811 и LB906 в исследованиях малого, среднего и крупного масштаба

Штамм	Чешуйчатость	Тип (смеш. / отдельные камеры)	К-во исслед.	К-во тестов	День первого сбора первой волны Сроки* для контроля – сроки* для нового штамма (в одном исследовании)								День пика первой волны Сроки* для контроля – сроки* для нового штамма (в одном исследовании)							
					-2	-1	0	1	2	3	4	-2	-1	0	1	2	3	4		
LB811	мелкая	смеш.	12	31	1	0	11	8	9	2	0	0	0	14	17	0	0	0		
LB811	средняя	смеш.	13	44	0	0	26	4	14	0	0	0	4	12	21	6	1	0		
LB811	средняя	отдельн.	0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/		
LB811	крупная	смеш.	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0		
LB811	крупная	отдельн.	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0		
			80	1	0	41	12	24	2	0	0	4	28	40	6	2	0	0		
					1 (1,3%)	41 (51,3%)	38 (47,5%)			4 (5,0%)	28 (35,0%)	48 (60,0%)								
Штамм	Чешуйчатость	Тип (смеш. / отдельные камеры)	К-во исслед.	К-во тестов	День первого сбора первой волны Сроки* для контроля – сроки* для нового штамма (в одном исследовании)								День пика первой волны Сроки* для контроля – сроки* для нового штамма (в одном исследовании)							
					-2	-1	0	1	2	3	4	-2	-1	0	1	2	3	4		
LB906	мелкая	смеш.	13	27	0	0	7	1	9	8	2	0	0	6	21	0	0	0		
LB906	средняя	смеш.	11	38	1	0	14	2	21	0	0	0	2	14	16	0	6	0		
LB906	средняя	отдельн.	1	6	0	0	3	0	3	0	0	0	0	2	1	0	3	0		
LB906	крупная	смеш.	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
LB906	крупная	отдельн.	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0		
			76	1	0	25	7	33	8	2	0	2	25	38	2	9	0	0		
					1 (1,3%)	25 (32,9%)	50 (65,8%)			2 (2,6%)	25 (32,9%)	49 (64,5%)								

В табл. 11 показана отдача урожая (кг/м²) LB811 и LB906 в исследованиях малого масштаба.

Таблица 11

	Первая волна				Общие данные (первая + вторая волны)			
	Исследование 1		Исследование 2		Исследование 1		Исследование 2	
512 (контроль)	12,82	A	10,03	C	22,23	A	18,89	A
A15 (контроль)	13,48	A	10,57	BC	21,99	A	19,10	A
LB811-1	9,94	B	8,43	D	15,95	C	16,13	B
LB811-2	10,31	B	8,25	D	16,21	C	15,31	B
LB811-3	9,91	B	9,79	C	15,86	C	16,61	B
LB906-1	13,46	A	12,04	A	20,60	B	18,75	A
LB906-2	13,79	A	11,47	AB	20,42	B	19,12	A

Значения с одинаковыми буквенными кодами статистически не различаются (тест Тьюки, $\alpha=5\%$).

В табл. 12 показано количество грибов LB811 и LB906 (грибов/делянку) в исследованиях малого масштаба.

Таблица 12

	Первая волна				Общие данные (первая + вторая волны)			
	Исследование 1		Исследование 2		Исследование 1		Исследование 2	
512 (контроль)	151,81	A	104,00	A	312,03	A	224,67	A
A15 (контроль)	148,33	A	100,53	A	289,20	A	216,93	A
LB811-1	109,80	B	77,07	B	188,80	C	170,87	CD
LB811-2	107,80	B	79,53	B	182,60	C	160,00	D
LB811-3	100,20	B	95,27	AB	170,93	C	168,60	CD
LB906-1	147,53	A	101,93	A	246,80	B	183,73	BC
LB906-2	157,80	A	95,73	AB	243,93	B	192,13	B

Значения с одинаковыми буквенными кодами статистически не различаются (тест Тьюки, $\alpha=5\%$).

Кроме того, более крупные грибы могут обладать преимуществом на рынке, поскольку на ручной сбор приходится большая, если не основная часть производственных затрат: когда грибы более крупные и тяжелые, каждое отдельное действие при сборе более эффективно и, таким образом, повышается производительность сбора.

Поэтому оценивали среднюю массу грибов по изобретению.

В табл. 13 показана средняя масса грибов (г/гриб) LB906 и LB811.

Таблица 13

	Первая волна				Вторая волна			
	Исследование 1		Исследование 2		Исследование 1		Исследование 2	
512 (контроль)	10,13	C	11,74	B	7,08	C	8,83	C
A15 (контроль)	10,96	ABC	12,68	B	7,26	C	8,76	C
LB811-1	10,83	ABC	13,43	AB	9,19	AB	9,94	BC
LB811-2	11,49	AB	12,55	B	9,55	AB	10,64	AB
LB811-3	11,84	A	12,61	B	10,20	A	11,31	A
LB906-1	11,01	ABC	14,61	A	8,80	B	9,86	BC
LB906-2	10,48	BC	14,63	A	9,36	AB	9,46	BC

Значения с одинаковыми буквенными кодами статистически не различаются (тест Тьюки, $\alpha=5\%$).

В данном исследовании малого масштаба, когда LB811 выращивали в одной культивационной камере с промышленным контролем, его способность давать урожай была ниже по сравнению с промышленными контролями как в первой, так и во второй волнах (табл. 11), поскольку он производит меньшее количество грибов (табл. 12); однако грибы LB811 обычно бывают крупнее, о чем свидетельствуют показатели его средней массы (табл. 13). Таким образом, производительность при его сборе существенно повышается.

При выращивании с промышленным контролем LB906 демонстрирует сопоставимую величину урожая (табл. 9), при этом в первой волне урожай более высокий. LB906 производит сопоставимое коли-

чество грибов в первой волне и меньшее количество грибов во второй волне (табл. 10); эти грибы крупнее, о чем свидетельствуют показатели средней массы (табл. 11). Таким образом, производительность при его сборе существенно повышается.

LB811 и LB906 дополнительно анализировали в специальных исследованиях среднего и крупного масштаба, чтобы подтвердить возможность достижения таких же показателей урожая, как в исследованиях малого масштаба (табл. 12, фиг. 1-3).

Результаты исследований среднего и крупного масштаба показали, что по итоговому урожаю LB811 сопоставим с промышленными контролями и превосходит их по срокам в первой волне (табл. 12, фиг. 2, 3).

Результаты показали, что по итоговому урожаю LB906 сопоставим с промышленными контролями и превосходит их по срокам в первой волне (табл. 14, фиг. 2, 3).

Таблица 14

Отдача урожая (кг/м²) LB811, LB906 и A15 в исследованиях малого, среднего и крупного масштаба

Чешуйчатость	Первая волна			Вторая волна			Всего		
	LB811	LB906	A15	LB811	LB906	A15	LB811	LB906	A15
мелкая	9,97 – 10,34 – 9,89	13,82 – 13,44	13,44	6,04 – 5,89 – 5,96	6,64 – 7,17	8,53	15,95 – 16,21 – 15,86	20,42- 20,60	21,99
мелкая	8,46 – 8,23 – 9,82	11,48 – 12,00	10,57	7,70 – 7,02 – 6,80	7,63 – 6,72	8,53	16,13 – 15,31 – 16,61	19,12 – 18,75	19,10
средняя	не опр.	10,64 – 9,57 – 10,19	12,22	не опр.	9,05 – 9,69 – 8,22	7,89	не опр.	19,87 – 19,26 – 18,47	20,10
средняя	14,17 – 14,20 – 11,94	не опр.	10,21	7,57 – 8,68 – 10,15	не опр.	12,72	21,74 – 22,88 – 22,09	не опр.	22,92
крупная	15,48	16,48	14,64	9,82	10,24	11,74	29,18	29,50	30,35
крупная	не опр.	17,78	17,24	не опр.	10,41	11,64	не опр.	32,07	33,69

2.4. Генотипирование.

2.4.1. SSR-фингерпринт.

а) Методы.

12 штаммов генотипировали методом фингерпринта на основе SSR-маркеров (простых коротких повторов, т.е. микросателлитов):

3 родительских гетерокариона: FS9.18, Somycel 76, гибрид Sylvan J10117,

3 родительских гомокариона: FS9.18s50, 76s14, J10117s62,

2 гибрида Somycel (гетерокарионы): LB811, LB906,

4 контроля (гетерокарионы, промышленные штаммы): U1, Sylvan A15, Sylvan 512 и Sylvan 520.

Из культур в чашках готовили бульонные культуры данных штаммов, растирая кусочки агаровой культуры в картофельно-декстрозном бульоне. После инкубации в течение 1-3 недель при 24°C (в зависимости от скорости роста) бульонные культуры фильтровали (крепированная фильтровальная бумага, используемая для качественного анализа, задерживающая частицы 40 мкм). Мицелий подвергали сублимационной сушке: замораживали (-196°C жидкий азот) и лиофилизировали до сухого состояния.

Выделяли общую ДНК классическим методом с использованием ЦТАБ-хлороформа-изоамилового спирта, концентрацию ДНК довели до 25 нг/мкл и хранили (-20°C).

Выполняли генотипирование по 22 кодоминантным микросателлитным маркерам, перечисленным в табл. 15 (последовательности праймеров и условия амплификации см. Foulongne-Oriol et al. 2009). Прямые праймеры были мечены одним из следующих флуоресцентных красителей (6-FAM, PET, VIC и NED), как указано ниже:

6-FAM: AbSSSR 12 14 23 36 58 64,

PET: AbSSSR 05 13 39 43 56 57,

VIC: AbSSSR 02 19 33 42 49,

NED: AbSSSR 31 45 59 60 65.

Капиллярный электрофорез и определение размера фрагментов выполняли на секвенаторе ABI 3130 (Applied Biosystems) с использованием внутреннего стандарта GenScan™ 600 LIZ (Applied Biosystems) (Foulongne-Oriol et al., 2012).

б) Результаты.

В табл. 15 и 15бис представлены фингерпринты 4 промышленных контролей (U1 и 3 производных U1, а именно Sylvan A15, 512 и 520), 2 гибридов (LB811 и LB906), 3 их гетерокариотических родителей (J10117, FS9.18 и 76) и 3 их гомокариотических родителей (J10117s62, FS9.18s50 и 76s14) на основе анализа 22 SSR-маркеров.

Фингерпринты U1, A15, 512 и 520 демонстрируют 100% идентичные результаты по 22 маркерам и, таким образом, подтверждают отсутствие генетического разнообразия среди существующих промышленных штаммов (Foulongne-Oriol et al., 2011, Sonnenberg et al., 2011).

Напротив, генотип LB811 отличается от всех производных U1 по 4 маркерам из 22 (18,2%): AbSSSR 23 39 58 65.

Генотип LB906 отличается от всех производных U1 по 5 маркерам из 22 (22,7%): AbSSSR 02 23 36

39 42.

Генотип LB811 и LB906 отличается друг от друга по 5 маркерам из 22 (22,7%): AbSSSR 02 36 42 58 65.

Уникальные фингерпринты 3 гибридов LB811, LB906 и J10117, основанные на анализе 22 маркеров, приведены в табл. 15.

Таблица 15

Фингерпринт генотипа U1 и 3 промышленных производных U1, основанный на анализе 22 SSR-маркеров

Маркеры	U1	Sylvan A15	Sylvan 512	Sylvan 520
AbSSR02	188/188	188/188	188/188	188/188
AbSSR05	329/332	329/332	не опр.	329/332
AbSSR12	171/171	171/171	171/171	171/171
AbSSR13	212/212	212/212	212/212	212/212
AbSSR14	167/167	167/167	167/167	167/167
AbSSR19	191/191	191/191	191/191	191/191
AbSSR23	170/176	170/176	170/176	170/176
AbSSR31	167/167	167/167	167/167	167/167
AbSSR33	192/192	192/192	192/192	192/192
AbSSR36	149/157	149/157	149/157	149/157
AbSSR39	186/186	186/186	186/186	186/186
AbSSR42	177/179	177/179	177/179	177/179
AbSSR43	231/231	231/231	231/231	231/231
AbSSR45	193/203	193/203	193/203	193/203
AbSSR49	174/174	174/174	174/174	174/174
AbSSR56	225/225	225/225	225/225	225/225
AbSSR57	257/257	257/257	257/257	257/257
AbSSR58	167/169	167/169	167/169	167/169
AbSSR59	197/201	197/201	197/201	197/201
AbSSR60	206/208	206/208	206/208	206/208
AbSSR64	104/104	104/104	104/104	104/104
AbSSR65	188/213	188/213	188/213	188/213

Таблица 15бис

Фингерпринт генотипа гибридов по изобретению и их родителей, основанный на анализе 22 микросателлитных SSR-маркеров

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

LB811 и LB906 имеют в качестве родителей один запатентованный штамм Sylvan (J10117) и один

промышленный или ранее использовавшийся в качестве промышленного штамм (FS9.18 и 76 соответственно).

LB906 имеет в качестве одного родителя запатентованный штамм (J10117) и в качестве еще одного родителя пре-гибридный штамм беловатой окраски (76).

Фингерпринт генотипа демонстрирует полиморфизм между родителями:

при сравнении 2 гетерокариотических родителей полиморфизм выявляется по 11 маркерам из 21 (52,4%),

при сравнении 2 гомокариотических родителей:

по 11 маркерам из 21 (52,4%) полиморфизм между гомокариотическими родителями отсутствует,

по 8 маркерам из 21 (38,1%) выявляется полиморфизм между гомокариотическими родителями: AbSSR 02 05 39 45 58 59 60 65.

Указанные маркеры можно использовать для демонстрации происхождения LB906.

LB811 имеет в качестве родителей один запатентованный штамм (J10117) и один промышленный штамм (FS9.18).

Фингерпринт генотипа демонстрирует полиморфизм между родителями:

при сравнении 2 гетерокариотических родителей полиморфизм выявляется по 14 маркерам из 22 (63,6%),

при сравнении 2 гомокариотических родителей:

по 14 маркерам из 22 (63,6%) полиморфизм между гомокариотическими родителями отсутствует,

по 9 маркерам из 22 (40,9%) выявляется полиморфизм между гомокариотическими родителями: AbSSR 05 36 39 42 45 58 59 60 65.

Указанные маркеры можно использовать для демонстрации происхождения LB811.

При сравнении LB811 с его гетерокариотическими родителями, U1 и всеми его производными (т.е. J10117, FS9.18, U1, A15, 512 и 520), LB811 отличается по 2 маркерам: AbSSR 58 и 65.

2.4.2. Аллели, контролирующие тип спаривания, и генотип молекулярного маркера P1N150.

Маркер P1N150 сцеплен с локусом MAT (Xu et al., 1993, Kerrigan et al., 1993). Его последовательность можно найти в референтной последовательности генома H97 V2.0 (Morin et al., 2012), опубликованной департаментом энергетики (DOE) американского объединенного института генома (JGI). 5'-конец данного маркера начинается в положении 868615 скаффолда 1. Последовательности аллелей 1, 2, 3, 4 и 7 маркера P1N150 приведены в SEQ ID NO: 1-5 соответственно.

U1 и все его производные (включая Sylvan A15, 512 и 520) характеризуются гетероаллельным генотипическим профилем "1/2". Гетерокарионы беловатой окраски (включая Somysel 76) характеризуются гетероаллельным генотипическим профилем "1/3" (Imbernon et al., 1995).

Гетерокариотические родители J10117, FS9.18 и 76 характеризуются гетероаллельными генотипическими профилями "2/4", "2/7" и "1/3" соответственно.

Гомокариотические родители J10117s62, FS9.18s50h и 76s14 характеризуются гомоаллельными генотипическими профилями "4", "7" и "3".

Гибрид LB811 характеризуется уникальным гетерокариотическим генотипическим профилем "4/7".

Гибрид LB906 характеризуется уникальным гетерокариотическим генотипическим профилем "3/4".

Таким образом, J10117, LB811 и LB906 можно отличить от всех производных U1, от их гетерокариотических или гомокариотических родителей и друг от друга по генотипу P1N150.

2.4.3. Генотипирование с помощью ПЦР.

В табл. 16 приведена сводная информация о материалах и методах, использованных для генотипирования штаммов по изобретению методом ПЦР в сравнении с другими гибридными штаммами или гомокариотическими штаммами, такими как J10165 (описан в US 20100218294 и US 2100154079), J11500 (описан в WO/2015/114612) и J9277 (описан в US 20080182321 и US 2010154079).

Таблица 16

Маркер	Прямой праймер	Обратный праймер	Параметры ПЦР			Аллели
			Кол-во циклов	Темп. отжига	Время элонгации	
P1N150	5'- AGGCRYC CCATCTTC ASC-3' SEQ ID 6	5'- GTTCGAC GACGGAC TGC-3' SEQ ID 7	35	56 °C	1 мин	1 (или 1T) 2 3 4 7
ITS	5'- TCCGTAG GTGAACC TGCGG-3' SEQ ID 8	5'- TCCTCCG CTTATTGA TATGC-3' SEQ ID 9	35	56 °C	1 мин	L1 L2 L4 L6 L10
MFPC-1- ELF	5'- AYTCRCAA MAACATA CCTTCAAC -3' SEQ ID 10	5'- CATTCCGG CGATTTTC TCA-3' SEQ ID 11	35	55 °C	0.5 мин	E1 E2 E7 E8 E9
AN	5'- GACGATG CGGGACT GGTGGAT- 3' SEQ ID 12	5'- GGTCTGG CCTACRG GAGTGT GT-3' SEQ ID 13	35	64 °C	2 мин	N1 N2 N5 N6 N7
AS	5'- CCGCCAG CACAAAG AATCAAAT G-3' SEQ ID 14	5'- TCAGTCG GCCCTCA AAACAGTC -3' SEQ ID 15	35	64 °C	2 мин	SD SH SC SB SG
FF	5'- TCGGGTG GTTGCAA CTGAAAA G-3' SEQ ID 16	5'- TTCCTTTC CGCCTTAA TTGTTTCT- 3' SEQ ID 17	35	64 °C	2 мин	FF1 FF2 FF4 FF5 FF9 FF10

Нуклеотидные последовательности прямых и обратных праймеров представлены в SEQ ID NO: 6-17.

Результаты, полученные на основании данного способа генотипирования, представлены в табл. 17 ниже (аллель 1 в данной таблице пронумерован как 1T относительно маркера P1N150, а выше представлена подробная информация по различным аллелям данного маркера). Различные аллели маркеров ITS, MFPC-1-ELF, AN, AS, FF отличаются своими полиморфными последовательностями.

Таблица 17

Комбинации аллелей различных маркеров, которые исследовали у различных штаммов

маркер	J10117	J10117-s62	FSfs9fs 99-18	FS9-18-s50	LB811	LB906	A-15	J9277	J10165	J11500
P1N150	2/4	4	2/7	7	4/7	3/4	1T/2	1T/4	1/2	1T/2
ITS	I2/I6	I2/I6	I10/I10	I10	I2/I10	I1/I2	I1/I2	I2/I4	I2/I5	I1/I4
MFPC-1-ELF	E1/E8	E1	E7/E9	E7	E1/E7	E1/E1	E1/E2	E1/E2	E1/E1	E1/E1
AN	N1/N7	N1	N6/N6	N6	N1/N6	N1/N1	N1/N2	N1/N5	N1/N2	N1/N5
AS	SD/SH	SH	SB/SC	SB	не опр.	SD/SH	SC/SD	SD/SG	SC/SG	SC/SD
FF	FF2/FF4	FF4	FF9/FF10	FF9	FF4/FF9	FF2/FF4	FF1/FF2	FF2/FF2	FF2/FF5	FF1/FF1

Результаты вновь свидетельствуют, что штаммы по данному изобретению генетически отличаются от любого известного штамма.

В табл. 18 показан ряд генетических отличий между штаммами, выявленных при исследовании маркеров методом ПЦР.

Таблица 18

	Кол-во маркеров	A15	LB811	LB906	J10117	J10165	J11500	J9277
LB811	5	5						
LB906	6	5	5					
J10117	6	6	5	4				
J10165	6	5	5	4	6			
J11500	6	4	5	4	6	5		
J9277	6	5	5	4	6	6	5	

Каждый из штаммов обладает уникальным генотипическим профилем, выявляемым с помощью данной панели из 6 ПЦР-маркеров.

Ряд аллелей, по которым штаммы различаются между собой (при попарном сравнении), представлен в табл. 18 выше.

Перечень последовательностей

<110> SOMYCEL

<120> НОВЫЕ ГИБРИДНЫЕ ШТАММЫ ГРИБА AGARICUS Впредставляет собойРилиUS

<130> D34403

<140> PCT/EP2016/051393

<141> 2016-01-22

<150> EP 15305073.7

<151> 2015-01-23

<160> 17

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 1114

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> P1N150 Аллель 1

<220>

<221> прочий_признак

<223> P1N150 Аллель 1

<220>

<221> прочий_признак

<222> (1114)..(1114)

<223> n представляет собой a, c, g, или t

<400> 1
taaccgagac tgtgctctcg taccaagcaa cctgggaate acctgattt gcggtcattt
60
taactagatt agctgccate tcaattcggf cggtaaaagg cacgtactct tctcgtatct
120
tttctccctt cgtcacgaga gcgctatact ctctcgcaga cagaccatct agcagattcc
180
ctatcaaatt actgtagcat tgctcccaag ttgtatacca gccattctct tgacgcgttg
240
ctccacaaaa agtcggaacc tcaaaccxaa agccctcgtg gctcttgtae tgatgtaact
300
cagttgccag cctcttcgct agaagatcgg aggcaccoga agacagagge gccatattct
360
tgtattccga aacaaagaaa ggcgtcccat cttcaccggt accgtaggca atcatcctca
420
gtaaaaagag ttttcaggca ttttcgggta tctcaggccc tgaacatagg ctgagaattg
480

tcctctttct cgaacaatgc gagaacatga tcagccaag ttcaggcaag ttgctttaa
540

tataatacat ttgttgggcc aagctcaggc tgtgttcagg catcgttcaa ggtgtaagaa
600

cttcaactgt caccgacctt cagggtgcca atcgacccta aatcgaccct aatcagcct
660

gcattatcca gaattacgtt gaattgacct ggattagcct gatagatcct gataatattt
720

tttactgaga atcatcgctg gcgcaagccc aggagctgcg gtacctatgg cttegagtga
780

tcgcgcttcg ccaagatact gctcagactc cgacggcgat cctgatttca cgaaatcgt
840

ttgaccagtt gatgactgaa ccttgggaag atttccgggt aactgagcat ctggatcgat
900

gctttgcaga ttttcgagta tgatacgagg tagcattgga attgggaaag gtttagaatt
960

tctcaccgcg gagctccgga tcgtgcta atagtgacg tcagtgaacc tatcacggca
1020

gtccgctgct gaactttggt cgaaccgaca ttccacgttt cccatccagt tctttttttc
1080

atccccatgct gacaaatagc cgtgggtccaa cacn
1114

<210> 2
<211> 877
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> P1N150 Аллель 2

<220>
<221> прочий_признак
<223> P1N150 Аллель 2

<220>
<221> прочий_признак
<222> (1)..(1)
<223> n представляет собой а, с, г, или т

<220>
<221> прочий_признак
<222> (5)..(5)
<223> n представляет собой а, с, г, или т

<220>
<221> прочий_признак

<222> (876)..(877)

<223> n представляет собой а, с, г, или т

<400> 2

ncaangcttg ccctggaatc atagtcaaga aargggacat aatcgagact gtactctcgt
60

accaagcaac ctgggaatca ccctgatttg cgttcatttt aactagatta gctgccatct
120

caattcggtc ggtcaaaggc acgtactttt ctogtatctt ttctcccttc gtcacgagag
180

cgccatactc tcgctcgagac aggccatcta gcagattccc tatcaaatta ctgtagcatt
240

gctcccaagt tgtataccag ccattcctct gacgcgttgc tccacaaaaa gtcggaacct
300

caaacccaaa gccctcgtgg ctcttgact gatgtaactc agttgccagc ctcttcgcta
360

gaagatcaga ggcacccgaa gacagaggcg ccatatcctt gtattccgaa acaaagaaag
420

gcacccatc ttcaccgta ccgtaggcaa tcacgctgg cgcaagccca ggagctcgg
480

tacctatggc ttcgagtgat cgcgcttcgc caagatactg ctcagactcc gacggcgatc
540

ctgatttcac gaaatacgtt tgaccagtcg atgactgaac cttgggaaga tttccggtga
600

actgagcatc tggatcgatc ctttgcatg tttcagatg gatacgaggt agcattggaa
660

ttgggaaagg tttggaattt ctcaccgagg agctccggat cgtgctaata atagtgacgt
720

cagtgaacct atcacggcag tccgctcgtc aactttggtc gaaccgacat tccacgtttc
780

ccatccagtt atttttttca tcccattgctg acaaatagcc gtgggtccaac acctataaaa
840

acgacctcgc tcagcatgcg cttctgacat gtcacnn
877

<210> 3

<211> 545

<212> ДНК

<213> искусственная

<220>

<223> P1N150 Аллель 3

<220>

<221> прочий_признак
 <223> P1N150 Аллель 3

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

<210> 4
 <211> 598
 <212> ДНК
 <213> искусственная

<220>
 <223> P1N150 Аллель 4

<220>
 <221> прочий_признак
 <223> P1N150 Аллель 4

<400> 4
 tcccaagttg tataaccagcc attcctctga cgcgtcgcct cacaaaaagt cggaacctca
 60
 aatccaaagc cctcgtggct cttgtactga tgtaactcag ttgccagcct cttcgtctaga
 120
 agatcagagg caccscaaga caaaggcgcc atattcttgt attccgaaat aaagaaaggc
 180
 gccccatctt caccgttacc gtaggcaatc atcgtggcgg caagcccagg agctgcggta
 240

035884

cctatggctt cgagtgatcg cgcttcgcca agatactgct cagactccga cggcgatcct
300

gatttcacga aatacgtttg accagttgat gactgagctt tgggaagatt tccggtgaac
360

tgagcatccg gatcgatcct ttgcagattt tcgagtatga tacgaggtag cattggaatt
420

gagaaagggtt tggaaatttct caccgcgag ctccggatcg tgctaataat agtgacgtca
480

gtgaaactat cacggcagtc cgtcgtcgaa ctttggtaa accgacattc cacgtttccc
540

atccagtact tttttcatc ccatgctgac aaatagcct agtccaacac ctataaaa
598

<210> 5
<211> 558
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> P1N150 Аллель 7

<220>
<221> прочий_признак
<223> P1N150 Аллель 7

<400> 5
aatccaaagc cctcgtggct cttgtactga tgtaactcag ttgccagcct cttcgtctaga
60

agatcagagg caccgaaga caaaggcgcc atattcttgt attccgaaat aaagaaaggc
120

gccccatctt caccgttacc gtaggcaatc atcgtcggcg caagcccagg agcccggtta
180

cctatggctt cgagtgatcg cgcttcgcca agatactgct cagactccga cggcgatcct
240

gatttcacga aatacgtttg accagttgat gactgagctt tgggaagatt tccggtgaac
300

tgagcatccg gatcgatcct ttgcagattt tcgagtatga tacgaggtag cattggaatt
360

ggtaaagggtt tggaaatttct caccgcgag ctccggatcg tgctaataat agtgacgtca
420

gtgaaactat cacggcagtc cgtcgtcgaa ctttggtaa accgacattc cacgtttccc
480

atccagttct tttttcatc ccatgctgac aaatagcct agtccaacac ctataaaaac
540

gacctcgaat csaagcc
558

<210> 6
<211> 18
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> прямой праймер

<400> 6
aggcgcgcca tcttcacg
18

<210> 7
<211> 17
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> обратный праймер

<400> 7
gttcgacgac ggactgc
17

<210> 8
<211> 19
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> прямой праймер

<400> 8
tccgtaggtg aacctcgg
19

<210> 9
<211> 20
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> обратный праймер

<400> 9
tcctccgctt attgatatgc
20

<210> 10
<211> 23
<212> ДНК

<213> искусственная
<220>
<223> прямой праймер
<400> 10
ауtсrсааmа асаtасsttс аас
23

<210> 11
<211> 18
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> обратный праймер

<400> 11
саttсggсgа ttttсtса
18

<210> 12
<211> 21
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> прямой праймер

<400> 12
gасgаtссgг gасtggtgga t
21

<210> 13
<211> 23
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> обратный праймер

<400> 13
ggтсtggссt асrggаgtgt tgt
23

<210> 14
<211> 23
<212> ДНК
<213> искусственная

<220>
<223> прямой праймер

<400> 14
ссgссаgсас ааggаатсаа atg
23

<210> 15
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> искусственная

<220>
 <223> обратный праймер

<400> 15
 tcagtcggcc ctcaaaacag tc
 22

<210> 16
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> искусственная

<220>
 <223> прямой праймер

<400> 16
 tcgggtggtt gsaactgaaa ag
 22

<210> 17
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> искусственная

<220>
 <223> обратный праймер

<400> 17
 ttcttttccg ccttaattgt ttct
 24

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гибридный штамм гриба *Agaricus bisporus* - продуцент плодовых тел, имеющий в качестве первого родителя штамм *A. bisporus* CNCM I-4950 и в качестве второго родителя другой штамм *A. bisporus*, продуцирующий белые плодовые тела, где указанный гибрид выбран из группы, состоящей из

штамма *A. bisporus* CNCM I-4945,
 штамма *A. bisporus* CNCM I-4946 и

их производных, где указанные производные представляют собой гибриды *A. bisporus*, содержащие все молекулярные маркеры SSR и/или аллельные комбинации маркера P1N150 штамма *A. bisporus* CNCM I-4945, или штамма *A. bisporus* CNCM I-4946, или штамма *A. bisporus* CNCM I-4950, причем аллельные комбинации маркера P1N150 являются такими, как указано в табл. 17, молекулярные маркеры SSR являются такими, как указано в табл. 15бис, и

где указанный гибридный штамм *A. bisporus* продуцирует плодовые тела, характеризующиеся меньшей потерей массы при их консервировании по сравнению с плодовыми телами контрольного коммерчески доступного штамма *A. bisporus* A15, при этом потерю массы при консервировании определяют, как раскрыто в описании.

2. Гибридный штамм по п.1, отличающийся тем, что указанные производные представляют собой гибриды, полученные от штамма *A. bisporus* CNCM I-4945 или штамма *A. bisporus* CNCM I-4946 посредством соматического отбора, отбора тканевых культур, моноспоровой селекции, многоспоровой селекции, спаривания мицелия, полученного из гомокариотических или гетерокариотических спор указанных гибридов, самооплодотворения, повторного спаривания с возвратом к исходной культуре, мутагенеза, привнесения признака, интрогрессивного привнесения признака, инбридинга или трансформации.

3. Гибридный штамм гриба *A. bisporus* CNCM I-4945 - продуцент плодовых тел.

4. Гибридный штамм гриба *A. bisporus* CNCM I-4946 - продуцент плодовых тел.

5. Гомокарионы, полученные от гибридного штамма гриба *A. bisporus* по любому из пп.1-4.

6. Способ получения плодовых тел грибов гибридных штаммов *A. bisporus* по любому из пп.1-4, при котором осуществляют следующие стадии:

а) инокулируют среду для культивирования грибов гибридным штаммом *A. bisporus* по любому из пп.1-4,

б) поддерживают указанную среду в условиях, благоприятных для образования плодовых тел грибов, и

в) собирают образовавшиеся плодовые тела грибов с указанной среды для культивирования.

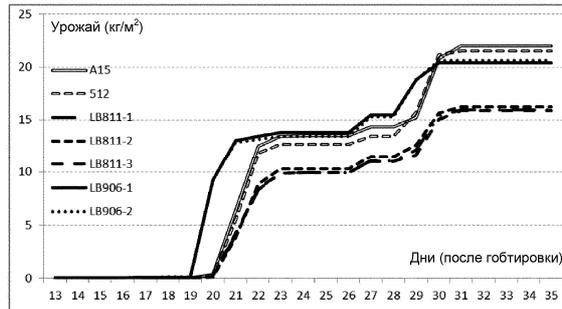
7. Плодовое тело гриба *A. bisporus*, полученное способом по п.6.

8. Гибридный штамм гриба *A. bisporus* CNCM I-4950 - продуцент плодовых тел.

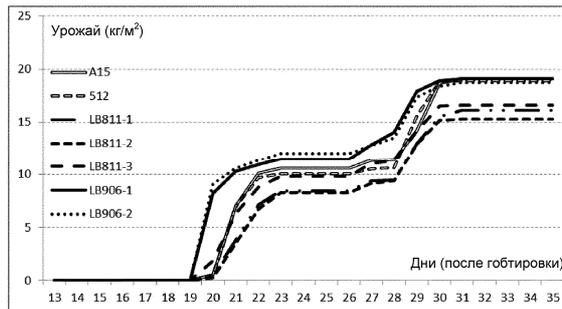
9. Способ получения производного гибридного штамма гриба *A. bisporus* по п.1, который продуцирует плодовые тела, характеризующиеся меньшей потерей массы при их консервировании по сравнению

с плодовыми телами контрольного коммерчески доступного штамма *A. bisporus* A15, при этом потерю массы при консервировании определяют, как раскрыто в описании, включающий стадии, при которых:

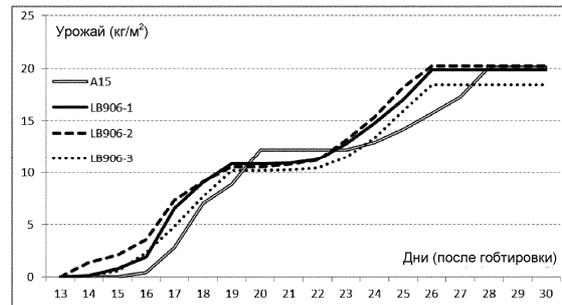
- i) выращивают пропативный материал гибридного штамма *A. bisporus* по п.1 и выделяют из него репродуктивный материал,
- ii) скрещивают репродуктивный материал, полученный на стадии i), с репродуктивным материалом штамма *A. bisporus*, который не обладает заявленными свойствами,
- iii) выращивают пропативный материал, полученный при скрещивании, и снова собирают пропативный материал, и
- iv) выращивают плодовые тела грибов из пропативного материала, собранного на стадии iii), и отбирают производное гибридного штамма гриба *A. bisporus*, который обладает заявленными свойствами.



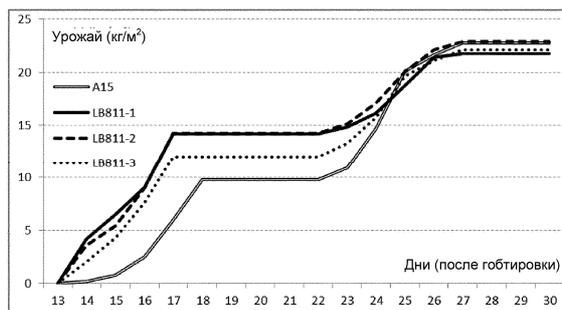
Фиг. 1А



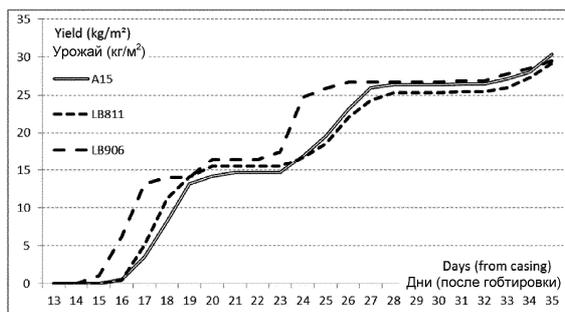
Фиг. 1Б



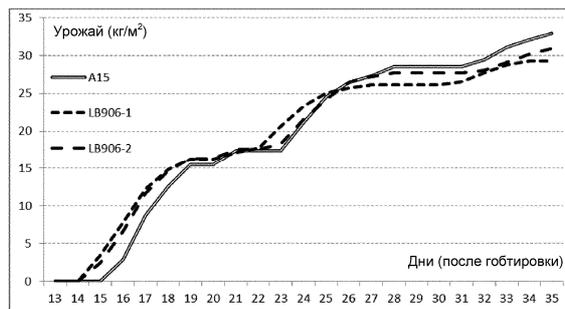
Фиг. 2А



Фиг. 2Б



Фиг. 3А



Фиг. 3Б

