



HU000227705B1

(19) **HU**(11) Lajstromszám: **227 705**(13) **B1****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 00 02164**(22) A bejelentés napja: **1997. 06. 04.**(40) A közzététel napja: **2000. 11. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2011. 12. 28.**(51) Int. Cl.: **A01H 5/12** (2006.01)**A01H 1/06** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/NL 97/00313

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 9746080

(30) Elsőbbségi adatok:

1003261	1996. 06. 04.	NL
08/748,212	1996. 11. 12.	US

(72) Feltaláló(k):

Jansen, Johannes Petrus Antonius, Zwijndrecht (NL)

(73) Jogosult(ak):

Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel B.V., De Lier (NL)

(74) Képviselő:

dr. Pethő Árpád, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54)

Levéltetű-rezisztencia a keresztesvirágúak családjában

(57) Kivonat

A találmány tárgyát a keresztesvirágúak családjába (Compositae) tartozó Nr-rezisztenciagént tartalmazó új növények képezik, különösen Lactuca nemzetséghez tartozó salátanövények, amelyek Nasonovia ribisnigri levéltetűre rezisztensek.

A találmány szerinti növények a levéltetű-rezisztenciának köszönhetően mezőgazdaságilag előnyösen termesztethetők.

MEGADÁS ALAPJÁUL
SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT

B1

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

Levéltetű-rezisztencia a keresztesvirágúak családjában

A találmány tárgyát a keresztesvirágúak családjába (Compositae) tartozó Nr-rezisztenciagént tartalmazó új növények képezik, különösen *Lactuca* nemzetséghez tartozó salátanövények, amelyek *Nasonovia ribisnigri* levéltetűre rezisztensek.

A találmány szerinti növények a levéltetű-rezisztenciának köszönhetően mezőgazdaságilag előnyösen termesztethetők.

A levéltetűk sok pusztítást okoznak a zöldségtermésben. A növények háncsrészét (floémjét) eszik, és ezáltal csökkent vagy abnormális növekedést okoznak. Élő levéltetűk vagy levéltetű-maradványok eladhatatlanná teszik a leszűretelt termést. Ezenkívül a levéltetűk mézharmatot, egy cukros folyadékot választanak ki, amely egy ragadós réteget formál a leveleken. A levéltetűk nagyon retteggett élőlények, nemcsak közvetlen pusztításuk miatt, hanem azért is, mert vírusos betegségeket terjesztenek.

A *Nasonovia ribisnigri* levéltetű-faj Európában leggyakrabban a mezőkön termesztett salátákon fordul elő. A *N. ribisnigri* különösen ártalmas, mert táplálkozásában a növények fiatal leveleit részesíti előnyben. A levéltetűket en-

nélfogva könnyen fogságba ejtik az összezáródó salátafejek, ami nehezzé teszi rovarölő szerekkel való elérhetőségüket. Különösen szorosan záródó fejeket kialakító, tömör fejű salátatípusokban okoz ez komoly problémákat. A növénytermesztők a növekvő haszonnövények rovarölő szerekkel való ismételt permetezésével korlátozzák a levéltetvek kártételét, különösen akkor, amikor az időjárási viszonyok kedveznek a levéltetvek szaporodásának. Túlzott mennyiségű rovarölő szer alkalmazása nem kívánatos környezetvédelmi szempontból. A növényvédő szerek ezenkívül adott esetekben nem érik el céljukat, a fentebb leírtak szerint például zárt salátafejek esetén.

Növények rezisztenciája (gazdanövény-rezisztencia), amelyeken levéltetvek előfordulnak, környezetbarát alternatívája a rovarölő szerek alkalmazásának levéltetvek fejlődésének szabályzására, például salátákban. Ezért átfogó kutatást végeztek *N. ribisnigri* elleni rezisztencia és az ilyen típusú rezisztencia örökölhetősége érdekében. Számos, *N. ribisnigri* rezisztens, salátákhoz tartozó kultúrnövényváltozatot írtak le [Dunn, J. A. és Kempton, D.P.H., "Tests of Agrochemical and Cultivars", No. 1., Ann. Appl. Biol. 94, Supplement, 58-59 (1980)]. Majdnem tökéletes *N. ribisnigri* rezisztenciát találtak vad típusú, *L. virosa* *L.* növényben, amely egy *Lactuca*-változat [Eenink, A. H. és F. L. Dieleman, *Euphytica* 32, 691-695 (1983)]. Az *L. virosaban* talált *Nasonovia*-rezisztenciát egyetlen domináns gén határozza meg, amelyet Nr-génnek neveznek.

1981-ben *L. sativa* növényeket hoztak nyilvánosságra a korábbi "Institute for Horticultural Plant Breeding" (IVT, ma a CPRO-DLO része) intézetből (Wageningen), amelyek genomjukban olyan *L. virosa*-ból származó kromoszómafragmenst tartalmaztak, amely *N. ribisnigræ* rezisztenciát meghatározó, Nr-gént tartalmazott. Ezek a növények *L. virosa*-val és *L. sativa*-val végzett hibridizációs program eredményeként jöttek létre, amelyekben *L. serriolæ*-t alkalmazták hídfajként. Hídfajt akkor alkalmaznak, ha két faj csak korlátozott mértékben keresztezhető egymással, mint az *L. virosa* és az *L. sativa*.

A nyilvánosságra hozott növények fenotípus és mezőgazdasági jellemzők tekintetében nem kívánt típusúak voltak (fejet nem képeztek, gyenge tenyésztési tulajdonságok).

A nem kívánatos mezőgazdasági jellemzők miatt ezeket a növényeket a nemesítő cégek hibridizációs szülőként alkalmazták olyan növények genetikai rekombinációval és szelekcióval való előállítására céljából, amelyekben az *N. ribisnigræ* rezisztencia jó mezőgazdasági jellemzőkkel kombinálódik.

Az *L. sativa* egynyári faj, de mesterséges megvilágítás alatt, magasabb hőmérsékleten növesztve 2-5 egymást követő generáció nevelhető fel egy év alatt. A visszakeresztezési eljárás általánosan ismert és alkalmas módszer "donor szülőből" származó gének keresztezésére nagy mezőgazdasági értékkel rendelkező, genetikai háttérbe. Általában egy domináns gén introgressziója mezőgazdaságilag elfogadható fenotípusba 3-5 visszakeresztezéssel érhető el, me-

lyet 2-3 önbeporzás követ. Ezért 3-5 év alatt, 5-8 generáció szükséges ahhoz, hogy genomjukban a kívánt gént tartalmazó, mezőgazdaságilag elfogadható növényekhez jussunk. Azonban, bár Nr-génnel rendelkező növényeket már 1981-ben előállítottak vetőmagokat termelő cégek, az Nr-gén sikeres átvitelét mezőgazdaságilag elfogadható salátanövényekbe még nem irták le.

A találmány szerinti megoldás kidolgozása során célul tűztünk ki keresztesvirágúak (*Compositae*) családjához tartozó növények, különösen új salátanövények előállítását, amelyekben *Nasonovia ribisnigri* fajhoz tartozó levéltetűrezisztencia jó mezőgazdasági jellemzőkkel kombinálódik.

Ezt a célt a találmány szerinti megoldással úgy értük el, hogy egy szelekciós program során azt találtuk, hogy jó mezőgazdasági jellemzőkkel rendelkező salátanövényekben a rezisztencia alkalmazását nem tették lehetővé az *L. virosaból* származó, Nr-gént tartalmazó kromoszómafragmens által okozott negatív mellékhatások, amikor azt *L. sativa* genomjába inszertáltuk. *N. ribisnigri*re nem rezisztens, tenyésztett salátanövényekhez hasonlítva, az Nr-génre homozigóta növények valójában csökkent növekedést, világosabb zöld színt és generatív állapotban lévő növények öreg leveleiben a klorofill felgyorsult degradációját mutatták (amikor a növény felmagzik). Ez azt eredményezte, hogy szaporodásra képes növények teljesen vagy részlegesen fehér, öregebb levelekkel és/vagy csökkent növénymagassággal rendelkeztek. Ezt a mezőgazdaságilag nem kívánt fenotípust a továbbiakban a leírásban "CRA-fenotípusnak" ("Compact growth

and Rapid Ageing", azaz tömzsi növekedés és gyors öregedés) nevezzük. Az 1. ábrán látható egy példa normál salátanövények és CRA-növények közötti különbségre. Vegetatív állapotban a CRA-szimptómák különösen feltűnőek, amikor a növények stressz hatása alatt növekednek (például alacsony hőmérsékleten).

A találmány tárgyát tehát olyan növények képezik, amelyek genomjukban Nr-rezisztenciagént tartalmaznak, és a CRA-fenotípusért felelős genetikai információ a növények genomjában nincs jelen, vagy csak akkora mértékben, hogy a CRA-fenotípus nem képes expresszálni.

A találmány azon a felismerésen alapul, hogy a CRA-fenotípus nem magának az Nr-génnek az eredménye, hanem a rezisztenciagén szomszédságában lévő genetikai információ következménye. A találmány szerint tehát azt találtuk, hogy kapcsolat van a rezisztencia és a CRA-fenotípus között. Ezen kapcsolat megszüntetésével lehetséges rezisztens, mezőgazdaságilag elfogadható növényeket nevelni. Másrészt az irodalomban és saját kutatásaink alapján azt találtuk, hogy az *L. virosa* más tulajdonságai is gyakran asszociáltak CRA-fenotípussal, ha más növényekbe keresztezzük azokat. Maxon Smith és Langton kapcsolatot írtak le ["The Grower", 21/9/1989, 54-55. old.] a tömzsi növekedés és *Bremia lactucea* elleni rezisztencia között, amelyet *L. virosa*-ból introgresszáltak termesztett salátába. A találmány szerint ez is megoldható, azaz, hogy a CRA-fenotípus genetikailag kapcsolatban van a kívánt tulajdonsággal. A CRA-fenotípus

recesszív tulajdonság, amely csak homozigóta, rezisztens növényekben expresszálódik.

Amint ezt felismertük, lehetőségessé vált olyan növények szelekciója, amelyekben a CRA-fenotípusért felelős genetikai információt eltávolítottuk az NR-gén szomszédságából, vagy kicseréltük olyan mértékben, hogy a rezisztencia már tovább nem expresszálódott a CRA-fenotípussal kombinációban. A leírás példái az Nr-rezisztenciagénre vonatkoznak, de a találmány alapelve szerint természetesen más CRA-val kapcsolt, L. virosából származó tulajdonságokat is felhasználhatunk.

A CRA-fenotípusban megnyilvánuló genetikai információ eltávolítását vagy megváltoztatását a gén szomszédságában végzett rekombinációs eseménnyel/kke/1 váltjuk ki. Jelenleg még nem teljesen világos, hogy a CRA-információ vajon a gén bal, jobb vagy mindkét oldalán helyezkedik el. Ha a CRA-fenotípusért felelős genetikai információ a rezisztenciagén mindkét oldalán megtalálható, előnyösen a genetikai információ mindkét részét kicseréljük vagy eltávolítjuk. A találmány szerint előnyösen végül olyan növényeket szelektálunk, amelyekben két vagy több rekombinációs esemény ment végbe. Természetesen nincs szükség ilyen dupla rekombinációs esemény bekövetkezésére egy generációban, de egymást követő generációkban végbemenő rekombinációs események végül a rezisztenciagén mindkét oldalán lévő genetikai információ eltávolítását vagy cseréjét eredményezhetik. Ha a CRA-információ a génnek csak az egyik oldalán helyezkedik el, természetesen egyetlen rekombinációs esemény is elegendő.

A leírásban a "rekombinációs esemény" kifejezés jelentésén meiotikus crossing-overt értünk.

CRA-fenotípus nélküli növényekhez szokásos hibridizációs technikák alkalmazásával juthatunk. Azonban olyan körülmények között, amelyben megfelelő szelekciós kritériumokat alkalmazunk. A találmány szerinti megfelelő szelekciós kritériumokat már definiáltuk, és pedig a rezisztenciagén szomszédságából származó genetikai információ egy darabjának teljes vagy részleges hiánya vagy inaktivitása. A találmány szerint nincs jelentősége, hogy a rezisztenciagén körüli genetikai információ mekkora része hiányozzon egy rekombinánsból, vagy milyen módon dezaktiválódjon/janak/ a CRA-gén vagy CRA-gének mindaddig, amíg a CRA-fenotípus nincs jelen a növényben és leszármazottjaiban.

Abból a célból, hogy olyan növényeket találjunk, amelyekben az Nr-gén és a CRA-fenotípusért felelős gének között rekombináció történt, a gyakorlatban egy rekombináns fenotípusra szkrinélünk növényeket, azaz *N. ribisnigris*re való rezisztenciára nem-CRA-fenotípussal kombinációban. Bár ezzel a módszerrel találhatunk alkalmas rekombinánsokat, ahogyan a példákban látható, azonban számos oka van, hogy miért lehet bonyolult mezőgazdaságilag értékes rekombinánsokat találni.

A rezisztencia és jó mezőgazdasági tulajdonságok kombinációjára végzett szelekciós programban azt találtuk, hogy azok a növények, amelyben az *N. ribisnigri* irányában mutatott rezisztencia mezőgazdaságilag értékes fenotípussal kombinálódott, majdnem minden esetben nem egy kromoszómában

végbement rekombináció eredményeképpen jöttek létre, hanem heterozigóták voltak introgresszált *L.* virosából származó kromoszómafragmensre. A találmány szerint azt találtuk, hogy a CRA-fenotípus recesszíven öröklődik. Mivel az *Nr*-gén domináns, egyetlen kópia *L.* virosából származó kromoszómafragmenst tartalmazó növényben a rezisztencia normál (nem-CRA) fenotípussal kombinálódik. Ilyen növények utódai azonban szegregálódnak CRA-fenotípusra, és nem lehet kereskedelmi célokra felhasználni, mert a kereskedelemben elérhető salátavariánsok tiszta vonalak, amelyeknek a genetikai egységesség szigorú követelményeinek kell eleget tenniük a forgalomba hozatal céljából. Továbbá azt találtuk, hogy mivel a rezisztencia expressziója különböző környezeti és kísérleti körülményektől függő biológiai tulajdonság, *N. ribisnigri* rezisztenciatesztben a növények bizonyos részét gyakran helytelenül osztályozzuk. *Nr*-gént tartalmazó növényeket érzékenynek tekintünk, és *Nr*-gén nélküli növényeket rezisztensnek tekintünk. Ugyanez vonatkozik egyedi növények CRA-fenotípusú besorolására a földeken vagy az üvegházban. Kísérleti és környezeti körülményektől függően *L.* virosából származó kromoszómafragmenst inszertálva tartalmazó növények bizonyos részét normál, homozigóta állapotban lévőnek tekintünk, míg számos más, inszertált kromoszómafragmenst tartalmazó növényeket heterozigóta állapotban lévőnek, vagy inszertált kromoszómafragmenst egyáltalán nem tartalmazó növények olyan szimptomákat mutathatnak, amelyek alapján tévesen CRA-fenotípusba soroljuk azokat.

A fentebb leírt nehézségek ellenére, amelyek ugyan előfordulhatnak, a példákban látható, hogy a kívánt, a CRA-fenotípusért felelős genetikai információt nem tartalmazó növények szelekciója hagyományos módszerrel nagyon jól lehetséges. Ez a szelekciós módszer azonban viszonylag nagy szegregált populációt vagy nagyszámú hibridizációt igényel.

Ennélfogva hatékonyabb molekuláris biológiai eszközöket alkalmazni megfelelő növények szelekciójára. Kimagaslóan hasznos technika Vos., P. és munkatársai által leírt AFLP-technika [Nucleic Acid Research 23 (21), 4407-4414 (1995)]. A találmány szerinti alkalmazásban ez a technika genetikailag az Nr-génhez kapcsolódó DNS-markerek térképezésére alapul, amely után viszonylag egyszerű módon meghatározható, vajon történt-e rekombinációs esemény az Nr-gén szomszédságában egy hibridizációs kísérletből származó utódban. Ha egy kapcsolt marker hiányzik, crossing-over történt (ezért) az Nr-gén és a marker között. A géntől különböző távolságokban lévő markerek választásával az is meghatározható, hogy nagy vagy kis darab tűnt-e el a gén szomszédságából. Azokban az utódban, amelyekben a kapcsolt markerek közül egy vagy több hiányzik, és ennél fogva legalább egy darab hiányzik a gén nem kívánt, szomszédos szakaszából, és ezért az átlagosnál nagyobb az esélye, hogy az Nr-gént tartalmazó kromoszóma a CRA-fenotípust eredményező genetikai információ nélkül van jelen. Olyan növények szelekciójának hatékonysága, amelyekben a homozigóta jelleg CRA-fenotípus nélküli Nr-génnel kombinálódik, molekuláris markerekkel szignifikánsan megnövelhető.

Egy gén szomszédságában lévő genetikai markerek térképezését célzó eljárást egészen könnyen képes végrehajtani átlagos molekuláris biológiai ismeretekkel rendelkező személy, és amelyek leírásait lásd például Lefebvre, V. és A. M. Chevre, "Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review", *Agronomie* 15 (1), 3-19 (1995); Michelmore, R. W., "Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes", *Annual Review of Phytopathology* 33, 393-427 (1995); Michelmore, R. W., R. V. Kesseli és E. J. Ryder, "Genetic mapping in lettuce", In: R. L. Phillips és I. K. Vasil (szerk.), "DNA-based markers in plants", Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht (1994) 223-239. old.; Winter, P. és G. Kahl, "Molecular marker technologies for plant improvement", *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11 (4), 438-448 (1995). Az AFLP-technológiára vonatkozó általános információk megtalálhatók Vos, P. és munkatársai (mint fent). A 2. példában részletesebben kifejtjük az AFLP-technológia alkalmazását a találmány szerinti növények szelekciójára.

A találmány szerinti megoldást a leírásban *Lactuca sativa* saláta tenyésztésével szemléltetjük. Szakember számára nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti megoldás alapelvei ehhez hasonlóan más *Lactuca* nemzetséghez tartozó fajokra, és általánosabban a keresztesvirágúak (*Compositae*) családjához tartozó növényekre is alkalmazhatók. Az *L. sativa* tenyésztése által tehát nem kívánjuk korlátozni az igényelt oltalmi kört.

A találmány szerinti rezisztenciagén előnyösen *L.* virosából származik. A találmány szerinti növények természetesen teljesen termékenyek és homozigóták a rezisztenciagénre. CRA-fenotípust eredményező genetikai alap hiánya miatt a növények lényegében nem mutatnak csökkent növekedést, csökkent zöld színt a levelekben és idő előtti klorofill-degradációt, ha a növények generatív fázisban vannak.

"Tenyésztett saláta" vagy "tenyésztett salátanövény" kifejezésen a leírásban olyan salátát értünk, amely fogyasztásra alkalmas, és eleget tesz a kereskedelmi célú tenyésztés követelményeinek. Magukon a salátanövényeken és fogyasztásra alkalmas részein, például fejeken és leveleken kívül, a találmány szerinti megoldás részét képezik szaporításra alkalmas növényi részek és származékok. Szaporításra alkalmas növényi részek például szerves szövetek, úgymint levelek, szárak, gyökerek, sarjak és hasonlók, protoplasztok, szomatikus embriók, portokok, levélgyekek, természetben lévő sejtek és hasonlók. Szaporításra alkalmas származékok például magok. A találmány szerinti növényeket hagyományos módszerekkel tenyészthetjük vagy szaporíthatjuk, de növényi részekből származó szövettenyésztési technikák alkalmazásával is.

A találmány szerinti növényeket (amelyek jellemzője, hogy az *Nr*-gént homozigóta állapotban, CRA-fenotípus nélkül tartalmazzák) *N. ribisnigri* rezisztencia átvitelére alkalmazhatjuk mezőgazdaságilag értékes, más salátatípusokba. Ez elvégezhető például standard visszakeresztezési eljárások alkalmazásával egy domináns génre [lásd Briggs, F. N. és P.

F. Knowles, In: "Principles of plant breeding" 162-167. old. (1967)], melyet a növények önbeporzása követ legalább két generáción keresztül, és azután a rezisztenciagénre homozigóta vonalak szelekciója.

A szelekciós program adott lépéseiben keresztbeporzást alkalmaztunk. Azonban önbeporzó növények keresztbeporzása esetén szükséges, hogy megakadályozzuk az öntermékenyítést a nőivarú szülőként alkalmazott növényben. Ez úgy érhető el, hogy manuálisan eltávolítjuk a szaporítószervek termős részeit. Ezt elvégezhetjük azok fizikai eltávolításával, vagy kémiai ágensek és/vagy víz alkalmazásával a virágokon. A szaporítószervek termős részeinek eltávolítására vagy funkciójának megfosztására szolgáló ezen módszerek szakember által jól ismertek. Egy hibridizáció utódjához úgy juthatunk, hogy a hibridizáció porzós szülőjével magot termeltetünk, az F₁ vagy visszakeresztezésből származó magot fogunk, és elvetjük azt új növények növesztése céljából. F₁-növényeket önbeporzásnak vethetjük alá az F₂-generáció előállítására céljából, vagy visszakeresztezzük a visszakeresztezési vázlat szerinti rekurrens (visszatérő) szülővel. Visszakeresztezett növények tovább visszakeresztezhetők a rekurrens szülői növénnyel, hogy a következő generáció növényeinek mezőgazdasági értékét javítsuk, vagy önbeporzásnak vethetjük alá Nr-génre homozigóta növények előállítására céljából.

A találmány első specifikus, előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát RZ 96.85123 vonalhoz tartozó *L. sativa* L. növények képezik, melyek előállítását

részletesebben a 2. példában ismertetjük. Ezen vonalhoz tartozó növények homozigóták Nr-génre, és hiányzik belőlük a CRA-fenotípust okozó genetikai információ. Ezek a növények nem kicsik és/vagy nem sárgák, mint a CRA-növények. Ha a növények nem kicsik és/vagy nem sárgák, a CRA-fenotípust okozó genetikai információ elegendő része hiányzik, vagy ezen genetikai információ kielégítően dezaktiválva van. A találmány szemléltetése céljából az RZ 96.85123-növények magvait deponáltuk 40804. NCIMB-nyilvántartási szám alatt, 1996. május 16-án. Olyan feltételeket szabtuk, hogy a szabadalom megadásának dátumáig a deponált magvakat csak szakember részére lehet kiadni.

A találmány másik előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát az 1. példában leírt, hagyományos hibridizációs eljárás eredménye és specifikus szelekciós vázlat képezi, az RZ 96.75906-vonalhoz tartozó növények előállítására. Ezek a növények ugyancsak homozigóták az Nr-génre, és hiányzik belőlük a CRA-fenotípust okozó genetikai információ. A találmány szemléltetése céljából az RZ 96.75906-növények magvait deponáltuk 40803. NCIMB-nyilvántartási szám alatt, 1996. május 16-án.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás a találmány szerinti növények előállítására, amelyben Nr-rezisztenciára heterozigóta, szülői növényt szelektálunk, előállítunk szegregált populációt, előállítjuk a szegregált populáció lényegében minden egyes növényének utódját, és megvizsgáljuk az utódokat a rezisztenciára és a CRA-fenotípusra. Szegregált populáció különböző módokon állítható elő,

például heterozigóta szülői növény önbeporzásával, heterozigóta szülői növény rezisztens növényvel való keresztezésével, és kettős haploid technika alkalmazásával a heterozigóta szülői növényen. A kettős haploid technikában új növényeket tenyésztünk ki a növény kettős gamétáiból. A gaméták származhatnak a termős reproduktív szervekből (androgenezis), vagy a porzós reproduktív szervekből (gynogenezis). Kettős haploidok tenyésztete rendszerint egy *in vitro* lépést igényel. A kettős haploidok előnye rekombinánsok keresésében az, hogy a gaméták, amelyekből a növények származtak, heterozigóta szülői növényben bekövetkezett meiotikus rekombináció eredményei, míg az így kapott kettős haploidok teljesen homozigóták, így a heterozigóták álcázó hatásai elkerülhetők.

A kettős haploid technikával kapott növényekben a kívánt rekombináns azonnal felismerhető: rezisztens és CRA-nélküli növény. Szegregált populációvonalakból származó, növények önbeporzásával kapott vonalak a kívánt rekombináns növényekkel rendelkeznek, melyek az alapján ismerhetők fel, hogy a vonal egységesen rezisztens, de még szegregált CRA-ra, vagy az alapján, hogy a vonal még szegregált a rezisztenciára, de egységesen normál fenotípussal rendelkezik, vagy az alapján, hogy a vonal egységesen rezisztens és egységesen normál fenotípussal rendelkezik.

Az említett eljárás hatékonyságát szignifikánsan javítani lehet, ha lényegében minden egyes növény utódainak előállítására előtt előtesztet végzünk azokon a növényeken, amelyekben a kívánt rekombinációs esemény bekövetkezett.

Ilyen előteszt lehet például molekuláris biológiai módszer, például AFPL-technika végrehajtása. Az AFLP-technika szerinti szelekció a szegregált populációból származó növények genomjában, az Nr-gén lokuszának szomszédságában bekövetkezett rekombinációs események detektálására alapul.

Az alábbi példákkal a találmány szerinti megoldást kívánjuk részletesebben ismertetni, amelyek kizárólag szemléltetés célját szolgálják anélkül, hogy igényünket bármilyen módon az ismertettekre korlátoznánk.

Általános megjegyzések a példákhoz

A találmány szerinti növények előállítására alkalmazott technikákat itt nagyon általánosan írjuk le. Az elvégzett kísérletek speciális, további részleteibe a példákban tekintünk be.

Anyagok és módszerek

1. Rezisztenciateszt

N. ribisnigri elleni rezisztenciát úgy mutathatjuk ki, hogy növények populációját növesztjük, és az egyes növényeket bizonyos számú (például 15) *N. ribisnigri* levéltetűvel inokuláljuk. A rezisztencia akkor bizonyosodik be, ha bizonyos tesztidő után (például 7 nap) a növényen lévő levéltetűk száma 0, vagy kevesebb, mint a kiindulási szám, míg érzékeny növényeken az egy növényre jutó levéltetűk száma megnövekedett a tesztperiódus után.

Az érzékeny változathoz tartozó növényeket kontrollként tartalmazza a teszt. A levéltetűknek jól láthatóan szaporodniuk kell ezeken a kontrollnövényeken a teszt

alatt, hogy az megbízhatóan elfogadható legyen. A tesztet előnyösen 18 és 24°C közötti hőmérsékleten végezzük, a minimális nap-hossz 14 óra. Körülbelül 1-3 valódi levéllel rendelkező, vegetatív fázisban lévő kis növényeket alkalmazunk előnyösen *N. ribisnigri* egyedekkel való inokulációra, bár idősebb növényeket is alkalmazhatunk a rezisztencia-tesztben. Az *N. ribisnigri* rezisztencia nemcsak a teszt körülményei között figyelhető meg, hanem ehhez hasonlóan a földeken vagy üvegházban is látható.

A rezisztenciatesztben alkalmazott, WN1-jelű levéltetűk a piros biotipushoz tartoztak, és beszerzési forrásuk „Department of Entomology of the Agricultural University of Wageningen” volt. A teszt előtt salátanövényeken tenyészítettük azokat. Természetesen zöld színű levéltetűket is lehet alkalmazni. A rezisztenciatesztet olyan magokkal végeztük, amelyeket cserepes komposztömbökbe vetettünk. A levéltetűket vetés után négy héttel vittük a fiatal salátanövényekre.

2. Hibridizációk

Az első hibridizációban alkalmazott egyik szülő homozigóta volt *N. ribisnigri* rezisztenciára, és mezőgazdaságilag nem kívánatos tulajdonságokkal rendelkezett, azaz csökkent növekedést, csökkent zöld elszíneződést és/vagy a klorofill idő előtti degradációját mutatott generatív fázisban. A másik növény olyan növény volt, amely nem volt rezisztens *N. ribisnigri*re, és nem mutatta a fentebb leírt, mezőgazdaságilag nem kívánatos tulajdonságokat.

A hibridizációval kapott F₁-növények visszakeresztezhetők a rekurrens (*N. ribisnigr*re érzékeny) szülői növény-nyel (vagy másik *N. ribisnigr*re érzékeny növény-nyel), és/vagy F₂-generációig tenyészthetők önbeporzással. Az így kapott BC₁- (visszakeresztezett) vagy F₂-növények ehhez hasonlóan tenyészthetők a következő generációig önbeporzással, vagy újra felhasználhatók mint hibridizációs szülői növény. Olyan növények detektálása, amelyekben rekombinációs esemény ment végbe a rezisztenciát meghatározó Nr-gén lókuszához közel, hatékonyan elvégezhető ALFP-technikával vagy más, molekuláris markereket alkalmazó technikával az Nr-génre szegregált populációban. Ez lehet olyan populáció, amelyet heterozigóta növény önbeporzásával kaptunk (lásd a 2. példát), vagy olyan populáció, amelyet heterozigóta növény visszakeresztezésével kaptunk, előnyösen rezisztens szülői vonalból származó növény-nyel. Az *N. ribisnigr* rezisztencia és a CRA-fenotípus közötti rekombinációra való fenotípus-szelekciót hatékonyan elvégezhetjük Nr-génre szegregált populációból származó, beltenyésztett vonalak populációjával.

A „vonal” kifejezésen a leírásban magok vagy növények olyan csoportját értjük, melyet egyetlen növény önbeporzásával kaptunk.

A szelekciós hatékonyság növelését molekuláris markerek alkalmazásával érjük el, amelyben előszelekciót hajthatunk végre a markerekkel. A növénynek csak azon utódait teszteljük azt követően tovább rezisztenciára és CRA-fenotípus jelenlétére, amelyekben a markerek alkalmazásával

kimutattuk, hogy rekombinációs esemény ment végbe az Nr-lókusz szomszédságában.

A rezisztencia és a CRA-fenotípus közötti kapcsolat megszakadása található azokban a populációvonalakban (akár előszelektáltuk markerekkel, akár nem), melyeket úgy kaptunk, hogy vonalanként számos növényt (például 25) teszteltünk *N. ribisnigrí* rezisztenciára, és ugyanazon vagy különböző növényeket (például 25) teszteltünk CRA-fenotípusra. Ezen két teszt alapján az egyes vonalak tulajdonságaik alapján a következő csoportokba osztályozhatók:

Rezisztencia:

- a) egységesen rezisztens
- b) rezisztens és érzékeny növényekre szegregált
- c) egységesen érzékeny

CRA-fenotípus:

- a) egységesen CRA-fenotípus
- b) CRA-fenotípusú és normál fenotípusú növényekre szegregált
- c) egységesen normál fenotípus

Nr-génre homozigóta, nem CRA-fenotípussal rendelkező rekombináns növények találhatóak:

1) azokban a vonalakban, amelyek egységesen rezisztensek *N. ribisnigrí*re, és amelyhez tartozó növények nem mindegyike rendelkezik CRA-fenotípussal,

és

2) azokban a vonalakban, amelyek egységesen normál fenotípussal rendelkeznek, és amelyhez tartozó növények nem mindegyike érzékeny *N. ribisnigrí*re.

Az első esetben, a CRA-típussal nem rendelkező növényeket magtermelés céljára szelektáltuk. Ezen szelektált növények önbeporzásával kapott utódait újra teszteltük rezisztenciára és CRA-fenotípusra, és azokat a vonalakat tartottuk meg, amelyek egységesen rezisztensek voltak, és egységesen normál (nem CRA) fenotípussal rendelkeztek.

A második esetben rezisztens növényeket magtermelés céljára szelektáltuk. Ezen szelektált növények önbeporzásával kapott utódait újra teszteltük rezisztenciára és CRA-fenotípusra, és azokat a vonalakat tartottuk meg, amelyek egységesen rezisztensek voltak, és egységesen normál (nem CRA) fenotípussal rendelkeztek.

3. Szelekció AFLP-technikával

Egy kis darab levelet (például 50 mg-ot) gyűjtünk az egyes növényekről tesztelés céljára, és a DNS-t extraháljuk. AFLP-markerek és az Nr-gén közötti kapcsolat tanulmányozása céljából a mintát biztosító egyes növényeket is tesztelni kell *N. ribisnigri* rezisztenciára, a fentebb leírt eljárás szerint. AFLP vagy más, Nr-génhez kapcsolt molekuláris markerek detekcióját úgy végezhetjük, hogy a rezisztens egyedek vagy érzékeny növények marker-mintázatát összehasonlítjuk, vagy érzékeny és rezisztens növények csoportjaiból származó DNS-t összekeverünk (úgynevezett „egyesített készletek”) és összehasonlítjuk ezen egyesített készletek markermintázatát. Szegregált populációból származó egyedi növények markermintázata alapján az Nr-génhez kapcsolódó markerek markertérképbe rendelhetőek, a markerek egymás közötti, valamint a markerek és az Nr-gén közötti

genetikai távolságot indikálva. A markerek egymás közötti valamint a markerek és egy monogenikus tulajdonság közötti genetikai kapcsolat fokának detektálására szolgáló eljárás szakember számára standard módszer, és sok kézikönyvben le van írva. Ezen kapcsolatok vizsgálatára szolgáló számítógépes programok általában rendelkezésre állnak (például a „Joinmap”-program, melyet a CPRO-DLO forgalmaz, Wageningen).

Az Nr-lókuszhoz közel kapcsolódó marker-készlettel a növényekben, az Nr-lókuszt szomszédságában végbement egy vagy több rekombinációs esemény detektálható. Azokat a növényeket, amelyekben rekombinációs esemény végbement, az jellemzi, hogy az Nr-génhez kapcsolódó markerek egy részét a normál (nem CRA) fenotípussal rendelkező, érzékeny szülőből származó markerek helyettesítik.

Ezen project céljaira a markereket és a markerek meghatározását Keygene NV (Agro Business Park 90, Post box 216, 6700 AE, Wageningen) fejlesztette ki. Csak Keygene által kifejlesztett és szabadalmaztatott AFLP-technikát alkalmaztuk. Az AFLP-technikát részleteiben lásd P. Vos és munkatársai, „AFLP: a new technique for DNA fingerprinting”, Nucleic Acids Research 23 (21), 4407-4414 (1995).

Az AFLP-technikát jelenleg különböző cégek forgalmazzák, és átlagos tudású szakember számára rendelkezésre áll. Átlagos tudású szakember számára ma már rutin feladatot jelent egy génhez közel kapcsolódó markerek detektálása, amennyiben alkalmas növénypopulációk állnak rendelkezésre.

Átlagos tudású szakember számára nyilvánvaló, hogy restriktív enzimek és láncindító oligonukleotidok kiválasztásával sok különböző, egy bizonyos génhez kapcsolódó AFLP-markert elő lehet állítani, és ezen közel kapcsolódó, egy lokusz szomszédságában végbement meiotikus rekombináció detektálására szolgáló markerkészlet előállítására céljából nincs létfontosságú jelentősége annak, milyen típusú közel kapcsolódó markereket alkalmazunk erre a célra. A döntő tényező csak az alkalmazott markerek száma, plusz megoszlása abban a kromoszómafragmensben, amelyben a rekombinációt detektálni kívánjuk.

1. példa

Hagyományos hibridizáció

A találmány szerinti *L. sativa* L. növényeket az alábbi vázlat szerint állítottuk elő:

793202 x BC2 vonal (Calona x R18 donor)

↓

F1

↓

F2 x BC2 (Saladin RZ x R18 donor)

↓

F1 x Saladin RZ

↓

Saladin RZ x F1

↓

F1

↓

F2

↓

F3 x Saladin Quick RZ

↓

F1

↓

F2

↓

F3

↓

F4

↓

F5, többek között a 96.75906-vonal

Az IVT 793202-vonalból származó növényt, az Nr-gént tartalmazó vonalak közül az egyiket 1981-ben hozták nyilvánosságra a korábbi „Institute for Horticultural Plant Breeding” (IVT) intézetben (Wageningen), amelyet saját szelekciós vonalunkból származó fodros fejű salátatípushoz tartozó növényvel kereszteztünk, amely teljesen rezisztens volt *Bremia lactucae* által okozott hullámosodással járó („downy”) penészbetegségre [BC2 (Calona x R18 donor)]. A keresztezésből származó F1-magokat elvetettük és F2-ig szaporítottuk. Az F2-növényeket *N. ribisnigri* rezisztenciára és morfológiára teszteltük, és egy szelektált rezisztens F2-növényt kereszteztünk egy Saladin-típusú növényvel, amely teljesen rezisztens volt *B. lactucaera* [BC2(“Saladin RZ” x R18 donor)]. Ezen keresztezésből származó F1-növényeket vizsgáltuk *N. ribisnigri* rezisztenciára, és

visszakeresztettük egy „Saladin RZ” típusú növényvel. Ezen keresztezésből származó F1-növényeket *N. ribisnigri* rezisztenciára vizsgáltuk, és újra visszakeresztettük egy „Saladin RZ” típusú növényvel. A keresztezésből származó F1-magokat elvetettük és F2-ig szaporítottuk. Az F2-növényeket *N. ribisnigri* rezisztenciára és morfológiára teszteltük, és egy fodros fejű salátatípusra szelektált, rezisztens F2-növényt F3-vonalig szaporítottunk. Az F3-vonalakat újra rezisztenciára és fenotípusra teszteltük, és egy fodros fejű salátatípusra szelektált F3-növényt egy „Saladin Quick RZ” típusú növényvel kereszteztünk. Ebből a keresztezésből származó F1-generációt *N. ribisnigri* rezisztenciára vizsgáltunk, és F2-ig szaporítottunk. Ezen hibridizáció egyik F1-növényéből származó F2-, F3- és F4-generációk növényeit *N. ribisnigri* rezisztenciára és fenotípusra teszteltünk. Rezisztencia és a kívánt nem-CRA-fenotípus kombinációjával rendelkező, szelektált F2- és F3-növényeket minden esetben heterozigótának találtuk az Nr-génre. Azonban a keresztezés F4-generációjában, végül találtunk egy olyan vonalat, amely egységes volt normál fenotípusra (fodros fejű saláta), azaz nem mutatott CRA-tüneteket, és ezenkívül még szegregált *N. ribisnigri* rezisztenciára. Ezen F4-vonalhoz tartozó számos növényvel magot termeltettünk. Néhány ezen F4-növény utódját (többek között RZ 96.75906-vonal) nem találtuk már tovább szegregáltnak *N. ribisnigri* rezisztenciára, és ennél fogva az Nr-génre homozigóta jellegét mezőgazdaságilag értékes fenotípussal kombinálták, a CRA-tünetek hiányának következtében.

Meg kell jegyezni, hogy az itt leírt példa bemutatja a fejlesztés történetét, és a találmány szerinti növények származását. De semmiképpen sem mutatja be ezen hibridizációs sorozatokból származó, összes előállított generációt, hanem csak azokat a generációkat, amelyekhez a találmány szerinti növények egyenes leszármazottként tartoznak. A hibridizáció további ágait és a fenti szelekciós vázlatot megvizsgáltuk, azonban valamennyi a kívánt végeredmény nélkül, azaz anélkül zárult, hogy homozigóta, *N. ribisnigr*ire rezisztens, CRA-szimptómák nélküli növényeket találtunk volna.

2. példa

Rekombinánsok detektálása AFLP-markerekkel való előszelekció után

A találmány szerinti *L. sativa* *L.* növényeket állítottunk elő egyetlen hibridkeresztezésből („hycross”) kiindulva, (a korábbi „Institute for Horticultural Plant Breeding” intézetben nyilvánosságra hozott) *N. ribisnigr*ire rezisztens, IVT 793202-vonal és „Ultra BZ”, vajfejű salátavariánsához tartozó növény között. Ezen keresztezésből származó egyik F1-növényből magot termeltettünk. Ezen keresztezésből származó F2-magokat elvetettünk, és számos növényből F3-magot termeltettünk.

Ebből a keresztezésből származó F3-vonal 140 növénye szegregált rezisztenciára (az Nr-génre heterozigóta, egyik F2-növényből származott), amelyeket azután rezisztenciára teszteltünk. A tesztelt növények közül 95 rezisztens volt,

32 érzékeny, míg 3 növény esetén nem volt világos a rezisztencia. Nem egyértelműen rezisztens F3-növények levélanyagát begyűjtöttük DNS-analízis céljából. Az Nr-génhez kapcsolódó AFLP-markerek detektálásának kiinduló pontja első megközelítésben 5 rezisztens salátavonalból (IVT 793202 rezisztens donor-vonalat tartalmazta), 3 érzékeny vonalból (Ultra RZ-t tartalmazta), *N. ribisnigris*re érzékeny változatok DNS-ének 2 keverékéből ("egyesített adagok") és az IVT 793202 és Ultra RZ közötti hibridizációból származó F3-vonal 44 egyedéből származó DNS-tesztkészlet volt. Ebben az előzetes vizsgálatban egy kodomináns AFLP-markert azonosítottunk, amely teljesen a rezisztenciagénhez kapcsolódott 44 növényből álló készletben. Ezzel a kodomináns markerrel homozigóta és heterozigóta rezisztens növényeket lehetett megkülönböztetni.

A fentebb említett kodomináns AFLP-markerral azután az IVT 793202 és az Ultra RZ közötti hibridizációból származó valamennyi 121 F3-növényt megvizsgáltuk. Így differenciálni lehetett az F3-növényeket 35 homozigóta rezisztensre, 60 heterozigóta rezisztensre és 26 érzékenyre. A homozigóta rezisztens növények és a homozigóta érzékeny növények DNS-ét külön-külön egyesítettük. Ebből a "rezisztens" és "érzékeny" egyesített adagból 96 AFLP fingerprintet végeztünk. Ezzel körülbelül 4300 AFLP-csíkot állítottunk elő, amelyből 110 az Nr-génhez kapcsolódott és 25 az érzékeny allélhoz ennél a lókusznál. Ebből 19 AFLP-markert választottunk ki az Nr-gén szomszédságában végbement rekombináció szkrínelésére. Ebből a 19 markerből 14 a rezisztenciát meg-

határozó Nr-génhez kapcsolódott, és 5 az "érzékeny" allélhoz.

A fentebb említett kodomináns AFLP-markerrel végzett teszt alapján két F3-növényt azonosítottunk, amelyek heterozigóták voltak Nr-génre. Ezen növényekből vett F4-magokat elvetettük, F4-vonalanként 800 növényt. A növényekből származó levélanyag-mintát vettünk, és DNS-t izoláltunk. A végző, összesen 1575 F4-növényből származó DNS-t alkalmaztuk markerrekombináció szkrinelésére 19 kiválasztott AFLP-markerrel. Az első meghatározás eredménye az volt, hogy 206 növény esetén kaptunk markerrekombinációt. Ezt a 206 növényt újra teszteltük a 19 AFLP-markerre. Ez az eredmény végül megerősítette azt, hogy rekombinációs esemény következett be az Nr-lókusz szomszédságában 162 növény esetén.

Az 1575, mintát biztosító növény F5-magját tenyésztettük. Az AFLP-analízis alapján marker-rekombinánssként azonosított 162 növény közül 89-ből magokat fogtunk. Az így kapott 89 F5-vonalat *N. ribisnigri* rezisztenciára és fenotípusra teszteltük. Ezekben a tesztekben egy vonal esetén (94.85338) azt találtuk, hogy már nem szegregált tovább a rezisztenciára (és ennél fogva homozigóta módon rezisztens az Nr-génre), de még CRA-fenotípusra szegregált volt. A 94.85338. számú magból származó 50 növényt újra analizáltunk számos AFLP-markerrel. Az Nr-génhez kapcsolódó, 22 AFLP-markerrel végzett analízis után, ezek közül származó egyik növény esetén azt találtuk, hogy homozigóta rekombináns a 22 markerből 12-re. F6-magot (95.85051-vonal) fogtunk ebből a növényből. Ezt a vonalat újra teszteltük

fenotípusra és rezisztenciára, és ebből a vonalból származó valamennyi növény ismét rezisztensnek találtuk *N. ribisnigríre* és ebből a vonalból származó valamennyi növény normál, azaz nem-CRA-fenotípussal rendelkezett.

F7-magot termeltettünk a 95.85051-vonalból származó 11 növényből. Ez eredményezte többek között a 96.851-23. számú magot, melyet deponáltunk.

3. példa

A rezisztenciagén lokalizálása AFLP-vizsgálatok segítségével

RZ 96.85123 és RZ 96.75906 jelű, két rekombináns vonalat és néhány kontrollvonalat teszteltünk 21 AFLP-markerre, amelyek korábbi AFLP-kísérletek szerint rezisztenciaallélhoz (cisz-markerek) kapcsolódnak. A markereket "IVT 793202 x Ultra" keresztezésen fejlesztettük ki. A különböző markerek legvalószínűbb szekvenciája a salátagenomban előző kutatásokból szintén ismeretes volt. A következő genotípusokat teszteltük:

1. IVT 793202 (közrebocsátott vonal, *Nasonovia*-rezisztens + CSV)

2. Ultra (*Nasonovia*-érzékeny BOTERSLARAS, nincs CSV)

3. Saladin (*Nasonovia*-érzékeny jéghegy-salátavariáns, nincs CSV)

4. RZ 96.85123 (2. példa szerinti, rekombináns *Nasonovia*-rezisztens vonal, CSV nincs)

5. RZ 96.75906 (1. példa szerinti, rekombináns *Nasonovia*-rezisztens vonal, CSV nincs)

A marker-eredményeket az alábbi táblázatban mutatjuk be:

1. táblázat

5 salátavonal AFLP-markereredményei a rezisztenciaallélhoz (cisz-markerek) kapcsolt 21 AFLP-markerrel tesztelve, ha a genom legvalószínűbb közvetítő szekvenciájában jelen van.

	Cisz-marker ¹																				
Vonal/ variáns	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1
IVT793202	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ultra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saladin	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
96.85123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
96.75906	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-

¹+: marker jelen van - : marker nincs jelen

Az 1. táblázatból következik, hogy három cisz-marker (3., 7. és 15. számú) pozitív jelet adott a "Saladin" jég-hegy-salátavariánsban is, és így nem polimorf ezen *Nasonovia*-érzékeny variánsok és az IVT 793202 *L. virosa* introgressziós terület között. A többi markerrel kapott jelekből az következik, hogy a 96.85123 és 96.75906 rekombináns vonalak megfelelnek az introgressziós terület bal részének. Mindkét vonalban rekombináció történt a 12. és 13. marker között: a 13. markertől balra mindkét vonalból hiányoznak a cisz-markerek. Ennél fogva nagyon valószí-

nű, hogy a CSV-t kódoló gén vagy gének a 13. markertől balra helyezkedik el az *L. virosa* introgressziós fragmenszen. A 96.75906 vonal abban különbözik a többi rekombináns vonaltól, hogy a 96.75906 szintén a jobb oldalra szeparálódik: a 15. és 16. markerek között rekombináció történt a 96.75906-vonalból hiányoznak a císz-markerek a 15. markertől jobbra. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a *Nasonovia*-rezisztenciagén valahol a 12. és 16. számú marker között helyezkedik el.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Keresztesvirágúak (*Compositae*) családjához tartozó növény, amely *Nasonovia ribisnigri* levéltetűre rezisztens a genomban lévő Nr-rezisztenciagén következtében, és amely növény genomjából a CRA-fenotípusért felelős genetikai információ legalább olyan mértékben hiányzik, hogy a CRA-fenotípus nem expresszálódik.

2. Az 1. igénypont szerinti növény, amely az Nr-rezisztenciagént homozigóta módon tartalmazza.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti növény, amely *Lactuca* nemzetséghez tartozó salátanövény, előnyösen *L. sativa* L.

4. A 1., 2. vagy 3. igénypont szerinti növény, amely a következő eljárás szerint előállítható:

- i) Nr-rezisztenciára heterozigóta szülői növényt szelektálunk,
- ii) szegregált populációt állítunk elő,
- iii) előállítjuk a szegregált populáció lényegében minden egyes növényének utódját,
- iv) teszteljük az utódokat rezisztenciára és CRA-fenotípusra,
- v) alkalmas utódnövényeket szelektálunk, amelyek vagy rezisztensek, vagy nem rendelkeznek CRA-fenotípussal,
- vi) ezekből a növényekből önbeporzással magokat termeltetünk, és utódokat nevelünk a magokból egy leszármazási vonal előállítása céljából,
- vii) a vonalat teszteljük rezisztenciára és CRA-fenotípusra, és olyan leszármazási vonalakat szelektálunk, amelyek egységesen rezisztensek és amelyek egységesen nem-CRA-fenotípussal rendelkeznek.

5. A 4. igénypont szerinti növény, melynek esetén a szegregált populáció a szülői növény önbeporzásával, a szülői növény rezisztens növénnyel való keresztezésével, vagy kettős haploid technika alkalmazásával állítható elő.

6. A 4. vagy 5. igénypont szerinti növény, melynek esetén az v)-lépésben előállítható alkalmas utódnövényekre jellemző, hogy vagy egységesen rezisztensek *N. ribisnigri*re és nem

mindegyikük rendelkezik CRA-fenotípussal, vagy egységesen nem rendelkeznek CRA-fenotípussal és nem mindegyikük érzékeny *N. ribisnigrice*.

7. A 4. vagy 5. igénypont szerinti növény, melynek esetén az v)-lépésben előállítható alkalmas utódnövényekre jellemző, hogy egyaránt egységesen rezisztensek *N. ribisnigrice*, és egységesen nem rendelkeznek CRA-fenotípussal, és amely esetben az vi)- és vii)-lépés elmarad.

8. A 4-7. igénypontok bármelyike szerinti növény, amely a iv)-lépésben szabad szemmel látható CRA-fenotípus hiányára alapuló teszteléssel állítható elő.

9. A 4-8. igénypontok bármelyike szerinti növény, amely a iii)-lépés előtt azon növények molekuláris biológiai technikák alkalmazásával végzett előszelekciójával állítható elő, amelyekben rekombinációs esemény történt a rezisztenciáért felelős genetikai információ és a CRA-fenotípusért felelős genetikai információ között.

10. A 9. igénypont szerinti növény, amely molekuláris biológiai technikaként AFLP-technika alkalmazásával állítható elő.

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti növény utóda, amely generatív vagy vegetatív módon állítható elő.

12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti növény részei vagy származékai, amelyek szaporításra alkalmasak, például levelek, szárak, gyökerek, sarjak és hasonlók, protoplasztok, szomatikus embriók, portokok, levélnyelek, tenyészetben lévő sejtek, magok és hasonlók.

13. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti növény részei vagy származékai, amelyek fogyasztásra alkalmasak, például fejek vagy levelek.

14. Eljárás az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti növény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 4-10. igénypontok bármelyike szerinti lépéseket tartalmazó eljárást hajtunk végre.

31
1
32 oldal



A meghatalmazott:

DANUBIA

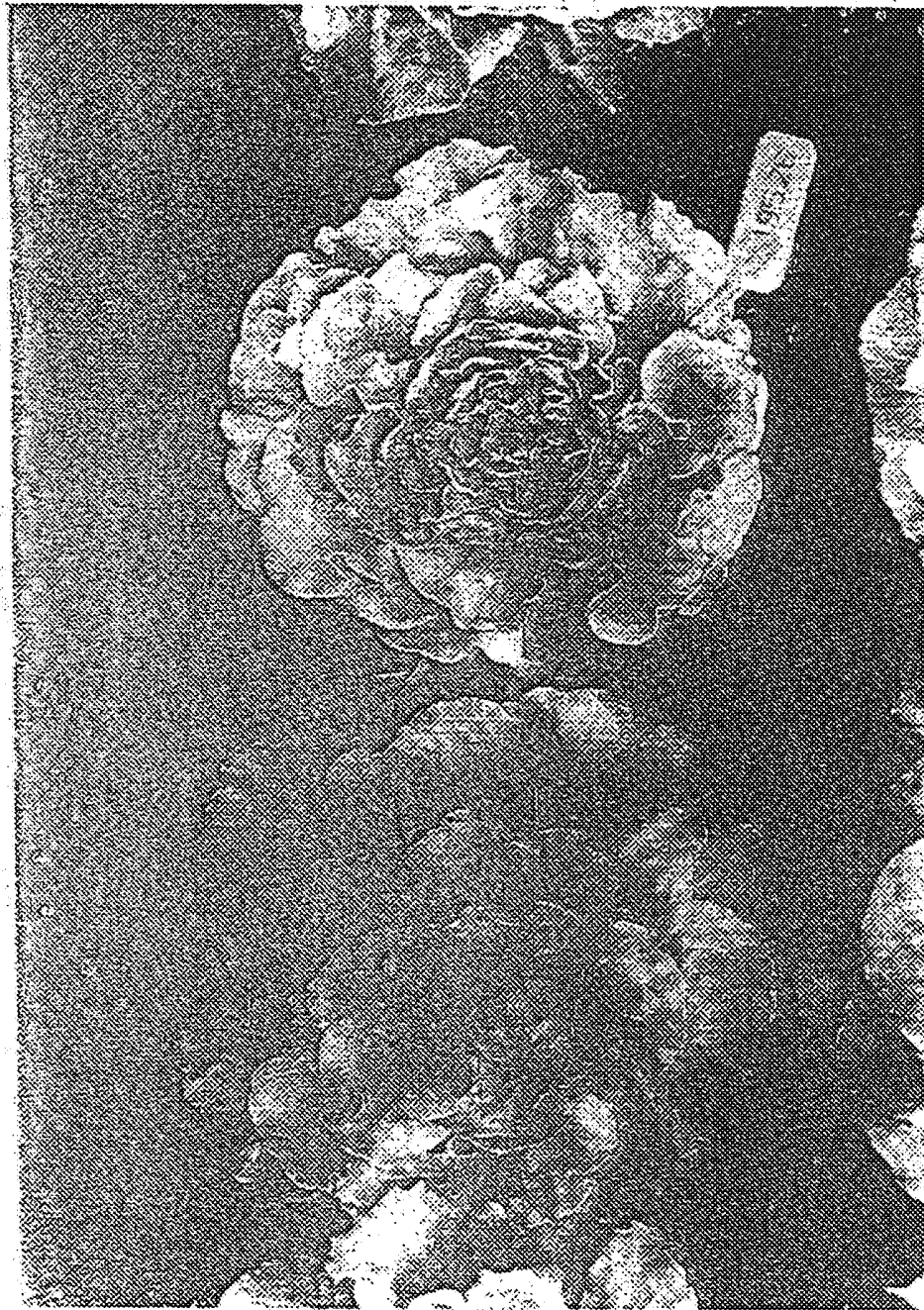
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

dr. Pethő Árpád
szabadalmi ügyvivő

9000 2/64

MEGADÁS ALAPJÁUL
SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT

B1



1. ábra