

19



Bureau voor de
Industriële Eigendom
Nederland

11 1011819

12 C OCTROOI²⁰

21 Aanvraag om octrooi: 1011819

51 Int.Cl.⁷
C12Q1/68, C12N15/11, A01H1/04

22 Ingediend: 16.04.1999

41 Ingeschreven:
17.10.2000

47 Dagtekening:
17.10.2000

45 Uitgegeven:
01.12.2000 I.E. 2000/12

73 Octrooihouder(s):
Enza Zaden, De Enkhuizer Zaadhandel B.V. te
Enkhuizen.

72 Uitvinder(s):
Johannes Jacobus Maria Lambalk te
Middenbeemster
Jacqueline Nieuwenhuis te Oostzaan
Petrus Cornelis Johannes Conijn te
Noordbeemster
Cornelis Jacob de Jong te Enkhuizen
Arie Bastiaan Bruijnis te Hoorn
Ijke Arendtje de Witte te Enkhuizen
Nanne Machiel Faber te Hoorn

74 Gemachtigde:
Ir. B.J. 't Jong c.s. te 2517 GK Den Haag.

54 Werkwijze voor het verkrijgen van een plant met een duurzame resistentie tegen een pathogeen.

57 De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het identificeren van een plant, in het bijzonder een cultuurslaplant (*L. sativa*) met twee of meer resistentiegenen tegen een pathogeen, in het bijzonder *Bremia Lactucae*, omvattende het identificeren van specifieke, aan de resistentiegenen gekoppelde DNA-merkers, en het met behulp van deze DNA-merkers vaststellen van de aanwezigheid van twee of meer resistentiegenen in de plant. De uitvinding heeft verder betrekking op een werkwijze voor het verkrijgen van een plant, in het bijzonder een cultuurslaplant (*L. sativa*), met een duurzame resistentie tegen een pathogeen, in het bijzonder *Bremia Lactucae*, omvattende het kruisen van een eerste plant, welke ten minste een of meer resistentiegenen omvat, met een tweede plant, welke ten minste een of meer resistentiegenen omvat, en het uit de nakomelingen selecteren van een plant waarin ten minste twee of meer resistentiegenen aanwezig zijn met behulp van de eerder genoemde werkwijze.

NL C 1011819

De inhoud van dit octrooi komt overeen met de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekeningen.

Werkwijze voor het verkrijgen van een plant met een duurzame resistentie tegen een pathogeen

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het identificeren van een plant met twee of meer resistentiegenen tegen een pathogeen. De uitvinding heeft verder betrekking op een werkwijze voor
5 het verkrijgen van een plant met een duurzame resistentie tegen een pathogeen. De uitvinding betreft tevens een plant waarin twee of meer resistentiegenen tegen het pathogeen aanwezig zijn, alsmede zaden en nakomelingen van deze plant, en nakomelingen daarvan.

10 In het bijzonder heeft de uitvinding betrekking op een werkwijze voor het identificeren van een cultuurslaplant (Lactuca sativa) met twee of meer resistentiegenen tegen Bremia lactucae Regel. De uitvinding heeft verder in het bijzonder betrekking op een werkwijze voor
15 het verkrijgen van een cultuurslaplant (L. sativa) met een duurzame resistentie tegen Bremia lactucae. De uitvinding betreft tevens een DNA-merker welke specifieke gekoppeld is aan een resistentiegenen tegen Bremia lactucae. De uitvinding heeft verder betrekking op een cul-
20 tuurslaplant (L. sativa) waarin twee of meer Dm-resistentiegenen aanwezig zijn, alsmede zaden en nakomelingen van deze plant, en nakomelingen daarvan.

De ziekte die wordt veroorzaakt door de schimmel Bremia lactucae Regel staat bekend als valse meeldauw. Valse meeldauw komt wereldwijd voor en vormt een
25 groot probleem voor zowel de opbrengst als de kwaliteit van cultuursla.

De schimmel kan de slaplant in elk groeistadium infecteren. De eerste symptomen van valse meeldauw be-
30 staan uit het verschijnen van chlorotische gele plekken op het bladoppervlak. Vervolgens wordt binnen 24 tot 48 uur een witte katoen-achtige schimmelgroei zichtbaar op het onderste bladoppervlak als aanwijzing voor sporevorming. Gedurende de infectie worden de lesies steeds

groter en meer chlorotisch, totdat de bladeren volledig bruin worden.

Bremia lactucae behoort tot de zogeheten Oömyceten, een klasse van relatief primitieve schimmels. 5 Andere bekende schimmels uit deze groep zijn bijvoorbeeld Phytium en Phytophthora. De schimmel B. lactucae bevat verschillende fysiologische species (fysio's) en is gastheerspecifiek. Bremia lactucae staat bekend als een zeer variabel pathogeen. Nieuwe fysio's ontstaan relatief 10 frequent door mutatie van de avirulentiegenen tijdens de sporevorming voorafgaand aan de voortplanting van B. lactucae.

Binnen het geslacht Lactucae, waartoe de cultuursla (Lactuca sativa) behoort, bestaan verschillende 15 soorten die resistent zijn tegen Bremia lactucae Regel. De resistentie berust in de meeste gevallen op kwalitatieve genen, bekend als Dm-resistentiegenen (Dm= Downey mildew). Het resistentiemechanisme staat bekend als een gen-om-gen werkingsprincipe, gebaseerd op de specifieke 20 interactie tussen producten van het Dm-resistentiegen en het pathogeen-specifieke avirulentiegen, hetgeen resulteert in resistentie van de slaplant (Michelmore et al., Plant Pathology 33, 301-315, 1984). Dit resistentiemechanisme is ook aangetoond voor diverse andere resistentie- 25 genen in verschillende andere plantensoorten (Michelmore et al., Genome Research, 8, 1113-1130, 1998).

Er zijn reeds een groot aantal Dm-resistentiegenen geïdentificeerd, die resistentie tegen specifieke fysio's van Bremia lactucae Regel kunnen bewerkstelligen. 30 Uit genetisch onderzoek is gebleken dat deze Dm-resistentiegenen vaak geclusterd in groepen op het zelfde chromosoom voorkomen. Er zijn vier van dergelijke koppelingsgroepen op verschillende chromosomen in het genoom van sla aangetoond die verschillende Dm-resistentiegenen 35 bevatten (Farrara et al., Plant Pathology 36, 499-514, 1987). Nieuw geïdentificeerde Dm-genen kunnen vaak worden ingedeeld in één van de bekende resistentie-koppelingsgroepen.

Recentelijk zijn echter nieuwe Bremia lactucae fysio's geïdentificeerd die de resistentie als gevolg van de bekende Dm-resistentiegenen in de huidige cultuurslarassen "doorbreken". Dit houdt in dat er Bremia lactucae fysio's zijn ontstaan waarvoor geen resistentie in huidige cultuurslarassen aanwezig is. Resistentiegenen zijn dan soms nog wel te vinden in gedateerde slacultivars, maar vooral in aan cultuursla verwante wilde Lactucae-soorten, zoals bijvoorbeeld L. virosa en L. serriola.

10 Een aantal breed spectrum Dm-resistentiegenen zijn geïdentificeerd met een resistentie tegen alle geteste Bremia fysio's.

Dm-resistentiegenen uit gedateerde slacultivars of uit wilde slasoorten kunnen worden ingekruist in cultuursla om opnieuw resistentie te verkrijgen. Ingekruiste Dm-resistentiegenen worden op conventionele wijze door middel van een kunstmatige Bremia lactucae ziekte-toets aangetoond. Hiertoe wordt een aantal bladponsen (doorsnede 18-20 mm) of zaailingen van de slaplant geïnoculeerd met verschillende fysio's van B. lactucae. Vervolgens wordt na 10 tot 14 dagen de mate van ontwikkeling en sporulatie op de ponsen/zaailingen bekeken. Aan de hand hiervan kan een uitspraak worden gedaan of een geteste slaplant of veredelingslijn resistent of vatbaar is voor de geteste B. lactucae fysio's.

15
20
25

Wanneer bekend is dat twee of meer nieuwe Dm-resistentiegenen in verschillende koppelingsgroepen voorkomen kunnen deze resistentiegenen door inkruising worden samengebracht ('gestapeld') in een cultuurslaplant, waardoor de kans op het doorbreken van de resistentie wordt verkleind. Het stapelen van meerdere kwalitatieve breed spectrum Dm-resistentiegenen uit verschillende koppelingsgroepen kan echter niet met de conventionele Bremia lactucae ziekte-toets worden uitgevoerd, omdat, wanneer één kwalitatief Dm-resistentiegen aanwezig is, reeds algehele resistentie wordt waargenomen in de ziekte-toets en de mogelijke aanwezigheid van een tweede breed spectrum Dm-resistentiegen dus niet zal worden

30
35

waargenomen. Het is dus niet mogelijk juist die planten te selecteren waarin twee of meer kwalitatieve breed spectrum Dm-resistentiegenen aanwezig zijn, om zo planten te verkrijgen met een duurzame resistentie tegen B.

5 lactucae.

Het is dus gewenst dat er een werkwijze wordt ontwikkeld waarmee na inkruising van kwalitatieve resistentiegenen in een plant, die planten kunnen worden geïdentificeerd en geselecteerd waarin twee of meer resistentiegenen, aanwezig zijn.

Het algemene doel van de onderhavige uitvinding is derhalve het verschaffen van een werkwijze voor het identificeren van een plant met twee of meer resistentiegenen tegen een pathogeen, ter verkrijging van een plant met een duurzame resistentie tegen het betreffende pathogeen. Een bijzonder doel van de onderhavige uitvinding is het verschaffen van een werkwijze voor het identificeren van een cultuurslaplant (L.sativa) met twee of meer Dm-resistentiegenen, ter verkrijging van een cultuurslaplant met een duurzame resistentie tegen B. lactucaae.

Hiertoe verschaft de uitvinding een werkwijze voor het identificeren van een plant met twee of meer resistentiegenen tegen een pathogeen, omvattende het identificeren van specifieke, aan de resistentiegenen gekoppelde DNA-merkers en het met behulp van deze DNA-merkers vaststellen van de aanwezigheid van twee of meer resistentiegenen in de plant.

De uitvinding verschaft verder een werkwijze voor het verkrijgen van een plant met een duurzame resistentie tegen een pathogeen, omvattende het kruisen van een eerste plant, welke ten minste een of meer resistentiegenen omvat, met een tweede plant, welke ten minste een of meer resistentiegenen omvat, en het uit de nakomelingen selecteren van een plant waarin twee of meer resistentiegenen aanwezig zijn met behulp van de hiervoor genoemde werkwijze.

In het bijzonder verschaft de onderhavige uitvinding een werkwijze voor het identificeren van een

cultuurslaplant (L. sativa) met twee of meer Dm-resistentiegenen tegen Bremia lactucae, omvattende het identificeren van specifieke, aan de Dm-resistentiegenen gekoppelde DNA-merkers, en het met behulp van de DNA-merkers
5 aantonen van de aanwezigheid van twee of meer Dm-resistentiegenen in de cultuurslaplant.

Verder verschaft de uitvinding in het bijzonder een werkwijze voor het verkrijgen van een cultuurslaplant (L. sativa) met een duurzame resistentie tegen B. Lactu-
10 cae, omvattende het kruisen van een cultuurslaplant, welke ten minste een of meer Dm-resistentiegenen omvat, met een andere cultuurslaplant, of een wilde slaplant, welke ten minste een of meer Dm-resistentiegenen omvat, en het uit de nakomelingen daarvan selecteren van een
15 cultuurslaplant met twee of meer Dm-resistentiegenen met behulp van de hiervoor genoemde werkwijze.

Met de werkwijze volgens de uitvinding kunnen op eenvoudige wijze planten, in het bijzonder cultuurslaplant, worden geselecteerd waarin twee of meer resis-
20 tentiegenen, in het bijzonder twee of meer Dm-resistentiegenen, aanwezig zijn ter verkrijging van een plant met een duurzame resistentie tegen een pathogeen, in het bijzonder Bremia lactucae. Het selecteren van planten waarin twee of meer kwalitatieve resistentiegenen aanwe-
25 zig zijn kan alleen bewerkstelligd worden met behulp van moleculaire DNA-merkers die de specifieke genen kunnen aantonen in het genoom van de slaplant. Met de conventionele ziekte-toetsen is het niet mogelijk de aanwezigheid van twee of meer kwalitatieve resistentiegenen in een
30 cultuurslaplant aan te tonen. De werkwijzen volgens de uitvinding kunnen tevens gebruikt worden voor kwantitatieve resistentiegenen.

Om een plant met twee of meer resistentiegenen te kunnen identificeren en selecteren wordt gebruik
35 gemaakt van specifieke, aan de resistentiegenen gekoppelde moleculaire DNA-merkers. Hiervoor kan gebruikt worden gemaakt van verschillende DNA-merkers zoals bijvoorbeeld RAPD (random amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified

fragment length polymorphism), SCAR (sequence characterized amplified region) etc. De specifieke, aan de resistentiegenen gekoppelde DNA-merkers worden ontwikkeld volgens op zich bekende technieken (Paran et al., Genome 5 34, 1021-1027, 1991; Paran et al., TAG 85, 985-993, 1993). De toepassing van dergelijke DNA-merkers om verschillende resistentiegenen te stapelen in een plant, in het bijzonder om verschillende breed spectrum Dm-resistentiegenen bij elkaar te brengen in een slaplant (L. sativa), ter verkrijging van een plant, in het bijzonder 10 een cultuurslaplant (L. sativa), met een duurzame resistentie tegen een pathogeen, in het bijzonder Bremia lactucae, is echter nog niet eerder beschreven.

Volgens de onderhavige uitvinding zijn voor 15 vier Dm-resistentiegenen, in het bijzonder kwalitatieve breed spectrum Dm-resistentiegenen uit de Lactuca familie DNA-merkers gevonden. Met behulp van deze DNA-merkers is vastgesteld dat de vier Dm-resistentiegenen in afzonderlijke koppelingsgroepen zijn gelegen, waardoor stapeling 20 van de Dm-resistentiegenen in cultuursla (L. sativa) mogelijk is.

Er zijn verschillende methoden om aan te tonen of verschillende resistentiegenen in dezelfde of in 25 verschillende koppelingsgroepen aanwezig zijn. De positie van de DNA-merkers kan worden bepaald door het genereren van een zogeheten genetische kaart of door het bestuderen van de afhankelijke, respectievelijk onafhankelijke uitsplitsing van de verschillende DNA-merkers ten opzichte van elkaar. In de onderhavige uitvinding werd door het 30 bestuderen van de uitsplitsing van de DNA-merkers vastgesteld dat de specifieke, aan de Dm-resistentiegenen gekoppelde DNA-merkers onafhankelijk van elkaar uitsplitsen en dus in vier verschillende koppelingsgroepen liggen.

35 In het onderzoek dat heeft geleid tot de onderhavige uitvinding werden uit een populatie van planten die uitsplitsen voor B. lactucae-resistentie de vatbare en resistente individuen voor hetzelfde B. lactucae

fenotype onderzocht met commercieel verkrijgbare RAPD-primers (OPA-01 t/m OPAN-20, Operon Technologies, Alameda, USA; UBC 1 t/m 800, University of British Columbia, Vancouver, Canada). RAPD-analyse is een op zich bekende
 5 techniek (Williams et al., Nucleic Acids Research, 18, 6531-6535, 1990), gebaseerd op het gebruik van primers met een willekeurige sequentie om willekeurig segmenten van het genomisch DNA te amplificeren. Tussen de amplificatieproducten kunnen vervolgens op een agarose gel
 10 polymorfismen worden aangetoond, welke kunnen worden gebruikt als genetische merkers.

Voor het onderzoek werden 800 primers (Operon technologies) gebruikt. Het DNA van de planten werd gemengd met de primers in een geschikt amplificatiemengsel en vervolgens geamplificeerd. De amplificatieproducten werden op een agarosegel geanalyseerd op de aanwezigheid van geschikte DNA-merkers.

De in de RAPD-analyse gevonden 'kandidaat' moleculaire DNA-merkers werden getest op de individuen
 20 van de splitsende populatie, waarna kon worden vastgesteld welke van deze DNA-merkers op geschikte wijze fysiek gekoppeld waren aan de verschillende onderzochte kwalitatieve Dm-resistentiegenen. Op deze wijze werden de volgende DNA-merkers geïdentificeerd: DNA-merker A (pri-
 25 mer OPAF06, 451 bp); DNA-merker B (primer OPAM10, 555 bp); DNA-merker C (primer OPW16, 750 bp); en merker D (primer OPW04, 520 bp) (figuur 2). Van de DNA-merkers A en B werd vervolgens de sequentie bepaald welke zijn weergegeven in figuur 1.

30 De gevonden DNA-merkers werden vervolgens gebruikt voor het selecteren van een cultuurslaplant met twee of meer Dm-resistentiegenen, na inkruising van de resistentiegenen uit wilde slasoorten, zoals bijvoorbeeld Lactuca virosa en L. serriola. Het in cultuurslarassen
 35 inkruisen van twee of meer resistentiegenen, in het bijzonder kwalitatieve breed spectrum Dm-resistentiegenen, uit wilde slasoorten, zoals L. virosa, is nog niet eerder beschreven.

Indien kruising van twee slaplanten niet lukt via de normale methoden kan voor het inkruisen van de Dm-resistentiegenen in een cultuurslaplant gebruik worden gemaakt van bekende celbiologische technieken zoals
 5 embryo redding (Maisonneuve, Agronomie 7, 313-319, 1987) of protoplastenfusie (Maisonneuve et al., Euphytica 85, 281-285, 1995). In de onderhavige uitvinding werden de verschillende Dm-resistentiegenen ingekruist zoals beschreven in Voorbeeld 2.

10 Introductie van een nieuw breed spectrum Dm-resistentiegenen in een van de vier bekende koppelingsgroepen kan als gevolg van recombinatieprocessen resulteren in uitkruising van reeds in de koppelingsgroep aanwezige Dm-resistentiegenen, of andere resistentie- of vanuit
 15 tuinbouwkunding oogpunt waardevolle genen. Om dit te voorkomen worden nieuwe kwalitatieve resistentiegenen met een breed spectrum Dm-resistentie bij voorkeur geïntrogressieerd in elk van de afzonderlijke koppelingsgroepen.

De werkwijze volgens de uitvinding wordt bij
 20 voorkeur gebruikt voor het stapelen van kwalitatieve breed spectrum Dm-resistentiegenen in cultuursla (L. sativa). Hieronder vallen ook bijvoorbeeld kropsla-variëteiten (L. sativa Lineaus capitata), zoals ijsbergsla, bataviasla en botersla, pluksla-variëteiten (L. sativa
 25 Lineaus acephala), zoals krulsla en stengelsla, bindsla (L. sativa Lineaus romana), snijsla (L. sativa Lineaus secalina) en aspergesla (L. sativa Lineaus angustana).

De werkwijzen volgens de uitvinding voor het identificeren van een plant met twee of meer resistentie-
 30 genen tegen een pathogeen, voor het verkrijgen van een plant met een duurzame resistentie tegen het betreffende pathogeen, zoals beschreven voor cultuursla, kunnen op analoge wijze worden gebruikt voor andere cultuurgewassen, of andere planten, en andere pathogenen. Als niet
 35 beperkende voorbeelden worden bijvoorbeeld genoemd het verkrijgen van een duurzame resistentie tegen bepaalde nematoden, zoals Meloidogyne javanica, M. arenaria, en M. incognita, of tegen Oidium lycopersici in tomaat, en het

verkrijgen van een duurzame potyvirusresistentie in paprika door inkruising van twee of meer pvr-resistentiegenen (pvr=potyvirus resistance).

De onderhavige uitvinding verschaft verder DNA-
5 merkers, welke specifiek gekoppeld zijn aan een Dm-resistentiegenen, en welke een DNA-fragment omvatten met een sequentie die ten minste 70%, bij voorkeur ten minste 80%, meer bij voorkeur ten minste 90%, en meest bij voorkeur ten minste 95% homoloog is aan één van de se-
10 quenties zoals getoond in figuur 1.

De uitvinding heeft verder betrekking op een plant, waarin twee of meer resistentiegenen tegen een pathogeen aanwezig zijn, in het algemeen, en in het bijzonder op een cultuurslaplant (L. sativa), waarin twee of
15 meer Dm-resistentiegenen aanwezig zijn, alsmede op de zaden en nakomelingen van de plant, in het bijzonder de cultuurslaplant, of de nakomelingen daarvan.

Met een duurzame resistentie wordt in de onderhavige uitvinding dus bedoeld dat in een plant ten minste
20 twee of meer resistentiegenen tegen een pathogeen, bijvoorbeeld twee of meer breed spectrum Dm-resistentiegenen tegen B. lactucae, aanwezig zijn. Een pathogeen kan elk organisme zijn dat in staat is ziekte te veroorzaken in planten, zoals bijvoorbeeld schimmels, virussen, nematoden, bacteriën, (zuig)insecten etc.

Een Dm-resistentiegenen volgens de onderhavige uitvinding is bij voorkeur een kwalitatief, breed spectrum Dm-resistentiegenen tegen de schimmel Bremia lactucae.

De uitvinding wordt meer in detail beschreven
30 aan de hand van de volgende, niet beperkende, voorbeelden en figuren.

Figuur 1 toont de sequenties van de DNA-merkers A (fig. 1A) en B (fig. 1B) volgens de uitvinding.

Figuur 2 toont de vier DNA-merkers die zijn
35 gebruikt in de onderhavige uitvinding in 24 geteste F2-individuen. Merker A werd geïdentificeerd met primer OPAF06 (451 bp); merker B werd geïdentificeerd met behulp van primer OPAM10 (555 bp), merker C met behulp van

primer OPW16 (750 bp) en merker D met primer OPW04 (520 bp).

5 VOORBEELDEN

VOORBEELD 1:

Merkeranalyse in sla F2 populaties welke splitsen voor een Bremia lactucae Regel resistentiegen

10

De gebruikte technieken om snel en gericht moleculaire DNA-merkers te identificeren die nauw gekoppeld zijn met resistentiegenen tegen B.lactucae zijn op zich bekend (Paran et al., Genome 34, 1021-1027, 1991; 15 Paran et al., TAG 85, 985-993, 1993; Williams et al., Nucleic Acids Research, 18, 6531-6535, 1990), en kunnen op analoge wijze worden gebruikt voor identificatie van DNA-merkers in andere gewassen.

Vanuit een populatie (zie kruisingsschema, 20 voorbeeld 2) van meer dan 300 planten die uitsplitsten voor B.lactucae-resistentie werden de vatbare en resistente individuen voor hetzelfde B.lactucae fenotype separaat gepoold (per pool 5 planten). Deze pools werden onderzocht met behulp van commercieel verkregen RAPD- 25 primers (Operon Technologies, Alameda USA, OPA-01 t/m OPAN-20). Het PCR mengsel (25 µl) bestond uit DNA (25 ng), RAPD primer (5 pmol), dNTP's (0.2 mM), MgCl₂ (2 mM), Taq DNA polymerase (0.5 U) in PCR-buffer. Dit mengsel werd geamplificeerd in 30 cycli (30'' 92°, 1'36°, 1' 30 72°).

Na het vaststellen van kandidaat moleculaire DNA merkers met behulp van de RAPD-analyse op de DNA-pools werden deze DNA-merkers gecontroleerd op individuen van de splitsende populatie waarna kon worden vastgesteld 35 welke van de DNA-merkers het best fysiek gekoppeld waren met het onderzochte kwalitatieve Dm-resistentiegen met een breed spectrum resistentie tegen B. lactucae.

Voor elk van de 4 onderzochte genen met een breed spectrum Dm-resistentie zijn de 4 best gekoppelde moleculaire DNA-merkers (A-D) weergegeven in figuur 1. Merker A werd geïdentificeerd met primer OPAF06 (451 bp); 5 merker B werd geïdentificeerd met behulp van primer OPAM10 (555 bp), merker C met behulp van primer OPW16 (750 bp) en merker D met primer OPW04 (520 bp).

VOORBEELD 2

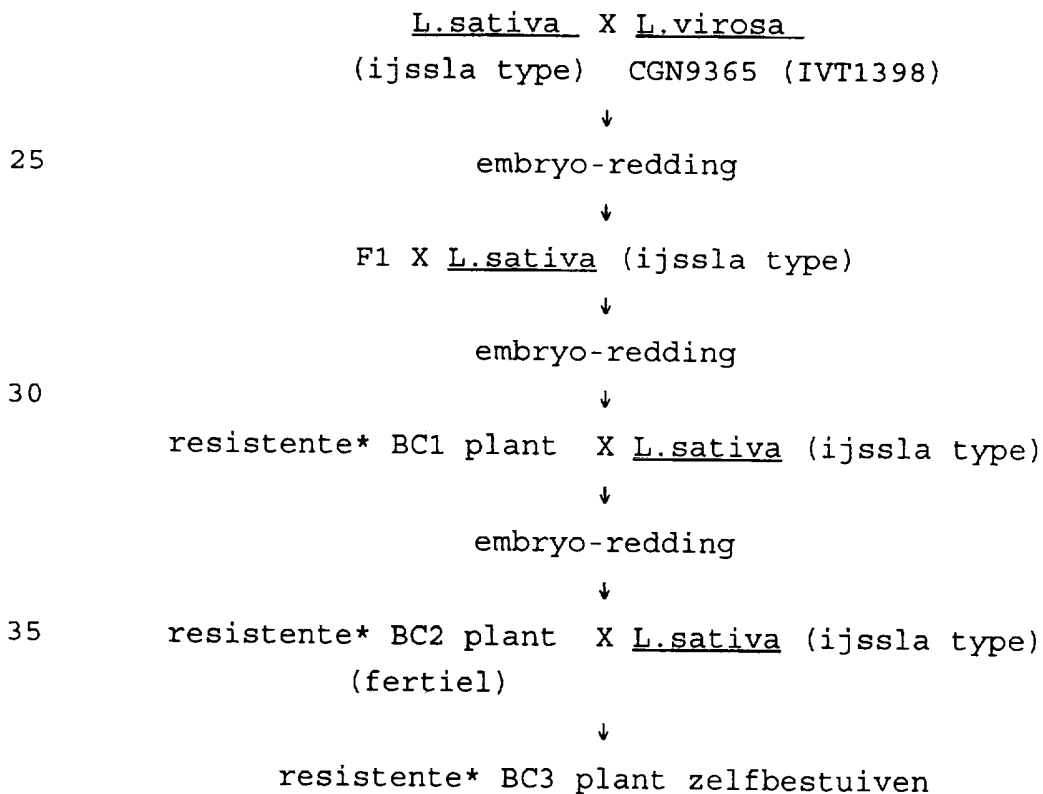
10 Kruisingsschema's

In dit voorbeeld worden de kruisingsschema's voor de vier verschillende populaties weergegeven. Hierin worden de volgende symbolen/tekens gebruikt:

- 15 * = resistente plant, hiermee wordt bedoeld: resistentie tegen alle geteste B.lactucae fysio's.
 BC = "Back Crossing" ofwel terugkruising.
 Z = Zelfbestuiving, het aantal cijfers achter Z geeft aan hoeveel maal er zelfbestoven is.

20

Populatie A, L.virosa CGN9365, (IVT1398) (merker A):



De BC3Z-populatie werd vervolgens getoetst en merker A geïdentificeerd. Individuele BC3Z planten werden zelfbestoven en uit de BC3Z2-populaties werden de voor gen A homozygote individuele BC3Z2-planten geselecteerd. De geselecteerde plant werd gebruikt voor koppelingsanalyse van de diverse geïdentificeerde DNA-merkers (Voorbeeld 3).

Populatie B, L.virosa CGN4683, (IVT280) (merker B):

10 L.sativa (kropsla type) X L.virosa CGN4683 (IVT280)

↓

embryo-redding

↓

F1 X L.sativa (kropsla type)

15

↓

embryo-redding

↓

resistente* BC1 plant X L.sativa (kropsla type)
(fertiel)

20

↓

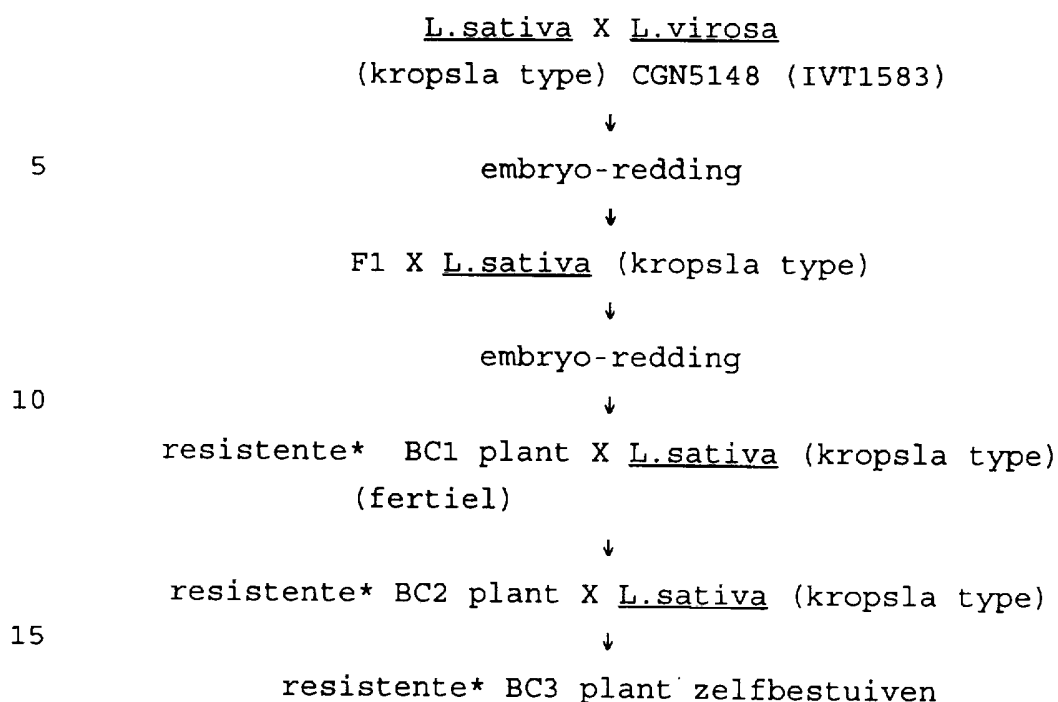
resistente* BC2 plant X L.sativa (kropsla type)

↓

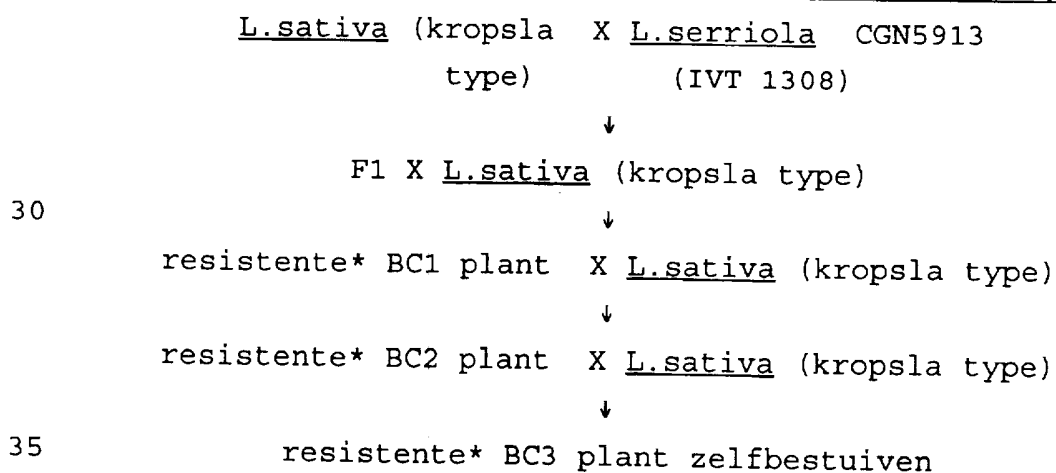
resistente* BC3 plant zelfbestuiven

25 De BC3Z-populatie werd getoetst en merker B geïdentificeerd. Individuele BC3Z planten werden zelfbestoven en uit de verkregen BC3Z2-populaties werden de voor gen B homozygote individuele BC3Z2-planten geselecteerd en gebruikt voor koppelingsanalyse van de diverse geïdentificeerde DNA-merkers (Voorbeeld 3).

30

Populatie C, L.virosa CGN5148 (IVT1538) (merker C):

De BC3Z-populatie werd getoetst en merker C geïdentificeerd. De individuele BC3Z planten werden zelfbestoven en uit de BC3Z2-populaties werden de voor gen C homozygote individuele BC3Z2-planten geselecteerd en gebruikt voor koppelingsanalyse van de diverse geïdentificeerde DNA-merkers (Voorbeeld 3).

25 Populatie D, L.serriola CGN5913 (IVT 1308) (merker D):

De BC3Z-populatie werd getoetst en merker D geïdentificeerd. De individuele BC3Z planten werden zelfbestoven en uit de BC3Z2-populaties werden voor gen D homozygote individuele BC3Z2-planten geselecteerd en
 5 gebruikt voor koppelingsanalyse van de diverse geïdentificeerde DNA-merkers (Voorbeeld 3).

VOORBEELD 3

Koppelingsanalyse van de geïdentificeerde DNA-merkers

10

Er bestaan meerdere methoden om aan te tonen of de diverse kwalitatieve resistentiegenen in dezelfde of in verschillende koppelingsgroepen (chromosomen) gepositioneerd kunnen worden.

15

A. Genetische kaart:

Het bepalen van de positie van DNA-merkers kan worden uitgevoerd door een genetische kaart te genereren van de 9 chromosomen van sla. Voor het genereren van een
 20 genetische kaart waarop de positie van de diverse moleculaire DNA-merkers is aangegeven worden kruisingen gemaakt tussen slaplanten die vanuit genetisch oogpunt hoog polymorf ten opzichte van elkaar zijn. Voor dit type kruisingen met een hoge polymorfismegraad kan onderscheid
 25 worden gemaakt tussen:

- intraspecifieke kruising:

Dit is een kruising tussen bijvoorbeeld kropsla en ijs-sla, er wordt een kruising binnen een soort (L.sativa) gemaakt.

30 - interspecifieke kruising:

Dit is een kruising tussen twee Lactuca soorten, bijvoorbeeld kropsla (L.sativa) met L.virosa.

Van beide type kruisingen wordt een F2 of BC1 populatie gegenereerd. Door deze F2 of BC1 populatie te
 35 analyseren met bijvoorbeeld RAPD-merkers kunnen alle planten individueel worden geanalyseerd op de aan- of afwezigheid van de polymorfe moleculaire DNA-merkers.

Door de verkregen data te analyseren m.b.v. een computer-programma als bijvoorbeeld JoinMap (Stam, Plant Journal 3, 739-744, 1993) kunnen koppelingsgroepen worden geconstrueerd die de diverse geteste DNA-merkers lineair ten opzichte van elkaar plaatsen, gescheiden door specifieke afstanden aangeduid in centiMorgans. Indien een breed-spectrum Dm-resistentiegen in de gebruikte F2 of BC1 populatie uitsplitst kan na toetsen met B.lactucaae het breed-spectrum Dm-resistentiegen worden geplaatst binnen een van de koppelingsgroepen weergegeven op een gedetailleerde genetische kaart van sla. Een genetische slakaart met 9 koppelingsgroepen is door Michelmore (Genetics 116, 331-337, 1987) beschreven.

Wanneer de geïdentificeerde moleculaire DNA merkers volgens de onderhavige uitvinding polymorf zijn in de ouders die gebruikt zijn voor het maken van een F2 of BC1 populatie kunnen deze DNA-merkers geplaatst worden op de genetische kaart, waardoor kan worden vastgesteld of de DNA-merkers uit dezelfde dan wel uit verschillende koppelingsgroepen afkomstig zijn.

B. Testkruisingen:

Een andere werkwijze voor het vaststellen van de positie van de aan de resistentiegenen gekoppelde DNA-merkers, zoals in de onderhavige uitvinding toegepast bestaat uit het bestuderen van de afhankelijke of onafhankelijke uitsplitsing van de verschillende DNA-merkers. Hiertoe werden uit de vier populaties individuele planten geselecteerd die homozygoot zijn voor de specifieke breed-spectrum Dm-resistentiegenen uit respectievelijk populatie A, B, C of D. Vervolgens werden specifieke kruisingen gemaakt voor de generatie van een splitsende F2-populatie waarin alle Dm-resistentiegenen en hun corresponderende DNA-merkers aanwezig waren.

35

Selectie van plant met gen A en B:

Een plant, homozygoot voor Dm-resistentiegen A (zoals aangetoond met merker A), werd gekruist met een

voor Dm-resistentiegen B (merker B) homozygote plant. De individuele F1 plant met zowel Dm-resistentiegen A als B (na analyse met de DNA-merkers A en B), evenals de individuele planten van de F2 populatie werden vervolgens
 5 zelfbestoven. Uit de F3 populaties werd geselecteerd op planten die zowel homozygoot waren voor Dm-resistentiegen A als voor Dm-resistentiegen B, met behulp van de voor Dm-resistentiegen A en B specifieke DNA-merkers.

Het kunnen selecteren van een plant met de
 10 kwalitatieve Dm-resistentiegenen A en B met elk een breed spectrum Dm-resistentie betekent dat beide resistentiegenen in verschillende koppelingsgroepen gelocaliseerd zijn.

15 Selectie van een plant met beide genen C en D:

Een plant, homozygoot voor Dm-resistentiegen C (zoals aangetoond met merker C), werd gekruist met een voor Dm-resistentiegen D (merker D) homozygote plant. De individuele F1 plant met zowel Dm-resistentiegen C als D
 20 (na analyse met de DNA-merkers C en D), evenals de individuele planten van de F2 populatie werden vervolgens zelfbestoven. Uit de F3 populaties werd geselecteerd op planten die zowel homozygoot waren voor Dm-resistentiegen C als voor Dm-resistentiegen D, met behulp van de voor de
 25 Dm-resistentiegenen C en D specifieke DNA-merkers.

Het kunnen selecteren van een plant met de kwalitatieve Dm-resistentiegenen C en D met elk een breed spectrum Dm-resistentie betekent dat beide resistentiegenen in verschillende koppelingsgroepen gelocaliseerd
 30 zijn.

VOORBEELD 4

Koppelingsanalyse voor de 4 genen uit de 4 verschillende populaties:

35

De voor Dm-resistentiegenen A en B homozygote geselecteerde plant werd vervolgens gekruist met de voor Dm-resistentiegenen C en D homozygote geselecteerde

plant. De voor de Dm-resistentiegenen A, B, C en D heterozygote F1 planten (zoals vastgesteld met de voor die genen specifieke DNA-merkers) werden zelfbestoven.

De F2 populatie werd getoetst in de B.lactucae ziektetoets en geanalyseerd met de DNA-merkers voor de 4 breed spectrum Dm-resistentiegenen.

Voor de ziektetoets werden van te toetsen slapplanten drie tot zes bladponsen met een doorsnede van 18 tot 20 mm genomen met een kurkboor, of werden 50 zaadjes uitgelegd op een filtreerpapiertje. De ponsen of filtreerpapiertjes met slazaad werden in een bak op nat dik filtreerpapier gelegd en tot het moment van inoculeren afgedekt met een glasplaat. De ponsen werden geïnoculeerd op dezelfde dag of enkele dagen na het ponsen. De zaadjes werden gekiemd en verder opgekweekt in een klimaatcel van 12-16°C met 16 uur licht en 8 uur donker totdat de kiemlobben gestrekt zijn waarna inoculatie plaatsvindt.

Het B.lactucae inoculum werd bereid door een bepaald fysio van B.lactucae, (vers of ingevroren) welke sporuleert op bladmateriaal, in een kleine afgemeten hoeveelheid water aan te brengen, te roeren en deze oplossing te zeven. Daarna werd de concentratie van levende sporen bepaald door middel van fluorescentiemicroscopie en indien nodig aangepast. De optimale sporeconcentratie is 10.000 - 50.000 virulente sporen/ml water

Het inoculum werd op de ponsen of zaailingen aangebracht met een plantensspuit totdat de ponsen licht vochtig zijn. Daarna werd de bak weer afgedekt met een glasplaat en weggezet bij 12-16°C en 16 uur licht 8 uur donker. Na 10 tot 14 dagen waren de ponsen te beoordelen op de mate van ontwikkeling en sporulatie en kon een uitspraak worden gedaan of een geteste plant of slanummer resistent of vatbaar is voor het geteste B.lactucae fysio.

De DNA-merker-analyse werd uitgevoerd zoals beschreven in Voorbeeld 1.

Van de gemaakte F2 populatie zijn in figuur 2 (tabel 1) 24 planten weergegeven welke zijn getest in de B.lactucae ziekte toets en zijn geanalyseerd met de vier RAPD-merkers. Uit deze test bleken de vier RAPD-merkers 5 onafhankelijk van elkaar uit te splitsen en derhalve te positioneren zijn in vier verschillende koppelingsgroepen.

Tabel 1: RAPD-merkers afkomstig uit verschillende koppelingsgroepen (chromosomen).

F2 plantno.	Ziekte toets	Merker A	Merker B	Merker C	Merker D	planten met alle merkers (*)
1	R	+	+	-	+	
2	R	-	+	-	-	
3	R	-	-	+	+	
4	R	+	+	+	+	*
5	R	+	-	+	+	
6	R	+	+	+	-	
7	R	+	+	-	-	
8	R	+	+	+	+	*
9	R	+	-	+	+	
10	R	+	+	+	+	
11	R	+	+	-	+	
12	R	+	+	+	-	
13	R	+	+	-	+	
14	R	+	+	-	+	
15	R	+	-	+	-	
16	R	+	+	+	+	*
17	R	+	-	+	-	
18	R	+	+	+	+	*
19	R	-	-	-	+	
20	R	+	-	+	+	
21	R	-	-	+	+	
22	R	+	-	+	-	
23	R	+	+	+	+	*
24	R	+	+	+	+	*

R = resistent

Merker A = OPAF06/451bp

Merker B = OPAM10/555bp

Merker C = OPW16/750bp

Merker D = OPW04/520bp

Conclusie:

Uit figuur 2 (tabel 1) blijkt dat de vier DNA-merkers onafhankelijk van elkaar uitsplitsen en dus te positioneren zijn in de vier afzonderlijke koppelings-
5 groepen. Hierdoor kunnen planten worden geselecteerd die ten minste 2, bij voorkeur 3, en meest bij voorkeur 4 kwalitatieve resistentiegenen (aangegeven met: * in bovenstaande tabel 1) met een breed spectrum Dm-resistentie bezitten en dus waardevol zijn om verder te bewer-
10 ken tot een commercieel slaras.

Alleen toepassing van de DNA-merkers volgens de uitvinding maakt een dergelijke selectie mogelijk omdat in de B.lactucae ziekte-toets geen onderscheid kan worden gemaakt tussen de aanwezigheid van één of meer kwalita-
15 tieve breed spectrum Dm-resistentiegenen.

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het identificeren van een plant met twee of meer resistentiegenen tegen een patho-
5 geen, omvattende het identificeren van specifieke, aan de resistentiegenen gekoppelde DNA-merkers, en het met behulp van deze DNA-merkers vaststellen van de aanwezigheid van twee of meer resistentiegenen in de plant.

2. Werkwijze voor het verkrijgen van een plant
10 met een duurzame resistentie tegen een pathogeen, omvattende het kruisen van een eerste plant, welke ten minste een of meer resistentiegenen omvat, met een tweede plant, welke ten minste een of meer resistentiegenen omvat, en het uit de nakomelingen selecteren van een plant waarin
15 ten minste twee of meer resistentiegenen aanwezig zijn met behulp van de werkwijze volgens conclusie 1.

3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2 **met het kenmerk dat** de resistentiegenen kwalitatieve resistentiegenen zijn.

20 4. Werkwijze volgens conclusie 1,2 of 3 **met het kenmerk dat** de resistentiegenen in verschillende koppelingsgroepen gelegen zijn.

5. Werkwijze voor het identificeren van een cultuurslaplant (L. sativa) met twee of meer Dm-resistentiegenen tegen Bremia lactucae, omvattende het identifi-
25 ceren van specifieke, aan de Dm-resistentiegenen gekoppelde DNA-merkers, en het met behulp van deze DNA-merkers vaststellen van de aanwezigheid van twee of meer Dm-resistentiegenen in de cultuurslaplant.

30 6. Werkwijze voor het verkrijgen van een cultuurslaplant (L. sativa) met een duurzame resistentie tegen Bremia lactucae, omvattende het kruisen van een cultuurslaplant, welke ten minste een of meer Dm-resistentiegenen omvat, met een andere cultuurslaplant, of een
35 wilde slaplant, welke ten minste een of meer Dm-resistentiegenen omvat, en het uit de nakomelingen daarvan selecteren van een cultuurslaplant met twee of meer Dm-resis-

tentiegene met behulp van de werkwijze volgens conclusie 4.

7. Werkwijze volgens conclusie 5 of 6 **met het kenmerk dat de Dm-resistentiegene kwalitatieve Dm-resistentiegene zijn.**

8. Werkwijze volgens conclusie 5, 6 of 7 **met het kenmerk dat de Dm-resistentiegene breed spectrum Dm-resistentiegene zijn.**

9. Werkwijze volgens één van de conclusies 5-8 **met het kenmerk dat de Dm-resistentiegene in verschillende koppelingsgroepen gelegen zijn.**

10. Werkwijze volgens één van de conclusies 6-9 **met het kenmerk dat de wilde slaplant bijvoorbeeld L. serriola, of L. virosa is.**

11. Werkwijze volgens één van de conclusies 5-10 **met het kenmerk dat de wilde slaplant bij voorkeur L. virosa is.**

12. Werkwijze volgens één van de conclusies 5-11 **met het kenmerk dat de cultuurslaplant wordt gekozen uit kropsla (L. sativa Lineaus capitata), zoals ijsbergs-la, bataviasla en botersla; pluksla (L. sativa Lineaus acephala), zoals krulsla en stengelsla; bindsla (L. sativa Lineaus romana); snijsla (L. sativa Lineaus secalina) en aspergesla (L. sativa Lineaus angustana).**

13. DNA-merker omvattende een sequentie welke ten minste 70%, bij voorkeur ten minste 80%, meer bij voorkeur ten minste 90% en meest bij voorkeur ten minste 95% homoloog is aan de sequentie zoals getoond in figuur 1A.

14. DNA-merker omvattende een sequentie welke ten minste 70%, bij voorkeur ten minste 80%, meer bij voorkeur ten minste 90% en meest bij voorkeur ten minste 95% homoloog is aan de sequentie zoals getoond in figuur 1B.

15. Plant omvattende twee of meer resistentiegene tegen een pathogeen **met het kenmerk dat de plant is verkregen met behulp van een werkwijze volgens één van de conclusies 1-4.**

16. Plant volgens conclusie 15 **met het kenmerk dat** de resistentiegenen kwalitatieve resistentiegenen zijn.

17. Plant volgens conclusie 15 of 16 **met het kenmerk dat** de resistentiegenen in verschillende koppelingsgroepen gelegen zijn.

18. Zaden van een plant volgens één van de conclusies 15-17.

19. Nakomelingen van een plant volgens één van de conclusies 15-17, of nakomelingen daarvan.

20. Cultuurslaplant (L. sativa) omvattende twee of meer Dm-resistentiegenen **met het kenmerk dat** de cultuurslaplant is verkregen met behulp van een werkwijze volgens één van de conclusies 5-12.

21. Cultuurslaplant volgens conclusie 20 **met het kenmerk dat** de Dm-resistentiegenen kwalitatieve Dm-resistentiegenen zijn.

22. Cultuurslaplant volgens conclusie 20 of 21 **met het kenmerk dat** de Dm-resistentiegenen breed spectrum Dm-resistentiegenen zijn.

23. Cultuurslaplant volgens één van de conclusie 20, 21 of 22 **met het kenmerk dat** de Dm-resistentiegenen in verschillende koppelingsgroepen gelegen zijn.

24. Cultuurslaplant volgens één van de conclusies 20-23 **met het kenmerk dat** de cultuurslaplant wordt gekozen uit kropsla (L. sativa Lineaus capitata), zoals ijsbergsla, bataviasla en botersla; pluksla (L. sativa Lineaus acephala), zoals krulsla en stengelsla; bindsla (L. sativa Lineaus romana); snijsla (L. sativa Lineaus secalina) en aspergesla (L. sativa Lineaus angustana).

25. Zaden van een cultuurslaplant volgens één van de conclusies 20-24.

26. Nakomelingen van een cultuurslaplant volgens één van de conclusies 20-24, of nakomelingen daarvan.

A Sequentie merker A

CCGCAGTCTGAGTTGAGCAATCGATGGATAGTTGAGTCGTTACTTTTTGT
GGCAAGAGTTGCATTGTTCCCGTTCCTGGGAAAAGCGAAGTAACTATCGA
AATTCGGTTTTCAAAGTTTGGAGGTAGGCTCCGTAGGGTAGCATTGATGG
TGACCCTTTTCATCAGAGTATTTGGGCAGTTTGTATGCTGTAAGGTATTT
TCTTTTACCATGGAGTCATTGGTGGAGGATGAGATGGAAGAGATCCATGA
AGGTGCCTTTTGGAGGATGGCATGCATTTAGCAGCGGTTTCAGGTAGTAAG
AGGAATATATCAGGGCGGTGGCCCTCATAGTTAGGATTGTGCATCGGTTA
TGAGAGTGAGACCTTGTGTCTTGATGATGATTCCTGTTGGGAGGCGGG
TCGATGAATCAAAGACGAGGGGTGTGATAGTGTATTATTTCCAGACTGCG
G

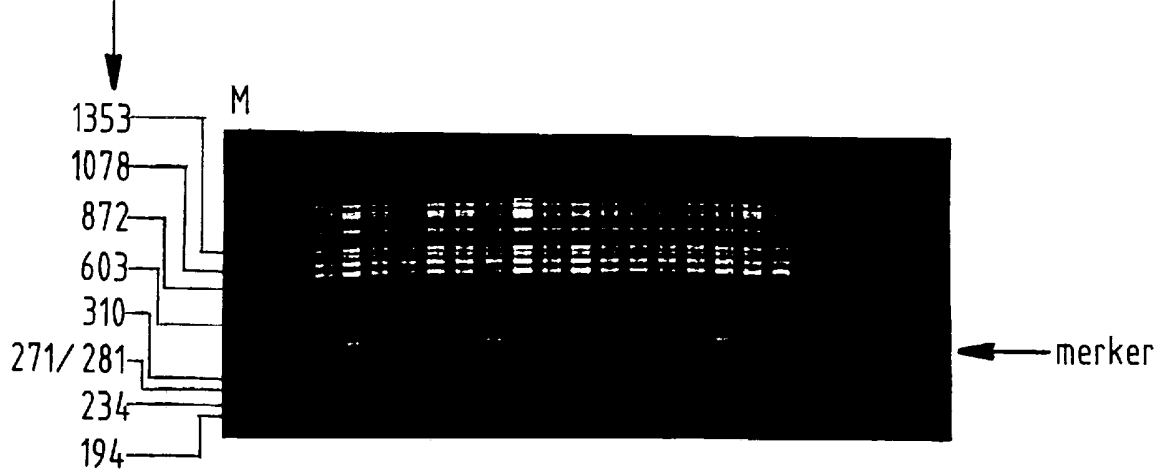
B Sequentie merker B

CAGACCGACCCAACCCTTTCGACTTCCGATTTCTAACGGTTCTTTTTATA
AAACATTCCTAAATTACCATACTAACAAAATAACATTTCCATTTATCTTA
AGCCCCTTAACTTTTGTTTTTTTACTTTAACCTGCCTTTTTTCTTTTTAA
TTTTTATTACAAATTTAGTCTAAACTTATTTTTTTTACAACTTTCTTTTT
ATATAATTTCTAAAATTTAGGCTTTTAAAAAAATTTATTTTGTTACAATT
TTATAAAATTTGATTTTTTTACAAATATTCTTTTAATTTTGTTTTTATATTT
TCTTTTCTTAGATTTTTCTGATTTTATAAATTATTTTTTTAATTAGTT
TTCTATATTCTACAAAATTTATTTTTTACATAATTTTTTTTTCAAATTGT
TTTTAAAAAACTAATATTCTTTAGAAAATTTATTTTTTACAAAGAGTTATAT
ATTTGGTTTTTATGCATGTATTTTTAAAAAAATTTCCCGCATTTAAATAAATA
TTATTCTTTAAAATTTATTTACTATTTTTTATATATTCATTTACATGGTCG
GTCTG

FIG. 1

Merker A

bp - ladder (M)



Merker B

bp - ladder (M)

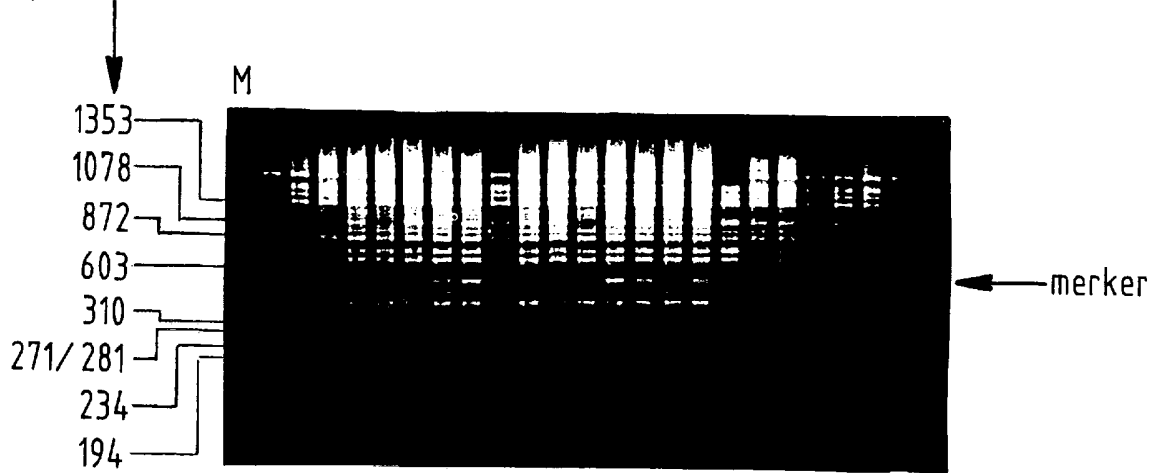
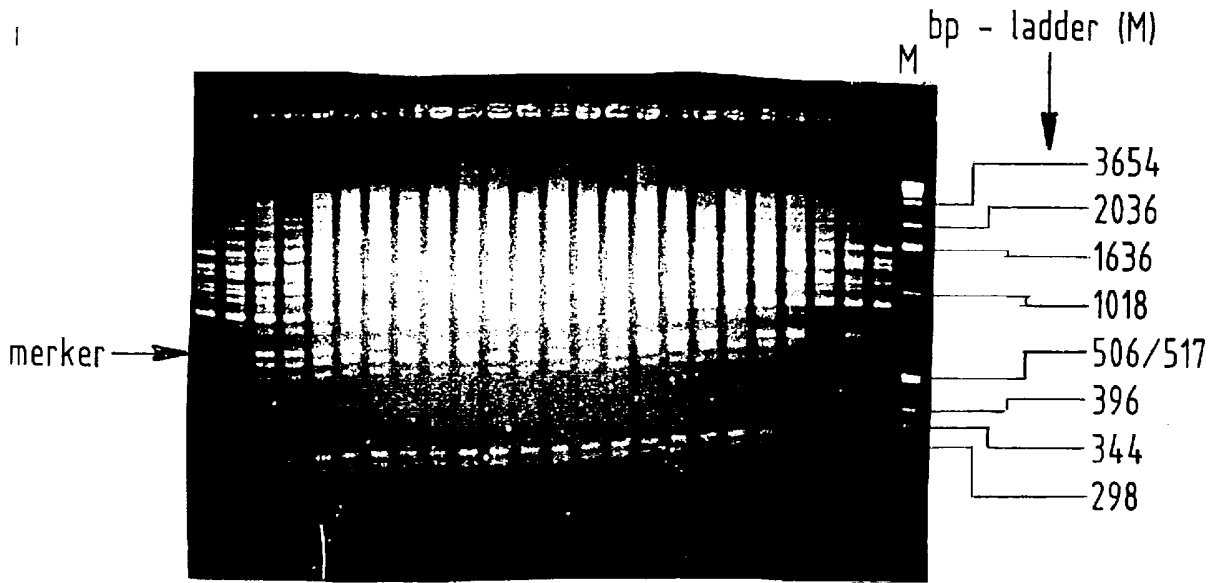


FIG. 2

101 18 19

Merker C



Merker D



FIG. 2 (vervolg)

SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)
RAPPORT BETREFFENDE
NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFIKATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE	Kenmerk van de aanvrager of van de gemachtigde 4/amn/cst/5
Nederlandse aanvraag nr. 1011819	Indieningsdatum 16 april 1999
	Ingeroepen voorrangsdatum
Aanvrager (Naam) Enza Zaden, De Enkhuizer Zaadhandel B.V.	
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type	Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek (ISA) aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. SN 33032 NL
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)	
Volgens de Internationale classificatie (IPC) Int.cl. ⁶ : C 12 Q 1/68, C 12 N 15/11, A 01 H 5/00, A 01 H 5/10, A 01 H 1/04	
II. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK	
Onderzochte minimum documentatie	
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen
Int.cl. ⁶ :	C 12 Q, C 12 N, A 01 H
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen	
III. <input type="checkbox"/> GEEN ONDERZOEK MOGELIJK VOOR BEPAALDE CONCLUSIES (opmerkingen op aanvullingsblad)	
IV. <input type="checkbox"/> GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING (opmerkingen op aanvullingsblad)	

**VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE**

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek
NL 1011819

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
IPC 6 C12Q1/68 C12N15/11 A01H5/00 A01H5/10 A01H1/04

Volgens de Internationale Classificatie van octrooien (IPC) of zowel volgens de nationale classificatie als volgens de IPC.

B. ONDERZOCHE TE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)
IPC 6 C12Q C12N A01H

Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor dergelijke documenten, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

Tijdens het internationaal nieuwheidsonderzoek geraadpleegde elektronische gegevensbestanden (naam van de gegevensbestanden en, waar uitvoerbaar, gebruikte trefwoorden)

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie *	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	<p>PARAN I ET AL: "IDENTIFICATION OF RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM AND RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA MARKERS LINKED TO DOWNY MILDEW RESISTANCE GENES IN LETTUCE, USING NEAR-ISOGENIC LINES" GENOME, deel 34, nr. 6, 1991, bladzijden 1021-1027, XP002913463 ISSN: 0831-2796 in de aanvraag genoemd het gehele document</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-12, 15-24

Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.

Leden van dezelfde octrooifamilie zijn vermeld in een bijlage

* Speciale categorieën van aangehaalde documenten

"A" document dat de algemene stand van de techniek weergeeft, maar niet beschouwd wordt als zijnde van bijzonder belang

"E" eerder document, maar gepubliceerd op de datum van indiening of daarna

"L" document dat het beroep op een recht van voorrang aan twijfel onderhevig maakt of dat aangehaald wordt om de publikatiedatum van een andere aanhaling vast te stellen of om een andere reden zoals aangegeven

"O" document dat betrekking heeft op een mondelinge uiteenzetting, een gebruik, een tentoonstelling of een ander middel

"P" document gepubliceerd voor de datum van indiening maar na de ingeroepen datum van voorrang

"T" later document, gepubliceerd na de datum van indiening of datum van voorrang en niet in strijd met de aanvraag, maar aangehaald ter verduidelijking van het principe of de theorie die aan de uitvinding ten grondslag ligt

"X" document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet als nieuw worden beschouwd of kan niet worden beschouwd op inventiviteit te berusten

"Y" document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet worden beschouwd als inventief wanneer het document beschouwd wordt in combinatie met één of meerdere soortgelijke documenten, en deze combinatie voor een deskundige voor de hand ligt

"&" document dat deel uitmaakt van dezelfde octrooifamilie

Datum waarop het nieuwheidsonderzoek van internationaal type werd voltooid

17 September 1999

Verzenddatum van het rapport van het nieuwheidsonderzoek van internationaal type

Naam en adres van de instantie

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

De bevoegde ambtenaar

Müller, F

C.(Vervolg) VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN		
Categorie	Gecteerd documenten, eventueel metaanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	<p>PARAN I ET AL: "DEVELOPMENT OF RELIABLE PCR-BASED MARKERS LINKED TO DOWNY MILDEW RESISTANCE GENES IN LETTUCE" THEORY OF APPLIED GENETICS, deel 85, nr. 8, 1993, bladzijden 985-993, XP002913459 fig. 2 en material & methods ---</p>	1-12, 15-24
X	<p>MICHELMORE R.W. ET AL.,: "Molecular markers and genome analysis in the manipulation of lettuce downy mildew" CURR. PLANT. SCI. BIOTECHNOL. AGRIC., deel 14, - 1993 bladzijden 517-523, XP002115627 het gehele document ---</p>	1-12, 15-24
X	<p>KESSELL R. ET AL.,: "Recessive resistance to plasmopara lactucae-radicis maps by bulked segregant analysis to a cluster of dominant disease resistance gens in lettuce" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, deel 6, nr. 6, - 1993 bladzijden 722-728, XP002115628 het gehele document, in het bijzonder p. 724, col.3, par.1; p.725, 2.col. par.3 ff. ---</p>	1-12, 15-24
A	<p>FARRARA B F ET AL: "IDENTIFICATION OF NEW SOURCES OF RESISTANCE TO DOWNY MILDEW IN LACTUCA SPP" HORTSCIENCE, deel 22, nr. 4, 1 Augustus 1987 (1987-08-01), bladzijden 647-649, XP000749877 ISSN: 0018-5345 het gehele document -----</p>	