

19



Octrooi Centrum
Nederland

11

2000992

12 C OCTROOI²⁰

21

Aanvraagnummer: 2000992

51

Int.Cl.:

A01H5/00 (2006.01)

C12Q1/68 (2006.01)

22

Ingediend: 09.11.2007

41

Ingeschreven:

12.05.2009

47

Verleend:

12.05.2009

45

Uitgegeven:

01.07.2009

73

Octrooihouder(s):

Nunhems B.V. te Nunhem.

72

Uitvinder(s):

Jack Crien en te Baarlo.

Gerhard Reuling te Heythuysen.

Bart Segers te Maasbree.

Marion van de Wal te Best.

74

Gemachtigde:

Ir. A. van Westenbrugge c.s. te 2502 LS

Den Haag.

54

Nieuwe komkommerplanten met compacte groeiwijze.

57

De onderhavige uitvinding betreft het gebied van de komkommerveredeling, met name een nieuwe plant van het gewas komkommer, die een waardevolle nieuwe eigenschap bezit. Deze nieuwe eigenschap leidt tot een verbetering van teelteigenschappen en aldus tot een vergemakkelijking en verbetering van de komkommerteelt. Zaden van de uitvinding en werkwijzen om de nieuwe eigenschap naar andere komkommerplanten over te brengen worden ter beschikking gesteld. Zelf - en kruisbestuiving van de planten van de uitvinding, alsook het verkrijgen van verdubbelde haploïden uit deze planten worden beschreven.

NL C 2000992

Dit octrooi is verleend ongeacht het bijgevoegde resultaat van het onderzoek naar de stand van de techniek en schriftelijke opinie. Het octrooischrift komt overeen met de oorspronkelijk ingediende stukken. Octrooi Centrum Nederland is een agentschap van het ministerie van Economische Zaken.

Nieuwe komkommerplanten met compacte groeiwijze

5 Terrein van de uitvinding

Deze uitvinding betreft een wijziging in het komkommergenoom die tot expressie komt als een nieuwe eigenschap in komkommerplanten, vooral in *Cucumis sativus* ssp. *sativus*, meer bepaald in de lange komkommer, vooral het type “Dutch cucumber”, maar deze
10 uitvinding is van toepassing op alle soorten en types van komkommerplanten, zoals augurk, korte komkommer, lange komkommer, slicer komkommer, en dergelijke. Dit nieuwe planttype laat een minder arbeidsintensieve teeltwijze voor komkommerproductie toe en laat eveneens toe om een hoger aantal vruchten per plant op te leveren. In een werkingsvorm van de uitvinding kan men een hogere plantdichtheid realiseren in de
15 komkommerteelt. De planten van de uitvinding zijn zeer geschikt voor het systeem van hogedraadteelt, die steeds meer opkomt in de standaard komkommerteelt (Boonekamp (2006); Honkoop (2006)). Het compactere en meer open plantentype van de komkommerplanten van de uitvinding is een groot voordeel bij een hogedraadteelt. In een specifieke uitvoeringsvorm van deze uitvinding bezitten de nieuwe compacte
20 komkommerplanten, vergeleken met het gangbare komkommertype, kortere internodiën; kleiner, donkerder en langer groen blijvend blad; kleinere bloemen en kortere vruchten bezitten en bovendien groeien ze trager. Deze nieuwe combinatie van eigenschappen is zeer waardevol voor de ontwikkeling van commerciële komkommerrassen. Deze eigenschappen zijn de expressie van een enkel genetisch locus dat monogeen,
25 intermediair overerft. Dit genetisch locus kan worden aangetoond en gevolgd door

Vergelijking met de stand van de techniek

De huidige komkommerplant (*Cucumis sativus* L.) is door veredeling ontstaan uit de oorspronkelijke wilde augurk/komkommerplant en komt daarmee fenotypisch overeen.

- 5 Door veredeling is het huidige komkommertype ontwikkeld waarop alleen volledig vrouwelijke bloemen voorkomen. De komkommervrucht groeit uit zonder dat enige vorm van bestuiving of bevruchting noodzakelijk is en is dus parthenocarp. De huidige komkommervruchten, die als groente voor de consument zijn bestemd, bevatten enkel wat dunne, loze zaden. Augurken, komkommer, minikomkommer, Beith Alpha en slicer
- 10 behoren tot *Cucumis sativus*. Courgettes, meloenen, pompoenen en patisson behoren allen samen met het gewas komkommer tot de komkommerachtigen of *Cucurbitaceae*. De meeste komkommerrassen zijn nu hybriden, die worden geproduceerd door 2 genetisch verschillende ouderlijnen met elkaar te kruisen.
- 15 De komkommerteelt is een zeer intensieve teelt die veel zorg en arbeid vereist voor een optimale opbrengst. In Nederland, Canada en de omliggende landen vindt deze teelt het hele jaar door voornamelijk in de kas plaats. Om een hoge vruchtopbrengst te verkrijgen moet een teveel aan blad tijdig verwijderd worden zodat geen energie verloren gaat naar overbodige vegetatieve groei en het gewas voldoende open gehouden wordt om er goed
- 20 in te kunnen werken. Bovendien bevordert een open gewas de vruchtkwaliteit. Daarbij moet er wel op gelet worden dat toch voldoende bladeren behouden blijven voor een optimale fotosynthese, verdamping en ademhaling van de plant.

Het gangbare type komkommerplant, dat gebruikt wordt in de huidige lange

draad is bevestigd wordt ze “gekopt” door verwijdering van het groeipunt om verdere doorgroei te stoppen waarna zich zijscheuten ontwikkelen. Deze zijscheuten laat men tot ongeveer 1 meter boven de grond naar beneden uitgroeien, waarna de groeipunten worden verwijderd. Vervolgens vindt de bloei en de vruchtontwikkeling plaats op zowel
 5 de stam als op de zijscheuten of ranken, waarbij de vruchten op de ranken zich later ontwikkelen dan op de stam. De oogst van de vruchten vindt vanaf ca. 6 weken na zaaien plaats.

Gedurende de teeltperiode worden de planten intensief verzorgd met een juiste
 10 bemesting, watergift, klimaatbeheersing, ziektebestrijding en het verwijderen van overtollig, vergeeld en afgestorven blad om een optimale opbrengst van een hoge kwaliteit te waarborgen. Als gevolg van dit intensieve karakter en de kostbare kassen waarin zij plaats vindt is dit een relatief dure teelt. Daarom wordt er voortdurend gezocht naar manieren om arbeid te besparen en de productie van de komkommervruchten te
 15 verhogen en te versnellen met behoud of zelfs verbetering van de vruchtkwaliteit. Er wordt daarom bijvoorbeeld geëxperimenteerd met een systeem waarbij zich geen zijrankes ontwikkelen en er alleen van de stam wordt geoogst. Dit bespaart arbeid en leidt tot hogere en kwalitatief betere opbrengsten. De huidige rassen zijn echter minder geschikt voor deze methode, daar ze wegens hun snelle groei en lange internodiën te lang
 20 worden. De compact-eigenschap zoals hier beschreven maakt de ontwikkeling van komkommerplanten of -rassen mogelijk die wel beter voor deze nieuwe teeltwijze geschikt zijn. Een andere ontwikkeling is het gebruik van oogstrobots, zoals de bestaande oogstrobots ontwikkeld door de dienst GreenVision aan de UR Wageningen (<http://www.greenvision.wur.nl/>). Door de kleinere, horizontaal staande bladeren van dit

komkommerteelt). Een stengeldichtheid van rond de 2,6 – 2.8 planten per m² in de Nederlands hogedraadteelt voor lange komkommer is zo mogelijk om ideale omstandigheden te hebben, waar dit in de huidige Nederlandse hogedraadteelt voor lange komkommer eerder 2,2 stengels per m² is voor ideale omstandigheden. In een vorm van de uitvinding kan men zo minstens 20 % meer stengels aanhouden in de hogedraadteelt, door het gebruik van compactere planten, zoals planten heterozygoot voor het compactgen van de uitvinding.

In de stand van de techniek is een type van augurk (“pickling cucumber”) geteeld in volle grond gekend met kleine bladeren met meerdere zijscheuten per plant (“multiple branching”), geïdentificeerd in Arkansas en gekend onder H-19 of “Arkansas Little Leaf” (US Plant Variety Protection nummer 8900073). Hierbij is vastgesteld dat het fenotype van de kleinere bladeren in deze korte augurkeplanten veroorzaakt werd door een enkel recessief gen (Wehner *et al.* (1987); Goode *et al.* (1980)). Dit fenotype is niet beschikbaar in de gangbare lange komkommerteelt, zoals de Nederlandse lange komkommerteelt (“Dutch cucumber” type). Daar het een recessief gen betreft zijn er geen intermediaire vormen van dit fenotype mogelijk, in tegenstelling tot de planten van de huidige uitvinding. De vruchtkwaliteit van deze “little-leaf” komkommers werd inferieur bevonden ten opzichte van andere geteste lijnen met normale bladeren in Schultheis *et al.* (1998).

Samenvatting van de uitvinding

een lager gewicht. In een uitvoeringsvorm zijn deze planten die het compactgen bevatten van het type lange komkommer, zoals hybride lange komkommerplanten.

5 Een vorm van de uitvinding is een van bovenstaande komkommerplanten waarin het compactgen gekarakteriseerd is door de volgende eigenschappen: a) de bladschijfgrootte van het tiende echte blad van planten met het compactgen in homozygote toestand op 39 dagen na zaai is hoogstens 50 % van de bladschijfgrootte van planten van het gangbare komkommerplanttype op 39 dagen na zaai, en b) de grootste breedte van de kroonbladeren op 39 dagen na zaai van planten met het compactgen in homozygote
10 toestand is hoogstens 75 % van de grootste breedte van de kroonbladeren van planten van het gangbare komkommerplanttype op 39 dagen na zaai, en c) de lengte van de zijscheut op 56 dagen na zaai van planten met het compactgen in homozygote toestand is hoogstens 60 % van de lengte van de zijscheut op 56 dagen na zaai bij planten van het gangbare komkommerplanttype, en d) het aantal internodiën op de zijscheut op 56 dagen
15 na zaai van planten met het compactgen in homozygote toestand is hoogstens 70 % van het aantal internodiën op de zijscheut op 56 dagen na zaai bij planten van het gangbare komkommerplanttype.

In een vorm van de uitvinding is een komkommerplant ter beschikking gesteld waarvan,
20 als gevolg van de heterozygote aanwezigheid van het compactgen, de nateelt bij zelfbevruchting een uitsplitsende populatie oplevert waarin, in de verhouding van ongeveer 1:2:1 planten van het gangbare lange komkommertype, planten van het heterozygote (intermediaire) type en compact groeiende planten die homozygoot zijn voor het compactgen voorkomen; of die plant die uitsplitst in ongeveer 50 % planten van

Tot de uitvinding behoren ook (hybride) komkommerplanten, waarin de aanwezigheid van het compactgen kan worden aangetoond door deze planten te kruisen met planten van het gewas augurk of korte komkommer, en de F1- planten voortkomende uit deze kruising te analyseren met behulp van de AFLP methode en het gebruik van tenminste

5 één van de merkers E14/M61_M873.6, E19/M50_M280.2, E24/M49_M211.5, E17/M54_M179.0, E16/M47_M426.1, E16/M47_M411.0, of E16/M47_M402.9, of ervan afgeleide merkers die het compactgen flankeren, vooral merkers E14/M61_M873.6 en/of E19/M50_M280.2, of ervan afgeleide merkers, en waarbij er in de uitsplitsende F2 populatie van de zelfbevruchte F1-planten waarin het compactgen is aangetoond, een

10 cosegregatie is van de compacteigenschappen met tenminste een van deze AFLP merkers, of merkers ervan afgeleid.

In een vorm van de uitvinding zijn de planten van het gangbare komkommertype waarmee de planten van de uitvinding vergeleken worden, deze ongeveer 25 % van de

15 planten zonder compacte groei in een 1:2:1 uitsplitsende populatie na zelfbevruchting van een plant heterozygoot voor het compactgen, of deze ongeveer 50 % van de planten zonder compacte groei bekomen na verdubbelde haploide productie van een plant heterozygoot voor het compactgen. In een uitvoeringsvorm van de uitvinding zijn de planten van het gangbare komkommertype planten van het ras Sabrina of Korinda.

20

Ook een van de bovenstaande planten, waarbij deze planten afleidbaar zijn van de zaden gedeponneerd onder de Budapest Treaty door Nunza B.V. (nu Nunhems B.V.) op 29 maart 2005 bij het NCIMB Ltd. (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn Aberdeen AB21 9YA, Schotland) onder depotnummer NCIMB 41266, behoren tot deze uitvinding

In een vorm van de uitvinding is het compactgen dat gen dat geflankeerd is door de AFLP merkers E14/M61_M873.6 en E19/M50_M280.2 in een kruising van de planten gegroeid uit de zaden van depotnummer NCIMB 41266 met korte komkommer of augurk, vooral in een kruising met planten van het korte komkommerras Manar F1.

5

Ook tot deze uitvinding behoort een methode om een van bovenstaande planten te kruisen met andere komkommerplanten met het oogmerk het compactgen in te kruisen in een andere plant van de soort *Cucumis sativus*, waarbij gebruik gemaakt wordt van een technisch process waarbij tenminste een polymorfe AFLP merker gebruikt wordt, welke AFLP merker het compactgen flankeert in een kruising met korte komkommer of augurk, of waarbij gebruikt gemaakt wordt van het microbiologisch proces van de aanmaak van verdubbelde haploïden of *in vitro* celcultuur.

10

Ook tot deze uitvinding behoort een methode om met een van bovenstaande planten, waarin het compactgen in homozygote toestand aanwezig is, zaad van hybride planten te produceren in welke hybriden het compactgen heterozygoot aanwezig is, vooral een methode die gebruik maakt van *in vitro* celcultuur, alsook de vruchten en zaden van hybride planten van de uitvinding die het compactgen bevatten.

15

Eveneens tot de uitvinding behoort een methode om met behulp van tenminste een van de AFLP merkers E14/M61_M873.6, E19/M50_M280.2, E24/M49_M211.5, E17/M54_M179.0, E16/M47_M426.1, E16/M47_M411.0, of E16/M47_M402.9, vooral de AFLP merker E19/M50_M280.2 en/of E14/M61_M873.6, of ervan afgeleide merkers, de aanwezigheid van het compactgen in planten, vruchten, zaden, plantweefsel - of cellen

20

methode voor het telen van komkommerplanten in een hogedraadteelt, waarbij de komkommerplanten een van de bovenvermelde planten zijn, vooral deze methode waarbij minstens 20 % meer stengels per m² aangehouden worden in vergelijking met de gangbare komkommerteelt.

5

Gedetailleerde beschrijving van de uitvinding

De uitvinding betreft komkommerplanten met een specifiek gen, het “compactgen”, dat in het fenotype tot expressie komt door planten te vormen met een lagere groeisnelheid, kortere zijscheuten, kortere internodiënlengte en een blad dat kleiner en donkerder is en langer groen blijft dan bij het fenotype van een gangbaar type komkommerplant het geval is. Wel is het blad van dit ‘compacttype’ brosser dan van het gangbare type, waardoor het makkelijker breekt op de nerven. De gebroken bladeren blijven echter groen en gezond in tegenstelling tot beschadigde bladeren van het gangbare type, die sneller vergelen en verdorren. Verder staan de bladeren van het compacttype horizontaal en niet schuin naar beneden en afhangend zoals bij het gangbare type. Hierdoor is er bij het compacttype een betere ventilatie mogelijk door het gewas heen en is er door de open structuur meer zicht op planten en vruchten en kan men er daardoor beter in werken. De planten van het homozygote compacttype zelf zijn minder geschikt voor de standaard commerciële teelt van lange komkommerplanten, daar zij trager groeien, maar ze zijn zeer nuttig voor andere teeltwijzen en voor het vormen van hybride (heterozygote) lange komkommerplanten die de kenmerken van het compactgen (de compacteigenschappen) in intermediaire vorm vertonen. In de commerciële teelt worden voornamelijk hybride planten gebruikt die geproduceerd worden door 2 genetisch verschillende ouderlijnen te

25

de uitvinding te gebruiken. De heterozygote hybride planten van de uitvinding hebben door de bijzondere combinatie van eigenschappen een optimale groeiwijze, die een minder arbeidsintensieve teeltwijze toelaat in de gangbare (kas)teelt, terwijl toch een hoge opbrengst aan hoogkwalitatieve komkommervruchten verkregen wordt.

5

Deze optimale combinatie van eigenschappen, voortkomende uit de expressie van het compactgen van de uitvinding, is niet bekend in het gangbare lange komkommertype. Kruisingen met 'korte komkommer' planttypen en met augurken in het verleden hebben tot nog toe niet geleid tot dit unieke planttype (zie ook Tabel 2 in de voorbeelden). In de veredeling is het moeilijk om door middel van kruisingen een gewenste eigenschap uit een ander gewas over te brengen zonder ook andere, ongewenste eigenschappen mee te nemen die met de gewenste eigenschap gekoppeld zijn. Het is vaak onmogelijk of bijzonder moeilijk deze ongewenste eigenschappen door middel van terugkruisingen en selectie te verwijderen. De uitvinding die hier wordt beschreven is uniek omdat zij is ontwikkeld in het gangbare, hoogproducerende planttype zonder gekoppelde negatieve kenmerken, en met een eenvoudige genetische basis.

10
15

Het compactgen van de uitvinding kan ook in andere planten geïntroduceerd worden of gecombineerd worden met andere interessante eigenschappen die door een of enkele genen worden veroorzaakt. Zo is het mogelijk kruisingen te maken tussen planten met het compactgen van de uitvinding en komkommerplanten met meeldauwresistentie (*Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. ex Fr.) en/of *Erysiphe cichoracearum* (DC. ex M érat emend. Salm), ook "het wit" genoemd) om resistente hybriden te verkrijgen met de compacteigenschappen van de uitvinding, van zowel volledig resistent als partieel

20

planten verkregen worden met tolerantie of resistentie tegen *Didymella bryoniae* (bladvlekkenziekte of *mycosphaerella* (van Steekelenburg (1986)), of met een of meerdere pathogen-resistenties afgeleid van gekende komkommerrassen, zoals aangegeven in het CPVO protocol onder punt 44 tot en met 51 in Annex 1 van dit protocol (zie literatuurlijst).

De volgende definities worden aangeboden ter verduidelijking van de uitvinding en ter interpretatie van de conclusies en de beschrijving en zijn niet bedoeld als limiterend met betrekking tot de rechtsbescherming voortvloeiend uit deze aanvraag.

10

"Fenotype" is de waarneembare uiterlijke verschijningsvorm van de plant als resultaat van de interactie tussen het genotype van de plant en zijn omgeving. Het omvat alle waarneembare morfologische en fysiologische kenmerken van de plant.

15 "Genotype" is het totaal aan overervende genetische informatie van een organisme, dat mede beïnvloed door omgevingsfactoren, op een bepaalde wijze tot uitdrukking komt in het fenotype.

20 "Komkommerplant" als hierin gebruikt, wijst op een plant, zaad of embryo van de soort *Cucumis sativus* L.. Indien verwijzing naar de vruchten gemaakt wordt, wordt specifiek de term "komkommervrucht" gebruikt. Een komkommervrucht kan augurken, lange, korte, mini (Beith Alpha) of midi komkommers omvatten. Tot deze uitvinding behoren ook de uiteindelijk verkregen komkommervruchten die geoogst worden van de planten van de uitvinding, alsook elk gebruik, en elke verwerking ervan.

Een "plantenras" is een plantengroep binnen een enkel botanisch taxon van de laagst bekende rang, welke (ongeacht of aan de voorwaarden voor het toekennen van een kwekersrecht voldaan is) kan worden gedefinieerd aan de hand van de expressie van de eigenschappen die het resultaat zijn van een bepaald genotype of een combinatie van genotypen, kan worden onderscheiden van elke andere plantengroep door de expressie van tenminste één van die eigenschappen en kan worden beschouwd als een eenheid, gezien zijn geschiktheid om onveranderd te worden vermeerderd. Een groepering van planten, zelfs deze van dezelfde soort, allen gekenmerkt door de aanwezigheid van 1 locus of gen (of een reeks fenotypische eigenschappen veroorzaakt door dit enkel locus of gen), maar die verder enorm kunnen verschillen wat betreft andere loci of genen, is dus geen plantenras. De planten van het compacttype, zoals planten die het compactgen van de uitvinding bevatten en die verkrijgbaar of afleidbaar zijn uit de referentie-zaden gedeponeerd onder depotnummer NCIMB 41266, omvatten vele verschillende komkommerplanten, met zeer uiteenlopende fenotypische kenmerken en genotypische samenstelling, onderscheidend van de zaden zoals gedeponeerd. Zulk een groep van fenotypisch verschillende planten met slechts één gemeenschappelijk kenmerk (het compactgen), voldoet niet aan de bovenstaande definitie van een plantenras.

De eigenschappen van de planten van de uitvinding worden hierin genoemd als de "compacteigenschappen" en de planten die deze eigenschappen bevatten worden hierin dan ook de "compactplanten" of "compacttypen" of "compact planttype" genoemd. Deze planten kunnen homozygoot of heterozygoot zijn voor het compactgen en worden respectievelijk "homozygote" compactplanten, compacttypen of compact planttype, dan wel "heterozygote" of "intermediaire" compactplanten, compacttypen of compact

meer bepaald om de combinatie van de eigenschappen kortere zij scheuten, kortere internodiën, kleiner blad, kleinere bloemen, en kortere vruchten. In een vorm van de uitvinding zijn de compacte eigenschappen de combinatie van de eigenschappen tragere groei, kortere zij scheuten, kortere internodiën, kleiner blad, horizontaler (opstaand) blad, 5 vlakker blad (met minder bolling), donkerder groen blad, brosser (sneller breekbaar) blad, kleinere bloem en kleinere, lichtere vruchten; vooral de eigenschappen die opvallend zijn in planten homozygoot voor het compactgen (zoals de homozygote planten gegroeid uit het zaad gedeponeerd onder depotnummer NCIMB 41266, of verdubbelde haploide planten homozygoot voor het compactgen bekomen uit een plant heterozygoot voor het 10 compactgen) die een significant kortere zij scheut, kortere internodiën, kleiner blad, kleinere bloemen en kortere vruchten hebben; dit alles in vergelijking met wild-type planten (zonder compactgen), zoals planten van het gangbare komkommertype, bv. deze ongeveer 25 % van de planten zonder compacte groei in een 1:2:1 uitsplitsende populatie na zelfbevruchting van een plant heterozygoot voor het compactgen, of deze ongeveer 50 15 % van de planten zonder compacte groei bekomen na verdubbelde haploide productie van een plant heterozygoot voor het compactgen.

De planten homozygoot voor het compactgen van de uitvinding zijn het best herkenbaar aan de uitgesproken compacte eigenschappen die een significant verschil vertonen in 20 vergelijking met de wild-type planten (zonder compactgen, bv. type Korinda), dit vooral wat betreft het aantal internodiën van de zij scheuten (significant lager dan wild-type in de homozygoot), de lengte en breedte van het blad (significant kleiner dan wild-type in de homozygoot), de bladschijfgrootte (significant kleiner dan wild-type in de homozygoot), de lengte en breedte van het kroonblad (significant kleiner dan het wildtype in de

In een vorm van de uitvinding wordt een plant die homozygoot is voor het compactgen van de uitvinding gekenmerkt door de combinatie van de volgende karakteristieke compacteigenschappen, vergeleken onder dezelfde teeltomstandigheden (waarbij zaai bij voorkeur in de zomer is, maar ook het gehele jaar door kan) met een plant die het compactgen niet bevat (hier een controle-plant genoemd), waarbij het gemiddelde van metingen op minstens 20 planten van elk type vergeleken wordt (enerzijds de homozygoot compactplanten, anderzijds de controleplanten):

- de grootste breedte van het tiende echte blad op 39 dagen na zaai van planten met het compactgen in homozygote toestand is hoogstens 70 % van de breedte van het tiende blad van de controle-planten op 39 dagen na zaai, en
- de bladschijf grootte (0,5 maal de grootste breedte van het blad maal de langste lengte over het blad van de onderste bladlob tot de bladpunt) van het tiende echte blad op 39 dagen na zaai van planten met het compactgen in homozygote toestand is hoogstens 50 % van de bladschijf grootte van de controle-planten op 39 dagen na zaai, en
- de grootste breedte van de kroonbladeren op 39 dagen na zaai van planten met het compactgen in homozygote toestand is hoogstens 75 % van de grootste breedte van de kroonbladeren van de controle-planten op 39 dagen na zaai, en
- de lengte van de zijscheut op 56 dagen na zaai van planten met het compactgen in homozygote toestand is hoogstens 60 % van de lengte van de zijscheut op 56 dagen na zaai bij de controle-planten (de lengte is vanaf de aanhechting van de zijscheut aan de hoofdstam tot het eindpunt van de zijscheut), en
- het aantal internodiën op de zijscheut op 56 dagen na zaai van planten met het compactgen in homozygote toestand is hoogstens 70 % van het aantal internodiën op de zijscheut op 56 dagen na zaai bij de controle-planten.

Zo kan men steeds planten met het compactgen herkennen op basis van de unieke combinatie van bovenstaande duidelijke fenotypische kenmerken in planten die homozygoot zijn voor het compactgen. Het homozygoot maken van planten voor het compactgen is een standaard werkwijze in de stand van de techniek, net zoals het

5 standaard is om van een plant homozygoot voor het compactgen planten te verkrijgen die heterozygoot zijn voor dit gen. Ook deze heterozygote compactplanten zijn een onderwerp van deze uitvinding.

- 10 Fenotypische eigenschappen van een plant - zoals de bladgrootte - kunnen verschillen vertonen afhankelijk van de teeltwijze en van omgevingsfactoren (zoals bv. temperatuur, licht, vochtigheid, hoeveelheid nutrienten), dus is het evident dat voor een vergelijking tussen wild type, heterozygote en/of homozygote planten van de uitvinding deze verschillende plant-types in vergelijkbare of in dezelfde teeltcondities geteeld worden,
- 15 best in een standaard komkommerteelt, vooral dan een hogedraadteelt.

- De compacteigenschappen, zoals bv. in hybride planten, kunnen worden aangetoond door de kenmerken van afgeleide planten verkregen na zelfbestuiving of verdubbelde haploide-vorming – uitgaande een plant waarvan het vermoeden bestaat dat hij het compactgen bevat – onderling te vergelijken en te bevestigen dat de
- 20 compacteigenschappen samen overerven volgens het verwachte patroon van heterozygote, homozygote en wild-type planten, volgens een monogene, intermediaire, overerving. Bij onderlinge kruising (of zelfbestuiving) van homozygote planten is er geen uitsplitsing van eigenschappen, het overerven van de compacteigenschappen is hier

"F1, F2, etc." verwijst naar de opeenvolgende, verwante generaties volgend op een kruising tussen twee ouderplanten of ouderlijnen. De planten opgekweekt uit het zaad, dat is gevormd na een kruising van twee ouderplanten, wordt de 'F1' genoemd. Zelfbevruchting van de F1 planten levert de F2 generatie op enz..

5

"Verdubbelde haploiden" (of DHs) zijn planten verkregen door via een technisch (*in vitro*) proces het genoom van haploide cellen (zoals pollen, microspore-cellen of eicellen) van een plant te verdubbelen, en daaruit diploide planten te regenereren, zoals gekend in de stand van de techniek (zoals bv. in Amerikaans octrooi 5,492,827 of in Gémes-Juhász et al. (2002)).

10

De term "hybriden", "F1 hybriden" of "hybride planten" wordt gebruikt om het zaad en de planten uit dat zaad van een kruising tussen twee genetisch verschillende ouderlijnen aan te duiden. (F1)Hybride planten worden gekenmerkt door het uitsplitsen van kenmerkende eigenschappen in de volgende generatie, de F2. Deze eigenschappen zijn dus genetisch niet stabiel in hybriden. Werkwijzen voor het ontwikkelen van hybriden zijn welgekend in de stand van de techniek (zie bijvoorbeeld de werkwijze beschreven in het Amerikaanse octrooi 4,822,949). Door een vrouwelijke ouderlijn van het gangbare komkommertype te kruisen met een mannelijke ouderlijn van het compacttype worden hybriden verkregen met een intermediaire expressie van de compacteigenschappen, die voor de commerciële komkommerteelt, zoals de lange komkommerteelt, meer bepaald in de hogedraadteelt, zeer interessant zijn.

15

20

"Korte komkommerrassen" of "korte komkommerplanten", zoals hierin gebruikt, worden

“Augurkerassen” of “augurkplanten” zoals hierin gebruikt, worden gekenmerkt door middelgroene vruchten met soms een iets lichtere gemarmerde punt, die een lengte hebben van ca. 12-15 cm, met een gestekelde huid met wratten, vrijwel zonder ribben. De bladeren zijn veelal klein tot middelgroot. Type voorbeelden van augurkerassen zijn de rassen Capra en Delphina.

“Lange komkommerrassen” of “Lange komkommerplanten”, zoals hierin gebruikt, worden gekenmerkt door iets halzige vruchten van ca. 30-37 cm lengte (of langer) met een licht geribde huid, middelgroen van kleur, en met parthenocarpe uitgroei van de vruchten. De bladeren zijn veelal groot tot zeer groot. Type voorbeelden van lange komkommerrassen zijn de rassen Sabrina of Korinda, of komkommerplanten die een beschrijvingscode van 7 tot en met 9 krijgen voor de lengte van de vrucht volgens het CPVO protocol (zie Annex 1 punt 19 in dit protocol). In een vorm van de uitvinding is het compactgen aanwezig in lange komkommerplanten, vooral dan lange komkommerplanten geschikt voor de commerciële komkommerteelt, vooral de kasteelt. In een vorm van de uitvinding is deze kasteelt een hogedraadteelt. In een andere vorm van de uitvinding is het compactgen van de uitvinding aanwezig in komkommerplanten die niet het Little Leaf locus (*ll*) bevatten zoals dit aanwezig is in H-19 of Arkansas Little Leaf, vooral dan zulke komkommerplanten geschikt voor de commerciële kasteelt van lange komkommer, meer bepaald de hogedraadteelt.

Het “compactgen” is het genetisch kenmerk op een bepaald locus van het komkommergenoom, dat in het fenotype van de compactplant, in vergelijking tot het

E19/M50_M280.2 (op ongeveer 0,67 cM), of merkers van een van deze AFLP merkers afgeleid (zoals STS of SNP merkers), meer bepaald in kruisingen van planten gegroeid uit de zaden gedeponneerd onder depotnummer NCIMB 41266, met korte komkommer of augurkeplanten, bv. de korte komkommer Manar F1.

5

Uitsplitsing van de compacteigenschappen in de 1:2:1 verhouding na zelfbevruchting van een heterozygote komkommerplant in ongeveer 25 % homozygoot compacttype, ongeveer 50 % heterozygoot compacttype en ongeveer 25 % wildtype (geen compacteigenschappen of compactgen), of de 1:1 verhouding in verdubbelde haploiden

10 (ongeveer 50 % van de DHs zal homozygoot zijn voor het compactgen, de andere ongeveer 50% zal homozygoot voor het wild type zijn (dus zonder compactgen)), geeft aan dat het compactgen van de uitvinding aanwezig is in deze heterozygote plant.

Bevestiging hiervan kan gebeuren door een AFLP-merker analyse in kruisingen met korte komkommer of augurk, zoals hieronder beschreven, als deze

15 compacteigenschappen cosegregeren met de beschreven AFLP merkers die het compactgen flankeren in een kruising met korte komkommer of augurk. Bij deze

fenotypische vergelijking van de uitsplitsende komkommerplanten worden natuurlijk dezelfde teelt-omstandigheden gebruikt en worden de vergelijkende metingen en waarnemingen op dezelfde wijze en hetzelfde tijdstip uitgevoerd. Als eventuele extra

20 controle-planten kunnen planten van het gangbare lange komkommertype ingesloten worden (zoals planten van het ras Sabrina of Korinda, meer bepaald planten van het ras Korinda).

De AFLP-merkers van de uitvinding kunnen gebruikt worden om te bevestigen dat

Voor de merkeranalyse wordt eerst een kruising gedaan tussen een (hybride) komkommer plant (waarvan vermoed wordt dat die heterozygoot is voor het compactgen) met augurk of korte komkommer. De meeste korte komkommer- en augurkerassen zijn hiervoor bruikbaar, zo lang de AFLP merkers bruikbaar zijn in die achtergrond. Voor
 5 een gemakkelijke fenotypering worden best korte komkommer- of augurkeplanten genomen van een homozygote lijn met een fenotype dat zo sterk mogelijk afwijkt van dat van de compactplanten van de uitvinding waarmee gekruist wordt (bv. een grootbladig korte komkommertype type met lichtgekleurd blad). Vooral korte komkommerrassen die tenminste herkend worden door AFLP merker E16/M47_M426.1 zijn geschikt, bv.
 10 planten van het gekende korte komkommerras Manar F1, of homozygote planten met een gelijkaardig fenotype als het ras Manar F1.

In deze kruising tussen een (hybride) komkommer plant (heterozygoot voor het compactgen) met een augurke- of korte komkommerplant splitsen de
 15 compacteigenschappen 1:1 uit: ongeveer 50 % van de planten heeft de compacteigenschappen, de overige planten niet. Na zelfbestuiving van de planten met de compacteigenschappen bekomen uit deze kruising met augurk of korte komkommer bekomt men de F2 die een uitsplitsing vertoont van planten homozygoot voor het compactgen of de compacteigenschappen, heterozygoot voor het compactgen of de
 20 compacteigenschappen en wildtype planten zonder het compactgen of zonder de compacteigenschappen in de verhouding 1:2:1, als de originele (hybride) plant inderdaad heterozygoot was voor het compactgen.

Merker analyse met minstens een van de AFLP merkers E14/M61_M873.6,

de compacteigenschappen van de uitvinding met de AFLP merkers, als het compactgen van de uitvinding aanwezig is in deze planten.

In een vorm van de uitvinding erven verscheidene van de fenotypische eigenschappen van de compactplanten van de uitvinding (compacteigenschappen) samen over in de nakomelingen van compactplanten van de uitvinding. De cosegregatie van een of meer van de AFLP merkers van de uitvinding (zoals een van de AFLP merkers in Figuur 1) met het compactfenotype, toont de aanwezigheid van het compactgen in de planten van de uitvinding aan.

Als gevolg van het veredelingswerk vind een verdere inkruising van het compactgen in andere genetische achtergronden plaats. Het is mogelijk dat de compacteigenschappen minder gemakkelijk fenotypisch herkend worden in planten en hybriderassen die heterozygoot zijn voor het compactgen. Het compactgen is echter steeds te herkennen via de hierboven vermelde uitsplitsing van de compacteigenschappen bij zelfbevruchting van planten die heterozygoot zijn voor het compactgen, of bij de vorming van verdubbelde haploïden. Deze fenotypische analyse kan bevestigd worden door de bovenstaande merkeranalyse. De combinatie van verschillende van de compacteigenschappen in planten, die homozygoot zijn voor het compactgen, in een uitsplitsende populatie is herkenbaar voor elk persoon met normale bekwaamheid die werkt in het domein van de komkommerteelt. Op deze wijze kunnen planten die het compactgen bezitten steeds herkend worden.

In een specifieke uitvoering van deze uitvinding is het compactgen in homozygote

specifieke uitvoeringen van de uitvinding op die zich van de uitvoering in de voorbeelden onderscheiden.

- Tot deze uitvinding behoort ook het gebruik van het compactgen in andere komkommerrassen en -lijnen of in andere planten van de soort *Cucumis*, door dit compactgen volgens algemeen bekende methoden (zoals bv. recurrente selectie, embryo rescue, e.d.) in te kruisen in andere planten, zoals in andere planten van de soort *Cucumis sativus*, vooral in planten van het lange komkommertype.
- 10 Ook het opsporen en volgen van deze compacteigenschap in de verschillende kruisingsproducten - en stadia tijdens het veredelingsproces met behulp van minstens een van de AFLP merkers E14/M61_M873.6, E19/M50_M280.2, E 24/M49_M211.5, E17/M54_M179.0, E16/M47_M426.1, E16/M47_M411.0, of E16/M47_M402.9, vooral met merkers E14/M61_M873.6 of E19/M50_M280.2, of hiervan afgeleide merkers (zoals
- 15 STS, SNP of andere merkers afgeleid van minstens een van deze AFLP merkers), na kruising in korte komkommer of augurk (zoals hierboven beschreven), behoort tot het terrein van deze uitvinding, alsook kits met zulke merkers. De AFLP techniek en AFLP merkers zijn ook in detail beschreven in EP0534858B1, en de inhoud van dit document en definities zoals in deel 5.1 (pagina 4-6) hiervan beschreven kunnen voor deze
- 20 uitvinding gebruikt worden.

De volgende voorbeelden worden gegeven ter illustratie van een van de uitvoeringsvormen van de uitvinding, en zijn niet bedoeld om de beschermingsomvang van de uitvinding te bepalen die enkel door de bijgevoegde conclusies bepaald wordt.

Figuur 2: vergelijking van vruchten, bloemen en bladeren van planten onder dezelfde teeltomstandigheden gegroeid (telkens verwijderd 35-40 dagen na zaai, het blad is telkens ongeveer het 15^{de} blad): **Figuur 2a:** vergelijking van typische vruchten geoogst in planten homozygoot voor het compactgen (links), heterozygoot voor het compactgen (midden) of controle-planten van het type Korinda (rechts); **Figuur 2b:** vergelijking van typische bladeren en bloemen verwijderd van planten homozygoot voor het compactgen (rechts), heterozygoot voor het compactgen (midden) of van controle-planten van het type Korinda (links); **Figuur 2c:** detail-vergelijking van de kroonbladeren van typische bloemen verwijderd van planten homozygoot voor het compactgen (rechts), heterozygoot voor het compactgen (midden) of van controle-planten van het type Korinda (links).

Voorbeelden.

Voorbeeld 1. Fenotypische analyse van de compactplanten

15

In Nederland werd in de teelt van de Nederlandse lange komkommer in een F1-hybride populatie onverwacht een compactere plant met een afwijkend fenotype vastgesteld (dit type plant kreeg de naam “4001 type”, en het verantwoordelijke locus kreeg de naam “4001 locus”). Bij vergelijking met andere lange komkommerplanten (voorbeeld Korinda) werd vastgesteld dat de groei van de compacte planten matig was en de strekking van de hoofdstam traag, vooral doordat de internodiën korter waren. De bladeren van de compactere plant waren duidelijk kleiner en donkerder dan bij de gangbare lange komkommerrassen. De bladstand van de compactere planten was meer horizontaal en het blad was minder gebobbeld (vlakker blad). De compactere planten

20

intermediaire overerving. Naast het heterozygote, intermediaire type komen er ook homozygote planten voor die de typische, hierboven beschreven compacte eigenschappen vertonen zoals een zeer compacte groei, een klein blad, een korte vrucht en korte internodiën.

5 De volgende splitsingsverhouding werd vastgesteld:

Ongeveer 25% homozygoot compact planttype

Ongeveer 50% heterozygoot intermediair compact planttype

Ongeveer 25% normaal lang komkommer planttype

10

Deze Mendeliaanse splitsingsverhouding 1:2:1 duidt op een uitsplitsing van één gen op een enkel locus, met intermediaire expressie van het heterozygote genotype. Zaden van de homozygote planten van het 4001 type (*Cucumis sativus ssp sativus*) werden gedeponereerd onder het Budapest Treaty door Nunza BV (sindsdien in naam gewijzigd naar Nunhems BV) bij het NCIMB (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) onder depotnummer NCIMB 41266, op 29 maart 2005. In overeenkomst met de Rijsoctrooiwet en het Uitvoeringsbesluit (conform artikel 21, lid 3 Uitvoeringsbesluit) wenst de aanvrager dat tot de datum waarop octrooi wordt verleend of tot de datum, waarop vaststaat dat op de octrooiaanvraag geen octrooi wordt verleend, de afgifte van monsters van het gedeponereerde biologisch materiaal of daarvan afgeleid biologisch materiaal, alleen kan geschieden aan een door de verzoeker aangewezen deskundige.

20

In haploide cellen, bv. pollen, microsporecellen of eicellen, van de komkommerplanten

Ongeveer 50% van de DH's vertoonden een normaal planttype, als gevolg van het ontbreken van het gen voor de compacteigenschappen. Deze planten zijn homozygoot voor het normale lange planttype.

- 5 In de uitsplitsingsverhouding bij verdubbelde haploïden komen alleen de 2 verschillende homozygote genotypen voor in een 1:1 verhouding. Dit toont aan dat het hier zeker om een enkel locus gaat, meest waarschijnlijk om een monogene eigenschap.

- 10 Zoals men ook de cultuurwaarde van ander komkommersmateriaal steeds verder tracht te verhogen, zo zijn er kruisingen tussen homozygote compactplanten met diverse komkommerrassen van het lange type gemaakt. Door middel van deze kruisingen en verdere selectie, werden onder andere planten met betere ziekteresistentie verkregen, die langere vruchten geven dan de homozygote compactplanten, maar nog steeds het compactgen bevatten en een opener gewas vormen.

- 15 De hierboven beschreven specifieke uitvoering in homozygote toestand en de specifieke uitvoering in heterozygote toestand werden vergeleken met het gangbare lange komkommertype (als voorbeeld het ras Korinda) wat betreft een aantal kenmerkende eigenschappen. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 1.

- 20 Tabel 1 toont een vergelijking van het gangbare lange komkommertype (normaalttype, Korinda) met het homozygote 'compacttype' en het heterozygote, intermediaire type voor die kenmerken die deze planttypen duidelijk karakteriseren. De vergelijkingsproef waaruit deze gegevens voortkomen is gezaaid op 4 juli 2005. De zaailingplanten zijn

de eerste 6 oksels geschoond, dus zonder vruchten, en daarna 2 vruchten aangehouden (in het 7e/8e oksel) en vervolgens weer enkele oksels geschoond, zodat de onderste vruchten goed konden uitgroeien. De weergegeven waarnemingen zijn gedaan op minstens 20 planten van elk type, de bekomen gemiddelde waarde van deze metingen wordt weergegeven in Tabel 1.

De datum waarop de metingen in Tabel 1 werden gedaan staan weergegeven in de tabel. Omdat deze absolute cijfers afhankelijk zijn van plaats en tijd van de meting of waarneming, is voor de gemeten en de berekende kenmerken bij het heterozygote en het compacttype het percentage ten opzichte van het normaaltype aangegeven.

Verklaring van de termen gebruikt in Tabel 1:

CBP code: De nummering volgens het CPVO protocol (zie literatuurlijst)

Soort Waarn.: (Soort Waarneming)

M = Meting in centimeters (cm) of grammen (gr.) of aantallen

B = Berekening, V = Visuele waarneming

% van N: De waargenomen waarde van het heterozygote of het homozygote compacttype uitgedrukt als percentage van de waarde van het normale type/wild-type

LSD: Kleinste significante verschil (Least Significant Difference) volgens de paarsgewijze test van Scheffe (1953, 1959) bij een overschrijdingskans van 0.5% en 0.1%, ofwel een statistische betrouwbaarheid van 95 %,

H/C = tussen Heterozygoot - en Compacttype

Omschrijving van de kenmerken in Tabel 1:

5 Plant:

groeikracht: lengte van de stam 44 dagen na zaai, gemeten vanaf het substraat

lengte stam bij 15 internodiën: lengte van de stam gemeten over 15 internodiën, gemeten vanaf het substraat

lengte zijscheut: lengte vanaf aanhechting hoofdstam tot eindpunt zijscheut, 56

10 dagen na zaaien

aantal internodiën zijscheut: totaal aantal internodiën op de zijscheut, geteld 56 of 66 dagen na zaaien

Blad:

15 *blad 1*: het 10^{de} blad (op ong. 1 tot 1,5 m hoogte)

blad 2: het 11^{de} blad (op ong. 1 tot 1,5 m hoogte)

lengte: langste lengte over het blad, van onderste bladlob tot bladpunt gemeten (verschillend van de blad-lengtemaat gebruikt in het CPVO protocol)

breedte: grootste breedte van het blad (zie CPVO protocol in literatuurlijst, uitleg bij nummer 11 onder “Explanations and Methods” in Annex 1 ervan)

20

ratio lengte / breedte: lengte blad gedeeld door de bladbreedte

bladschijfgrootte: 0,5 maal bladbreedte maal bladlengte in cm²

houding: 1 is verticaal naar beneden hangend, 9 is horizontaal

intensiteit groene kleur: 1 is lichtgroen, 9 is donkergroen

ratio lengte / breedte kroonblad: lengte gedeeld door breedte kroonblad

Vrucht:

gewicht: het gemiddelde gewicht van 2 vruchten per plant gewogen in
gram, gedeeld door 2

lengte: de gemeten lengte vanaf de inplant van de vruchtsteel in de vrucht tot de
inplant van de bloem in de vrucht

- Omdat de compacteigenschappen zo duidelijk te zien zijn, geeft Tabel 2 een visuele vergelijking tussen het normale (lange) komkommertype (voorbeeld Korinda), het korte komkommertype, augurk en het (homozygote) compacttype. Deze vergelijking geeft een overzicht van de verschillen en de overeenkomsten tussen deze verschillende komkommertypes. In de laatste kolom onder het hoofdje 'overlap' wordt de overlap aangegeven tussen het compacttype en augurk (C/A) en het compacttype met korte komkommer (C/K). Doordat in veel eigenschappen geen overlap is wordt hiermee duidelijk de unieke combinatie van eigenschappen van het compacttype geïllustreerd. Hiervoor werd een visuele schaal gebruikt waarbij 1 de laagste/kortste expressievorm is en 9 de hoogste/langste expressievorm (afkortingen zoals voor Tabel 1).
- In initiële metingen op de bovenstaande planten, werd er ook een significant verschil gevonden in de chlorofyl inhoud van bladeren van de homozygote compactplanten in vergelijking met de normale lange komkommer (voorbeeld Korinda), wat de donkerder groene kleur van de bladeren met het compactgen kan verklaren.

- Voor de AFLP analyse is gebruik gemaakt van de veel gebruikte restrictie-enzyme combinatie EcoRI/MseI. De E van EcoRI en M van MseI staan in de naam van de merker beschreven, hetgeen algemeen in de literatuur wordt gedaan. De code die volgt op de E of de M correspondeert met de selectieve nucleotides aan het 3' uiteinde van de EcoRI en MseI primers; ook dit is standaard (zie de beschikbare lijst met AFLP codes op <http://www.keygene.com/pdf/KF%20Primer%20enzyme%20combinations.pdf> en <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/keygeneAFLPs.html>). Naast deze code is in de naam ook de grootte van de merker weergegeven. Bijvoorbeeld, E14/M61-M873.6 is een AFLP merker die met primers E14 en M61 een band van ongeveer 873.6 baseparen geeft bij AFLP. Het dient opgemerkt te worden dat het gekend is in de stand van de techniek dat de grootte van de merker licht kan variëren afhankelijk van de gebruikte detectie technologie (radioactief versus fluorescent). Bovenstaande betekent dat een persoon met kennis van AFLP deze merkers kan reproduceren.
- Voor de hier gebruikte AFLP merkers zijn dit de primer sequenties (met na de verticale streep de 3' selectieve nucleotides; de sequenties staan ook in de bijhorende sequentielijst):
- E17: 5'- GAC TGC GTA CCA ATT C|CG - 3' (SEQ ID No. 1)
 - E24: 5'- GAC TGC GTA CCA ATT C|TC - 3' (SEQ ID No. 2)
 - E14: 5'- GAC TGC GTA CCA ATT C|AT - 3' (SEQ ID No. 3)
 - E19: 5'- GAC TGC GTA CCA ATT C|GA - 3' (SEQ ID No. 4)
 - E16: 5'- GAC TGC GTA CCA ATT C|CC - 3' (SEQ ID No. 5)
 - M54: 5'- GAT GAG TCC TGA GTA A|CCT - 3' (SEQ ID No. 6)

locus gekoppelde merkers. Op populaties van verdubbelde haploïden en inteelt-lijnen van de 4001 plant werden verschillende AFLP primercombinaties getest (256). Er werden echter geen nauw gekoppelde merkers geïdentificeerd binnen lange komkommer.

- 5 Vervolgens werd een merkeridentificatie opgezet voor het 4001 type in een andere achtergrond. Het compactgen is gelokaliseerd op één locus. Het gaat hier om een monogene eigenschap of - onwaarschijnlijk - om meerdere sterk gekoppelde genen. Om het compactgen te fijnkarteren (merkers vinden op korte afstand van het locus) is de homozygote komkommer-compactplant gekruist met korte komkommer. Daar de
- 10 genetische afstand tussen augurk, korte komkommer en lange komkommer relatief groot is, zijn er meer merkers aanwezig in de nakomelingen van de kruisingen van lange komkommer met augurk of korte komkommer, in het gebied rond het compactgen. Hiervoor werden 126 F2 individuen getest na kruising in korte komkommer-achtergrond (zelfbestuiving van een F1 plant uit de kruising 4001 met ManarF1 (een korte
- 15 komkommerras)). 128 verschillende AFLP primercombinaties werden gebruikt in een BSA screening. De in dit project geïdentificeerde merkers zijn nauwkeuriger in kaart gebracht door de merkers te testen op meer individuen van dezelfde populatie (632 F2 individuen (inteelt van F1 individu uit kruising 4001 x ManarF1)).
- 20 Na deze projecten om initiële merkers gekoppeld aan het 4001-locus te identificeren, werd een grote populatie bestaande uit 4180 individuen gescreend met 2 merkers (TaqMan® SNP genotyping assay, dit is high throughput) welke een gebied beslaan van ongeveer 12 cM met daarop het 4001 gen. Deze merkers zijn polymorf tussen lange en korte komkommer en kunnen in een kruising tussen lange en korte komkommer gebruikt

GCATGCATGGACTGACTTACTAGA (primer MAS4-f, SEQ ID No. 11)

GGAGACTCACATATCTTTCTGACACA (primer MAS4-r, SEQ ID No. 12)

Deze beide primers worden gebruikt in PCR, waarbij de volgende gelabelde probes toegevoegd worden:

- 5 VIC-CTAACTGCAAAAACAATGT (deze probe herkent het normaal type (zonder compactgen) en het normale (wildtype) allel in het heterozygote compactplanttype, SEQ ID No. 13), en

FAM-AACTGCAAAAGCAATGT (deze probe herkent het heterozygote en het homozygote compactplanttype, SEQ ID No. 14).

10

MAS37: test met een andere flankerende merker (afgeleid van een AFLP merker):

AGGATCACCTGATGTTCAAGGAGTA (primer MAS37-f, SEQ ID No. 15)

CGATGATACAGTTGGAAGGATGGA (primer MAS37-r, SEQ ID No. 16)

Deze beide primers worden gebruikt in PCR, waarbij de volgende gelabelde probes toegevoegd worden:

15

VIC – TATGGACGACTTTCATGTAG (deze probe herkent het normaal type (zonder compactgen) en het normale (wildtype) allel in het heterozygote compactplanttype, SEQ ID No. 17) en

FAM -TGGACGACTTTGATGTAG (deze probe herkent het heterozygote en het

20

homozygote compactplanttype, SEQ ID No. 18).
Detectie is aan de hand van de signalen van de probes zoals gekend in de stand van de techniek voor dit type assay.

Deze testen geven aan of het geteste DNA homozygoot wild-type, heterozygoot

Vervolgens is een BSA (Bulked Segregant Analysis) uitgevoerd op 4 pools met zeer kleine screeningsvensters van respectievelijk 2,0 cM en 2,4 cM om zowel cis (4001 type) als trans (normaal type) gekoppelde merkers te identificeren in het gebied van interesse. Er zijn in totaal 512 EcoRI/MseI AFLP primercombinaties uitgevoerd op de 4 pools.

De in de BSA geïdentificeerde kandidaat merkers zijn gekarteerd door het genotype van de 137 nauwe recombinanten voor deze merkers te bepalen.

Alle scores zowel genotypisch als fenotypisch zijn geverifieerd op F3 individuen waaruit F3 lijnscores werden verkregen wat een eenduidige F2 score geeft. Verificatie van het fenotype is uitgevoerd op een selectie van de 137 nauwe recombinanten. De selectie bestond uit 126 F3 lijntjes. De fenotypering is uitgevoerd op 15 individuen per F3 lijntje. Nadat het 4001 locus nauwkeurig was geplaatst zijn de merkerscores geverifieerd op 64 F3-lijntjes. Hiervoor werden 15 individuen per lijntje uitgezaaid. Hiervan is DNA geïsoleerd en is het genotype van de 15 individuen per F3-lijntje bepaald voor de twee high throughput merkers. Na analyse van de verkregen genotypes zijn 4 individuen per F3-lijn geselecteerd (waarbij elke genetische klasse is vertegenwoordigd, dus zowel homozygoot 4001, heterozygoot 4001, en homozygoot normaal type). Op deze 64 x 4 individuen zijn alle nauw gekoppelde EcoRI/MseI AFLP merkers getest waaruit een betrouwbaar F2 genotype voor de merkers afgeleid kon worden zodat de recombinaties nauwkeurig in kaart gebracht konden worden.

Voor sommige merkers zijn om een eenduidige score te verkrijgen nog eens 12 individuele planten van de F3-lijn voor deze merkers gegenotypeerd.

flankerende merker E19/M50_M280.2 ligt in deze populatie op 0,67 cM van het compactlocus. Deze merkers zijn niet polymorf binnen lange komkommer.

Literatuurlijst

-Boonekamp (2006), Groenten & Fruit, week 31, p. 19

5 -“CPVO Protocol”: Protocol for Distinctness, Uniformity and Stability Tests, Cucumber, *Cucumis sativus* L. European Union, Community Plant Variety Office, Boulevard Maréchal Foch, FR - 49021, Angers Cedex 02. Document CPVO-TP/61/1, adopted on 27/03/2002. Ook beschikbaar op: <http://www.cpvo.europa.eu>, zoals op: http://www.cpvo.europa.eu/documents/TP/vegetales/TP_061_CUCUMIS_SATIVUS.pdf

10 -Gémes-Juhász, A. et al. (2002): “Effect of optimum stage of female gametophyte and heat treatment on in vitro gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.)”. Plant Cell Reports, 2002, Vol. 21 (2): 105-111

-Goode et al. (1980) Arkansas Farm Res. 29(3):4).

15

-Honkoop (2006), Groenten & Fruit, week 38, p. 6-7

-Scheffe, H (1953): “A Method for judging all contrasts in the Analysis of Variance”. Biometrika (1953) 40 (1-2): 87-110.

20

-Scheffe, H (1959): “The Analysis of Variance” , John Wiley, New York.

-Schultheis et al. (1998, Can. J. Plant Sci. 78:333-340).

TABEL 1.

			Kenmerk		Planttype						Significant verschil		
CBP code	Datum Waarn.	Soort Waarn.			Normaal	Heterozygoot		Compact		LSD			
			bepaling	% van N		bepaling	% van N	0.5%	0.1 %	N/H		N/C	H/C
2	17 aug	M, cm	Plant	groeikracht	211.00	195.00	92	172.30	82	6.01	7.56	**	**
3	29 aug	M, cm		lengte stam bij 15 internodiën	147.60	126.30	86	109.80	74	5.50	6.92	**	**
	29 aug	M, cm		lengte zijscheut	82.20	66.50	81	37.40	45	9.86	12.40	**	**
	29 aug	M		aantal internodiën zijscheut	7.1	5.7	80	3.9	55	0.97	1.22	**	**
	8 sept	M		aantal internodiën zijscheut	13.75	12.80	93	7.80	57	1.29	1.62	NS	**
	8 aug	M, cm	Blad	lengte blad 1	40.93	36.30	89	24.13	59	2.40	2.82	**	**
	8 aug	M, cm		lengte blad 2	41.00	37.50	91	26.35	64	2.40	2.82	**	**
10	8 aug	M, cm		breedte blad 1	37.60	31.60	84	20.00	53	2.34	2.76	**	**
	8 aug	M, cm		breedte blad 2	38.40	33.23	87	21.83	57	2.34	2.76	**	**
	8 aug	B		ratio lengte / breedte	1.08	1.14	106	1.21	112	0.023	0.029	**	**
5	8 aug	B, cm2		bladschijfgrootte blad 1	771.45	577.56	75	242.61	31	73.00	85.97	**	**
	8 aug	B, cm2		bladschijfgrootte blad 2	788.64	623.82	79	288.42	37	73.00	85.97	**	**
	29 aug	M, cm		lengte	45.65	41.50	91	32.75	72	1.92	2.42	**	**
	29 aug	M, cm		breedte	40.10	35.00	87	27.25	68	1.43	1.80	**	**
	9 aug	V		houding	3.4	4.5	-	7.3	-	0.47	0.59	**	**
6	9 aug	V		intensiteit groene kleur	4.5	6.5	-	7.6	-	0.46	0.57	**	**
7	9 aug	V		bolling	5.5	7.5	-	7.2	-	0.46	0.58	**	NS
	8 sept	V		brosheid	5.0	8.0	-	7.0	-				
	18 aug	M, cm	Bloem	lengte kroonblad 1	4.18	3.34	80	3.04	73	0.33	0.39	**	NS
	18 aug	M, cm		lengte kroonblad 2	4.11	3.38	82	2.95	72	0.33	0.39	**	**
	18 aug	M, cm		breedte kroonblad 1	2.77	2.09	75	1.75	63	0.24	0.29	**	**
	18 aug	M, cm		breedte kroonblad 2	2.85	2.11	74	1.77	62	0.24	0.29	**	**
	18 aug	B		ratio lengte / breedte kroonblad	1.45	1.62	112	1.70	117				
	29 aug	M, gr	Vrucht	gewicht	372.88	255.50	95	299.58	80			NS	**
19	29 aug	M, cm		lengte	30.95	27.65	89	25.00	81			**	**

TABEL 2.

CBP code	Soort Waarn.	Kenmerk		Planttype			
				Normaal (Lang)	Kort	Augurk	Compact Overlap
2	V	Plant	groeikracht	6	5-6	4-5	3
3	V		lengte stam bij 15 internodiën	7	4-5	3-5	3
	V		lengte zijscheut	7	1-7	1-6	3
	V		aantal internodiën zijscheut	7	1-7	1-6	3
	V						
	V	Blad	lengte lob-punt	7	4-6	4-5	3
10	V		breedte	5-7	4-6	4-5	3
5	V		grootte bladschijf	7	4-6	4-5	3
	V		lengte bladsteel-punt	7	4-6	4-5	3
	V		brosheid	5	5	6	7
	V		houding	3	3-5	4-7	7
6	V		intensiteit groene kleur	3-5	3-5	4-6	9
7	V		bolling	3-5	3-5	3-6	7
	V	Bloem	lengte kroonblad	7	4-6	3-5	3
	V		breedte kroonblad	7	4-6	3-5	3
	V	Vrucht	gewicht	7	1-3	1-2	3
19	V		lengte	7	1-2	1-2	3
			Voorbeeldrassen	Sabrina	Alamir	Capra	
				Korinda	Turbulence	Delphina	

CONCLUSIES

- 5 1. Een komkommerplant, welke plant in het genoom het compactgen bevat
waardoor, als gevolg van de expressie van dit compactgen, deze plant van het
gangbare komkommerplanttype verschilt door de combinatie van de volgende
fenotypische kenmerken: kortere zijscheut, kortere internodiën, kleiner blad,
kleinere bloemen en kortere vruchten.
- 10 2. De plant van conclusie 1, waarin de expressie van het compactgen
gekaracteriseerd is door de volgende eigenschappen in planten homozygoot voor
het compactgen: a) de bladschijfgrootte van het tiende echte blad van planten met
het compactgen op 39 dagen na zaai is hoogstens 50 % van de bladschijfgrootte
15 van planten van het gangbare komkommerplanttype op 39 dagen na zaai, en b) de
grootste breedte van de kroonbladeren op 39 dagen na zaai van planten met het
compactgen is hoogstens 75 % van de grootste breedte van de kroonbladeren van
planten van het gangbare komkommerplanttype op 39 dagen na zaai, en c) de
lengte van de zijscheut op 56 dagen na zaai van planten met het compactgen is
20 hoogstens 60 % van de lengte van de zijscheut op 56 dagen na zaai bij planten
van het gangbare komkommerplanttype, en d) het aantal internodiën op de
zijscheut op 56 dagen na zaai van planten met het compactgen is hoogstens 70 %
van het aantal internodiën op de zijscheut op 56 dagen na zaai bij planten van het
gangbare komkommerplanttype.
- 25 3. De plant van een van de vorige conclusies, waardoor, als gevolg van de expressie
van het compactgen, deze plant van het gangbare komkommerplanttype verschilt
door de combinatie van de volgende fenotypische kenmerken: tragere groei,
kortere zijscheuten, kortere internodiën, kleiner blad, horizontaler blad, donkerder
groen blad, brosser blad, kleinere bloem en kortere, lichtere vruchten.

4. De plant van een van de vorige conclusies, waarin de fenotypische kenmerken van het compactgen monogeen, intermediair overerven en het sterkst tot uiting komen in het fenotype als het compactgen in homozygote toestand is.
- 5 5. De plant van een van de vorige conclusies die het compactgen bevat, waarbij de planten van het gangbare komkommertype waarmee deze planten vergeleken worden deze ongeveer 25 % van de planten zijn zonder compacte groei in een 1:2:1 uitsplitsende populatie na zelfbevruchting van een plant heterozygoot voor het compactgen, of deze ongeveer 50 % van de planten zonder compacte groei
10 bekomen na verdubbelde haploide productie van een plant heterozygoot voor het compactgen.
6. De plant van conclusie 5 waarbij waarbij de planten van het gangbare komkommertype planten van het ras Korinda of Sabrina zijn.
15
7. De plant van een van de vorige conclusies die behoort tot het type lange komkommer.
8. De plant van een van de vorige conclusies, waarbij, als gevolg van de
20 heterozygote aanwezigheid van het compactgen, de nateelt bij zelfbevruchting een uitsplitsende populatie oplevert waarin, in de verhouding van ongeveer 1:2:1 planten van het gangbare lange komkommertype, planten van het heterozygote, intermediaire type en compact groeiende planten die homozygoot zijn voor het compactgen voorkomen; of die plant die uitsplitst in ongeveer 50 % planten van
25 het gangbare komkommertype en ongeveer 50 % compact groeiende planten die homozygoot zijn voor het compactgen na verdubbelde haploiden productie van de plant heterozygoot voor het compactgen.
9. De plant van een van de vorige conclusies, waarin de aanwezigheid van het
30 compactgen kan worden aangetoond door deze plant te kruisen met planten van het gewas augurk of korte komkommer, en de F1- planten voortkomende uit deze

5 kruising te analyseren met behulp van de AFLP methode en het gebruik van tenminste één van de merkers E14/M61_M873.6, E19/M50_M280.2, E24/M49_M211.5, E17/M54_M179.0, E16/M47_M426.1, E16/M47_M411.0, of E16/M47_M402.9, of ervan afgeleide merkers die het compactgen flankeren, en waarbij er in de uitsplitsende F2 populatie van die zelfbevruchte F1-planten waarin het compactgen is aangetoond, een cosegregatie is van de compacteigenschappen met tenminste een van deze AFLP merkers.

10. De plant van conclusie 9, waarin AFLP merkers E14/M61_M873.6 en E19/M50_M280.2, of ervan afgeleide merkers, het compactgen flankeren in een kruising met korte komkommer.

11. De plant van een van de vorige conclusies, waarbij deze plant afleidbaar is van de zaden gedeponeerd onder depotnummer NCIMB 41266.

12. De plant van een van de vorige conclusies, waarbij het compactgen dat gen is dat geflankeerd is door de AFLP merkers E14/M61_M873.6 en E19/M50_M280.2 in een kruising van de planten gegroeid uit de zaden van depotnummer NCIMB 41266 met korte komkommer of augurk.

13. De plant van conclusie 10 of 12 waarin de kruising is met korte komkommer Manar F1.

14. Zaden, cellen of weefsels van de plant van een van de vorige conclusies, welke het compactgen bevatten in hun genoom.

15. De planten opgekweekt uit de zaden, cellen of weefsels van conclusie 14.

16. Een methode om een plant van een van conclusies 1 tot 13 te kruisen met andere komkommerplanten met het oogmerk het compactgen in te kruisen in een andere plant van de soort *Cucumis sativus*, waarbij selectie gedaan wordt door tenminste

een polymorfe ALFP merker die het compactgen flankeert in een kruising met korte komkommer of augurk.

17. De methode van conclusie 16, waarbij de AFLP merkers gekozen zijn uit:
E14/M61_M873.6, E19/M50_M280.2, E24/M49_M211.5, E17/M54_M179.0,
E16/M47_M426.1, E16/M47_M411.0, of E16/M47_M402.9, of ervan afgeleide
merkers.

18. De plant van een van conclusies 1 tot 13 die een hybride plant is.

19. Een methode om van een plant van een van de conclusies 1 tot 13, zaad van
hybride planten te produceren, in welke hybriden het compactgen heterozygoot
aanwezig is, welke methode gebruik maakt van *in vitro* celcultuur.

20. De cellen, vruchten of zaden van de hybride plant van conclusie 18, die het
compactgen bevatten.

21. Een methode om met behulp van tenminste een van de AFLP merkers
E14/M61_M873.6, E19/M50_M280.2, E24/M49_M211.5, E17/M54_M179.0,
E16/M47_M426.1, E16/M47_M411.0, of E16/M47_M402.9, of ervan afgeleide
merkers, de aanwezigheid van het compactgen in planten, vruchten, zaden,
plantweefsel of plantencellen te volgen in verschillende stadia van een
veredelingsproces voor komkommer.

22. Een methode om met behulp van tenminste een van de AFLP merkers
E14/M61_M873.6, E19/M50_M280.2, E24/M49_M211.5, E17/M54_M179.0,
E16/M47_M426.1, E16/M47_M411.0, of E16/M47_M402.9, of ervan afgeleide
merkers, de aanwezigheid van het compactgen in biologisch materiaal afgeleid
van planten, zaden, cellen of weefsel van komkommer te volgen.

23. Een methode voor het oogsten van komkommervruchten, gebruik makende van een oogstrobot, waarin de komkommervruchten groeien op de planten van een van de conclusies 1 tot 13.

5 24. Een technische methode voor het groeien van komkommerplanten in een hogedraadteelt op een minder arbeidsintensieve manier, waarbij de komkommerplanten de planten van een van de conclusies 1 tot 13 zijn.

10 25. De methode van conclusie 24, waarbij minstens 20 % meer stengels per m² aangehouden worden dan in de teelt van het gangbare komkommertype.

6018565NLSQL.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Nunhems BV
<120> Nieuwe komkommerplanten met compacte groeiwijze
<130> BCS 05-2006
<160> 18
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer E17
<400> 1
gactgcgtac caattccg 18

<210> 2
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer E24
<400> 2
gactgcgtac caattctc 18

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer E14
<400> 3
gactgcgtac caattcat 18

<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer E19
<400> 4
gactgcgtac caattcga 18

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer E16
<400> 5

	6018565NLSQL.txt	18
gactgcgtac caattccc		
<210>	6	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer M54	
<400>	6	19
gatgagtcct gagtaacct		
<210>	7	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer M49	
<400>	7	19
gatgagtcct gagtaacag		
<210>	8	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer M61	
<400>	8	19
gatgagtcct gagtaactg		
<210>	9	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer M50	
<400>	9	19
gatgagtcct gagtaacat		
<210>	10	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer M47	
<400>	10	19
gatgagtcct gagtaacaa		
<210>	11	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		

<223> MAS4-f primer

<400> 11
gcatgcatgg actgacttac taga 24

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> MAS4-r primer

<400> 12
ggagactcac atatctttct gacaca 26

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> MAS4 - VIC probe

<400> 13
ctaactgcaa aaacaatgt 19

<210> 14
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> MAS4 - FAM probe

<400> 14
aactgcaaaa gcaatgt 17

<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> MAS37-f primer

<400> 15
aggatcacct gatgttcaag gagta 25

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> MAS37-r primer

<400> 16
cgatgatata gttggaagga tgga 24

<210> 17
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> MAS37 - VIC probe

<400> 17

tatggacgac tttcatgtag

20

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> MAS37 - FAM probe

<400> 18

tggacgactt tgatgtag

18

Fig 1

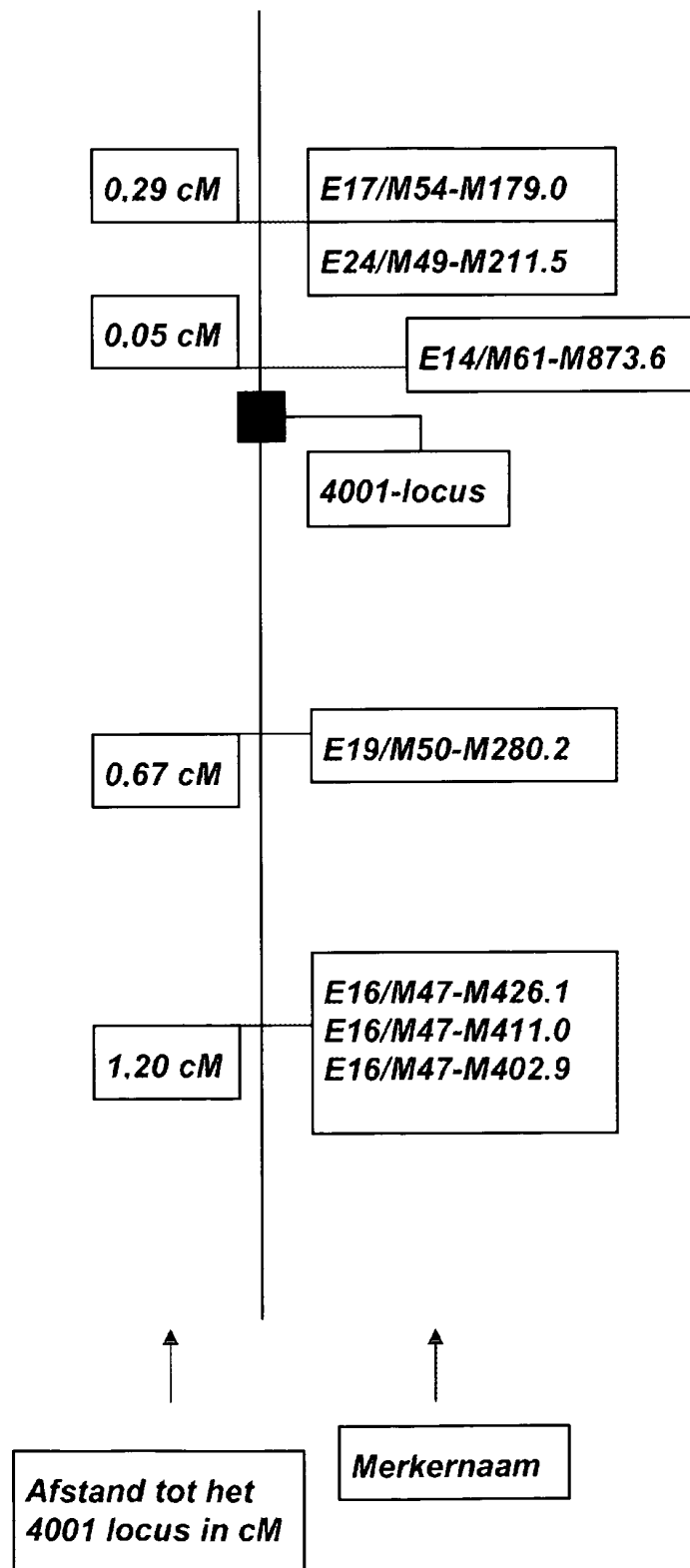


Fig 2a

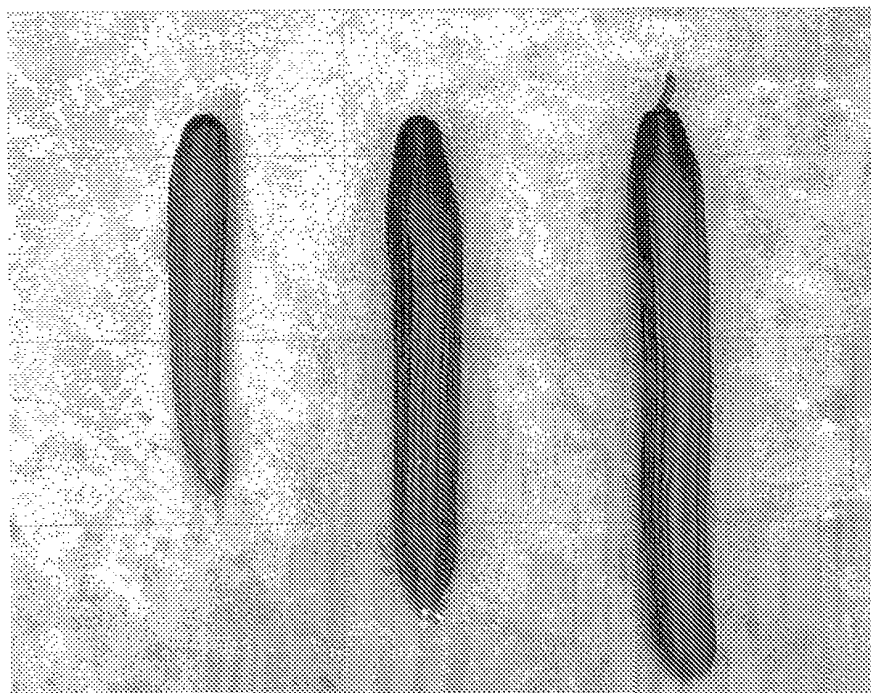
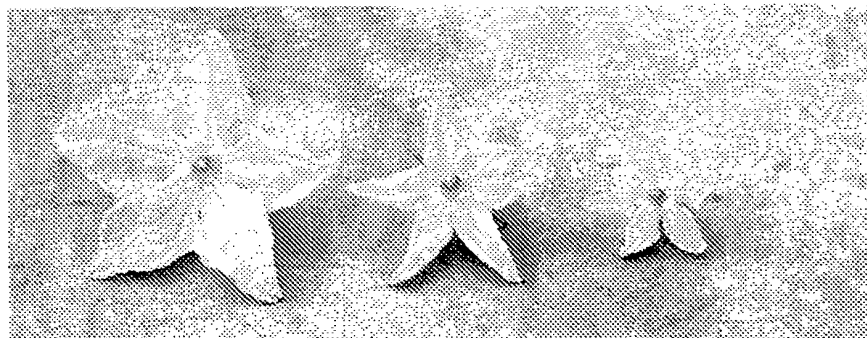


Fig 2b



Fig 2c



SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)

RAPPORT BETREFFENDE NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFICATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE		KENMERK VAN DE AANVRAGER OF VAN DE GEMACHTIGDE	
		P6018565NL	
Nederlands aanvraag nr.		Indieningsdatum	
2000992		09-11-2007	
		Ingeroepen voorrangsdatum	
Aanvrager (Naam)			
Nunhems B.V.			
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type		Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr.	
21-12-2007		SN 49616	
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)			
Volgens de internationale classificatie (IPC)			
A1H5/00		C12Q1/68	
II. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK			
Onderzochte minimumdocumentatie			
Classificatiesysteem		Classificatiesymbolen	
IPC 8	A01H	C12Q	
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen			
III.	☐	GEEN ONDERZOEK MOGELIJK VOOR BEPAALDE CONCLUSIES (opmerkingen op aanvullingsblad)	
IV.	☐	GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING (opmerkingen op aanvullingsblad)	

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek
NL 2000992

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
INV. A01H5/00 C12Q1/68

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

B. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)

A01H C12Q

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, Sequence Search

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie *	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	XIE, J. AND WEHNER, T.C.: "Gene list 2001 for cucumber" CUCURBIT GENET. COOP. RPT., deel 24, 2001, bladzijden 110-136, XP002483417	1-15,18, 20,23-25
Y	see genes cp and cp-2 standing for the "compact"-phenotype of shortened internodes; which were published in Kubicki et al, 1986b and Kauffman & Lower, 1976	23
X	----- KAUFFMAN, CS.S & LOWER, R.L.: "inheritance of an extreme dwarf plant type in cucumber" J.AMER.SOC.HORT.SCI., deel 101, 1976, bladzijden 150-151, XP008092423 het gehele document -----	1-15,18, 20,23-25
-/--		

☒ 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" niet tot de categorie X of Y behorende literatuur die de stand van de techniek beschrijft

"D" in de octrooiaanvraag vermeld

"E" eerdere octrooi(aanvraag), gepubliceerd op of na de indieningsdatum, waarin dezelfde uitvinding wordt beschreven

"L" om andere redenen vermelde literatuur

"O" niet-schriftelijke stand van de techniek

"P" tussen de voorrangsdatum en de indieningsdatum gepubliceerde literatuur

"T" na de indieningsdatum of de voorrangsdatum gepubliceerde literatuur die niet bezwarend is voor de octrooiaanvraag, maar wordt vermeld ter verheldering van de theorie of het principe dat ten grondslag ligt aan de uitvinding

"X" de conclusie wordt als niet nieuw of niet inventief beschouwd ten opzichte van deze literatuur

"Y" de conclusie wordt als niet inventief beschouwd ten opzichte van de combinatie van deze literatuur met andere geciteerde literatuur van dezelfde categorie, waarbij de combinatie voor de vakman voor de hand liggend wordt geacht

"&" lid van dezelfde octrooifamilie of overeenkomstige octrooipublicatie

Datum waarop het onderzoek naar de stand van de techniek van internationaal type werd voltooid

9 Juni 2008

Verzenddatum van het rapport van het onderzoek naar de stand van de techniek 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

Holtorf, Sönke

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek
NL 2000992

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie *	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	KUBICKI, B. U., ET AL.: "induced mutations in cucumber (Cucumis sativus L.) V. Compact type of growth" GENETICA POLONIA, deel 27, 1986, bladzijden 289-298, XP008092424 het gehele document	1-15,18, 20,23-25
Y	----- DATABASE WPI week 200137 Thomson Scientific, London, GB; AN 2001-348967 XP002483419 & JP 2001 095348 A (KYUSHU ELECTRIC POWER CO LTD) 10 april 2001 (2001-04-10) samenvatting	23
A	----- DE LINT P J A L ET AL: "NIGHT TEMPERATURE AND NUMBER OF NODES AND FLOWERING OF THE MAIN STEM OF GLASSHOUSE CUCUMBER CUCUMIS-SATIVUS" NETHERLANDS JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE, deel 30, nr. 3, 1982, bladzijden 149-160, XP008092421 ISSN: 0028-2928 het gehele document	
A	----- DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 28 juni 2002 (2002-06-28), XIONG JINQIAO ET AL: "Effect of DIF and end-of-day light quality on stem elongation in Cucumis sativus" XP002483418 Database accession no. PREV200200428501 samenvatting -----	

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek

NL 2000992

In het rapport genoemd octrooigeschrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
JP 2001095348	A	10-04-2001	GEEN



OCTROOICENTRUM NEDERLAND

WRITTEN OPINION

File No. SN49616	Filing date (day/month/year) 09.11.2007	Priority date (day/month/year)	Application No. NL2000992
International Patent Classification (IPC) INV. A01H5/00 C12Q1/68			
Applicant Nunhems B.V. te Nunhem			

This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the application

	Examiner Holtorf, Sönke
--	----------------------------

WRITTEN OPINION

Application number

NL2000992

Box No. I Basis of this opinion

1. This opinion has been established on the basis of the latest set of claims filed before the start of the search.
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☒ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the application as filed.
 - ☐ filed together with the application in electronic form.
 - ☒ furnished subsequently for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

Box No. V Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty	Yes: Claims	16,17,19,21-23
	No: Claims	1-15,18,20,23-25
Inventive step	Yes: Claims	
	No: Claims	1-25
Industrial applicability	Yes: Claims	1-25
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

1. The following documents are considered relevant for the current application:

D1: XIE, J. AND WEHNER, T.C., CUCURBIT GENET. COOP. RPT., 2001
D2: KUBICKI, B. U., ET AL., GENETICA POLONIA, 1986
D3: KAUFFMAN, CS.S & LOWER, R.L., J.AMER.SOC.HORT.SCI., 1976
D4: DE LINT P J A L ET AL., NETHERLANDS JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE, 1982
D5: XIONG JINQIAO ET AL, SCIENTIA HORTICULTURAE (AMSTERDAM), 2002
D6: JP2001095348

Re Item V.

2. Novelty and Clarity (Art. 33(2) and Art. 6 PCT)

2.1 The current application is dealing with the provision of a spontaneous mutant cucumber plant which exhibit a more "compact" stature/morphology/phenotype.

The modification of the cucumber genome results in more "compact" plants that 1) have an enhanced number of fruits and 2) that do not need intense work input which allows to a higher density of plants per square meter.

The plants are best suited for the "hoogdraadtelt" because of their compact and also "more open" plant-type. The plants have shorter internodes.

Other characteristics that contribute to the combination of interesting traits brought about by the "compact-gene" are :

- smaller, darker leaves that stay longer green
- smaller flowers
- shorter fruits
- grow more slowly
- shorter branches

The leaf , however, is more brittle than the usual leaves and breaks more easily at the nerves, but broken leaves remain green and healthy in contrast to ordinary leaves, leaves grow more horizontal and not at an angle.

Plants with shorter internodes and less branching allow for a qualitatively better fruit set on the stem only.

Shorter, more compact plants can also be more easily harvested by a harvest-robot. Heterozygotes of the current application allow 20% more stems per m² than the ordinary plants in "hoogdraadtelt".

Plants that are heterozygous for the genetic disposition do show the desired effects. If the cucumber plant is crossed to related cucumbers, the F1-hybrids can be analyzed by AFLP analysis to contain a certain number of identified markers which flank said gene.

The Examples explain that the plant "4001" was discovered by accident during the culture of F1-hybrid plants in the greenhouse.

Double haploids and inbred breeding lines were tested with 256 markers. No marker was closely linked to the locus in the "long cucumber" background. The locus was therefore introduced into another background,

2.2 Current claim 1 is directed to a cucumber plant that is defined by a not further identified "compact-gene" and a multitude of phenotypic traits that are generated by the expression of said "compact-gene".

Said traits are all defined by relative terms like "shorter internodes", "smaller flowers" etc. which depend on the reference plant used for comparison. See also the relative adjectives used in current claim 3 (tragere, horizontaler, donkerder, brosser).

Moreover, some - if not all - traits are influenced by the developmental stage of the plant and also heavily influenced by the growing conditions.

D4 and D5 teach that the cucumber internode length is influenced by the temperature regime of the greenhouse and are thus influenced by the growing conditions.

Furthermore, wordings like "the usual cucumber plant type" (gangbare komkommerplanttype, claim 1 and others), "wherein the phenotypic traits are strongest expressed" (het sterkst tot uiting komen, claim 4), "about 25% of the plants are without compact growth" (ongeveer 25% van de planten zijn zonder compacte groei, claim 5), "het type lange komkommer" (type long cucumber, claim 7), "derived markers which flank the compact-gene" (afgeleide merkers die het

compactgen flankeren, claims 9, 10), "seeds, cells and tissues of the plant of one of the previous claims which comprise the compact-gene in their genome"(see claim 14), "een hogedraadteelt" (see claim 24) render the subject matter of said claims unclear and open to the broadest interpretation.

Plants that comprise said "compact-gene" could also represent transgenic plants transformed with a chimeric expression cassette comprising any endogenous or heterologous gene that has an influence on the expression of said traits in plants. Based on the broad definition of such traits with relative terms, it appears that such plants as defined in claims 1-15,18,20 already exist in the prior art.

2.3 In any case, documents D1-D3 already disclose cucumber plants which exhibit a "compact" phenotype. The fact that not every single phenotypic trait has been disclosed in D1-D3 does not mean that plants of D1-D3 are not identical to the plant as disclosed in the current specification.

D1 teaches the existence of a cucumber cp-mutant plant which exhibit a compact phenotype which comprises reduced internode length and small flowers. Another cp-2 mutant is also disclosed. The respective references are D2 and D3.

D2 is disclosing a mutation of the cucumber growth type which was generated by ethylene imine mutagenesis. The plants show fourfold shorter internodes and as a consequence exhibit a compact habit with a rosette-like arrangement of the leaves in the shoot apices (compare "horizontal leaves of the current cucumber mutant). Plants with intermediate type of growth are presented (see Fig.5).

D3 is disclosing an extreme dwarf plant type in cucumber originating from the presence of the cp gene.

D3 also mentions that such dwarf plants are of interest for horticulturists because they allow for mechanical harvest.

In the absence of any stringent definition of the compact cucumber plant of the current application which makes it possible to distinguish it from the plants as disclosed in D1-D3, the subject matter of claims 1-15,18,20 is lacking novelty over D1-D3 according to Art. 33(2) PCT.

3. Inventive Step (Art.33 (3) PCT)

3.1 D2 (Kubicki et al, 1986) which is the closest prior art is disclosing a mutated cucumber plant which shows fourfold shorter internodes and as a consequence exhibit a compact habit with a rosette-like arrangement of the leaves in the shoot apices.

The difference between D2 and the current application is the provision of a set of AFLP-markers which are flanking said "compact-gene".

The problem is the provision of molecular markers of the cucumber "compact-gene" to further characterize the "compact-gene" locus.

The solution is the identification of the markers as identified in Figure 1 of the current application.

3.2 The prior art already discloses the identification of a compact cucumber gene and also describes that associated phenotype, see D1-D3.

Moreover, general laboratory techniques are available in the prior art that disclose the development of primers as markers to fine-map an already identified genetic determinant.

3.3 Consequently, the identification of molecular markers for a given cucumber gene locus and the application of the same in methods to identify cucumber plants that carry said "compact-gene" is obvious to the skilled artisan.

Moreover, D3 already mentions that such dwarf plants are of interest for horticulturists because they allow for mechanical harvest.

Document D6 (JP2001095348) is disclosing such a robot that could be used to mechanically harvest cucumbers.

3.4 The subject matter of current claims 1-25 is therefore not inventive over the prior art pursuant to Art.33 (3) PCT.

4. Essentially biological processes (Rule 67.1 (ii) PCT)

4.1 The subject matter of current claim 16 is directed to a method to cross a plant of claims 1-13 with another cucumber plant, the method comprises the use/application of AFLP markers for selection purposes.

The method is therefore actually representing a method for the crossing and selection of plants.

As currently drafted, said methods are representing an essentially biological process for the production of plants and is therefore characterizing subject matter which falls under Rule 67.1 (ii) PCT. The same applies for the obtained plants as characterized in claim 18 which originate from said methods.

The method of claim 16 consists essentially of natural phenomena such as crossing and selection, such methods are used by the ordinary breeder to obtain novel plants with improved characteristics/traits. The essence of claim 16 is non-technical.

Even if technical steps are introduced that relate to the selection of a specific set of plants by using PCR and specific primers, said claim would still relate to an essentially biological process in the sense of Rule 67.1 (ii) PCT.

The necessity for trivial human intervention does prevent a process from being purely biological but does not prevent a process being essentially biological. Processes may therefore be essentially biological without being purely biological.

The same objection also applies to the subject matter of claims 17 and 19.