

(19)



Octrooi Centrum
Nederland

(11) 2000622

(12) C OCTROOI²⁰

(21) Aanvraag om octrooi: 2000622

(51) Int.Cl.:
A01H5/00 (2006.01) C12Q1/68 (2006.01)

(22) Ingediend: 01.05.2007

(41) Ingeschreven:
04.11.2008 I.E. 2009/01

(47) Dagtekening:
04.11.2008

(45) Uitgegeven:
05.01.2009 I.E. 2009/01

(73) Octrooihouder(s):
Bejo Zaden B.V. te Warmenhuizen.

(72) Uitvinder(s):
Jan de Geus te Oudkarspel.
Albertus Johannes Maria Schrijver te
Warmenhuizen.
Johannes Gerardus Maria Hoogland te
Hoorn.
Adriana Dorien Postma-Haarsma te
Middenmeer.
Hendrikus Stephanus Maria Huits te
Heerhugowaard.

(74) Gemachtigde:
Ir. A.A.G. Land c.s. te 2502 EN Den Haag.

(54) **Brassica oleracea planten met een resistentie tegen albugo candida.**

(57) De onderhavige uitvinding heeft betrekking op Brassica oleracea planten met een resistentie tegen Albugo candida, de veroorzaker van witte roest. De uitvinding heeft tevens betrekking op een werkwijze voor het verschaffen van een B. plant met een resistentie tegen A. candida, omvattende (a) het verschaffen van een eerste B. oleracea plant, welke een resistentie tegen A. candida omvat; (b) het kruisen van de resistente plant met een vatbare tweede B. oleracea plant; (c) het uit de nakomelingen isoleren van genomisch DNA voor het detecteren van de aanwezigheid van een introgressie met het resistentie tegen met behulp van één of meer specifieke aan het resistentie tegen gekoppelde DNA merkers; en (d) het uit de nakomelingen selecteren van een B. oleracea plant, waarin de aanwezigheid van de introgressie met het resistentie tegen in stap (c) is aangetoond.

NL C 2000622

De inhoud van dit octrooi komt overeen met de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).
Octrooi Centrum Nederland is een agentschap van het ministerie van Economische Zaken.

BRASSICA OLERACEA PLANTEN MET EEN RESISTENTIE TEGEN ALBUGO CANDIDA

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op
5 Brassica oleracea planten, welke resistent zijn tegen Albugo candida, de veroorzaker van witte roest. De uitvinding betreft tevens de zaden, vruchten en/of andere plantdelen afkomstig van deze resistente planten. De onderhavige uitvinding heeft verder betrekking op een werkwijze voor het
10 verschaffen van B. oleracea planten welke resistent zijn tegen A. candida. De uitvinding heeft tevens betrekking op het gebruik van specifieke DNA-merkers welke zijn gekoppeld aan het resistentiegen tegen A. candida voor het identificeren van resistente B. oleracea planten.

15 Witte roest (A. candida; synoniemen: A. cruciferum, A. cruciferatum, white rust, white blister, staghead) is een plantenziekte die veel problemen veroorzaakt in groentegewassen van kool, maar ook in verwante soorten zoals koolzaad, mosterd en radijs. De ziekte kan in principe
20 voorkomen op alle kruisbloemigen, dus ook op wilde soorten zoals herderstasje (Capsella bursa-pastoris) en herik (Sinapis arvensis). In tegenstelling tot wat de naam suggereert gaat het hier niet om een roestschimmel maar om een oömyceet die nauw verwant is aan valse meeldauw
25 (Peronospora parasitica) en Phytophthora. Oömyceten zijn geen schimmels maar, hoewel ze ook in draden groeien, meer verwant aan algen.

De oömyceet veroorzaakt blaasjes met sporen (sori, pustules) op de bladeren, stengels en vruchtbeginsels
30 (hauwen) van Brassica planten. Vaak zijn er ook vergroeiingen in de vorm van pukkels/uitwassen aanwezig. Systemische infectie van planten leidt tot abnormale groei, misvormingen en soms steriliteit van de bloemen of bloeiwijze. De oömyceet gedijt het best bij temperaturen tussen 10 en 20 °C en onder
35 vochtige omstandigheden. Een bladnatperiode van 2,5 uur is voldoende om tot infectie te leiden, waarbij een

incubatietijd van 10 tot 14 dagen geldt. Vochtige weersomstandigheden met gematigde temperaturen zijn dus ideaal voor infectie en verspreiding van de oömyceet.

Als sporen van A. candida op een koolblad terecht
 5 komen vormen ze een kiembuis waarmee ze het blad indringen. Daar groeit het mycelium intercellulair en neemt voedsel op via haustoria. De vegetatieve sporenvorming vindt plaats in het zoösporangium dat zich onder de epidermis ontwikkelt. Hierin ontstaan de ongeslachtelijke zoösporen, die bij
 10 voldoende vocht vrijkomen uit de zoösporangia en vervolgens nieuwe infecties kunnen veroorzaken. De sporen hebben twee zweepstaarten (flagellen), één voor de voortbeweging en één voor de zwemrichting.

A. candida kan in de grond overwinteren in
 15 geslachtelijke vorm met dikwandige oösporen, al dan niet op aangetaste plantenresten, of in ongeslachtelijke vorm (mycelium) op winterharde waardplanten. Bij zachte winters gaat de oömyceet niet echt in rust maar blijft op een lager niveau actief. In het voorjaar kunnen nieuwe planten
 20 geïnfecteerd worden. Plantmateriaal kan ook al besmet worden op het plantbed zonder dat er symptomen zichtbaar worden. Verspreiding van de oömyceet vindt plaats doordat sporangia meegenomen worden door luchtbewegingen, harde regen, beregening, werktuigen, landarbeiders en insecten, waardoor
 25 andere planten worden geïnfecteerd.

Gastheerspecialisatie bij A. candida is bekend en er worden verschillende fysio's en formae specialis onderscheiden op basis van de soort of de lijn die aangetast wordt en de agressiviteit van het isolaat op de lijn.

30 Brassica is een plantengeslacht in de familie Brassicaceae (vroeger Cruciferae genoemd). De leden van dit geslacht worden als kool of mosterd betiteld. Het geslacht Brassica omvat een aantal belangrijke land- en tuinbouwgewassen, waaronder koolzaad, bloemkool, rode kool,

savooienkool, witte kool, spitskool, boerenkool, broccoli, spruitkool, Chinese kool, koolrabi en Portugese kool (trouchuda). Vrijwel alle delen van de planten worden als voedsel gebruikt, zoals de wortels (koolraap), stengels (koolrabi), bladeren (witte kool), okselknoppen (spruitjes), bloemen (bloemkool, broccoli) en de zaden (koolzaad). Koolzaad en raapzaad worden ook gebruikt voor olie, zowel voor consumptie als voor brandstof. Verder worden sommige soorten met witte of paarse bloemen of aparte bladkleur of -

10 vorm voor de sier geteeld. De Brassica familie komt wereldwijd voor en bestaat uit zowel éénjarige, tweejarige, als overblijvende planten. De familie bevat ook een groot aantal wilde soorten.

Op dit moment zijn er weinig middelen bekend die

15 gebruikt kunnen worden ter bestrijding van witte roest in Brassica. Bovendien hebben steeds meer landen in Europa een beleid dat is gericht op reductie van het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen. Als er helemaal geen bestrijdingsmiddelen meer gebruikt mogen worden kan dit tot

20 grote problemen leiden bij het telen van Brassica soorten. In gewassen als bijvoorbeeld Brassica rapa (syn. campestris) (turnip rape), Brassica juncea (mosterd) en Brassica napus (koolzaad) kan witte roest grote opbrengstverliezen veroorzaken (Bernier, Can. Plant Dis. Surv. 52: 108, 1972;

25 Fan et al., Can. J. Genet. Cytol. 25: 420-424, 1983); Harper and Pittman, Phytopathology 64: 408-410, 1974; Varshney et al., Theoretical and Applied Genetics 109: 153-159, 2004). Bij de groentegewassen is vooral het kwaliteitsaspect van belang. Groentes zoals spruiten, sluitkool en boerenkool die

30 zijn aangetast door witte roest zijn vanwege de cosmetische schade niet meer te verkopen. Er is dus een grote behoefte aan witte roest resistente Brassica groentegewassen.

Resistentie tegen witte roest is beschreven in diverse Brassica soorten zoals B. rapa, B. napus en B. juncea

(Ebrahimi et al., Proc. Am. Phytopathol. Soc. 3: 273, 1976; Delwiche en Williams, Proc. Am. Phytopathol. Soc. 1: 66, 1974; Tiwari et al., Can. J. Of Plant Science 68: 297-300, 1988; Kole et al., Genome 45: 22-27, 2002; Varshney et al.,
5 Theoretical and Applied Genetics 109: 153-159, 2004; Tanhuanpää, Theoretical and Applied Genetics 108: 1039-1046, 2004). Daarnaast is ook partiële resistentie aangetoond in B. oleracea lijnen (Santos en Dias, Genetic Resources and Crop Evolution 51: 713-722, 2004). Volledige resistentie tegen
10 witte roest in B. oleracea groentegewassen is echter nog niet eerder beschreven.

Het doel van onderhavige uitvinding is het verschaffen van een B. oleracea plant met een resistentie tegen A. candida, de veroorzaker van witte roest.

15 Hiertoe verschaft de uitvinding een B. oleracea plant, welke een resistentie tegen A. candida omvat.

Het resistentie volgens de uitvinding verschaft een monogene en dominante resistentie tegen A. candida. Bij voorkeur is het resistentie in heterozygote vorm aanwezig,
20 meer bij voorkeur is het resistentie in homozygote vorm aanwezig.

Het resistentie tegen A. candida is volgens de uitvinding bij voorkeur afkomstig uit de B. oleracea plant, waarvan de zaden zijn gedeponeerd bij de American Type
25 Culture Collection (ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, Verenigde Staten van Amerika) op 1 maart 2006 onder nummer PTA 74-12. Verrassenderwijs is gevonden dat met het resistentie volgens de uitvinding een dominante resistentie wordt verschaft tegen A. candida.

30 Voor het verkrijgen van een volledige resistentie tegen A. candida in B. oleracea wordt in deze uitvinding de overdracht beschreven van een dominante, monogene resistentie tegen A. candida, vanuit een eerste B. oleracea bron naar

verschillende andere B. oleracea typen zoals witte kool, spruitkool, bloemkool en koolrabi.

Met behulp van een ziekte-toets voor witte roest resistentie werden B. oleracea lijnen gescreend en werd een witte roest resistentie-bron geïdentificeerd. Vervolgens werd de resistentie vanuit de bron overgebracht naar bestaande kwaliteitslijnen door middel van herhaalde terugkruisingen, in sommige gevallen wel 4 tot 6 keer, gevolgd door meerdere generaties van zelfbestuivingen. Hierbij werd elke keer een ziekte-toets uitgevoerd om de resistente planten te selecteren voor het vervolg van het terugkruisingsprogramma. Bij de beoordeling van deze ziekte-toetsen werden planten ingedeeld in de klassen resistent (geen zichtbare reactie of necrotische spots), vatbaar (veel sporulerende blaasjes) en intermediair (necrotische spots en enkele sporulerende blaasjes). Uit de gevonden splitsingsverhoudingen tijdens het terugkruisingsprogramma bleek dat de resistentie een monogene dominante eigenschap was. Echter in veel genetische achtergronden werd een tekort aan resistente planten gevonden en daarnaast een grote variatie in aantallen in de intermediaire klasse (van enkele planten tot de halve populatie). De penetratie van dit gen was dus in die genetische achtergronden zeer onvolledig en hierdoor werd het veredelingsprogramma sterk gehinderd.

In een verdere voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding is het resistentiegen gekoppeld aan één of meer specifieke DNA-merkers. Om de resistentie beter te kunnen volgen en sneller te kunnen overbrengen zijn volgens de onderhavige uitvinding DNA-merkers ontwikkeld die nauw gekoppeld zijn aan de introgressie met daarop het ziekteresistentiegen tegen witte roest. Deze merkers zijn ontwikkeld door middel van een BSA (Bulked Segregant Analysis). Hiertoe werden individuen van een goed (1:1) splitsende TK populatie op basis van de ziekte-toets verdeeld

in een resistente en een vatbare klasse. Van alle planten is vervolgens DNA geïsoleerd en zijn de resistente planten samengevoegd tot een resistente pool en de vatbare planten tot een vatbare pool. Op deze pools zijn vervolgens
5 merkeranalyses uitgevoerd door middel van de RAMP-techniek en zijn merkers geïdentificeerd die nauw koppelen aan de resistentie. Door middel van een analyse met de nauw gekoppelde merkers worden in populaties waar de ziekte-toets niet een éénduidig beeld geeft (veel intermediaire reacties,
10 geen goede splitsingsverhouding), toch met zekerheid de planten geselecteerd die het resistentiegen bevatten. Daarnaast worden tijdens het intelen direct de homozygoot resistente planten van de heterozygoot resistente planten onderscheiden. Dit levert een versnelling op in het
15 veredelingsprogramma.

In een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding is de aanwezigheid van de introgressie met het resistentiegen tegen A. candida aantoonbaar met behulp van ten minste twee, bij voorkeur ten minste drie, meer bij voorkeur ten minste
20 vier, meer bij voorkeur ten minste vijf, meest bij voorkeur zes aan het resistentiegen gekoppelde DNA-merkers, waarbij de DNA-merkers het resistentiegen omsluiten. Met omsluiten wordt in de onderhavige aanvraag bedoeld dat de DNA-merkers op het genoom aan beide zijden van het resistentiegen gelegen zijn,
25 dat wil zeggen, zowel "upstream" als "downstream" van het resistentiegen. Door het aantonen van de aanwezigheid van meerdere DNA-merkers, die zijn gekoppeld aan het resistentiegen en bovendien het resistentiegen omsluiten wordt verzekerd dat de introgressie met het resistentiegen
30 daadwerkelijk aanwezig is. De DNA-merkers volgens de uitvinding worden bij voorkeur gekozen uit tabel 1, waarbij de aanwezigheid van de DNA-merkers in het genoom van de plant wordt aangetoond met behulp van de primersequenties gekozen uit de groep die bestaat uit SEQ ID NO: 1 tot en met SEQ ID

NO: 7.

In het onderzoek dat heeft geleid tot de onderhavige uitvinding is aangetoond dat de betreffende DNA-merkers karakteristiek zijn voor de introgressie van de resistentie tegen A. candida. De DNA-merkers volgens de uitvinding zijn DNA-fragmenten, die zijn gekoppeld aan het betreffende resistentiegen, die een bepaalde grootte hebben (bp), zoals aangegeven in tabel 1, en kunnen worden aangetoond met behulp van specifieke primercombinaties.

De plant volgens de uitvinding wordt bij voorkeur gekozen uit de groep die bestaat uit B. oleracea convar. botrytis var. botrytis (bloemkool, romanesco), B. oleracea convar. botrytis var. cymosa (broccoli), B. oleracea convar. botrytis var. asparagoides (spruitbroccoli), B. oleracea convar. oleracea var. gemnifera (spruitkool), B. oleracea convar. capitata var. alba (witte kool, spitskool), B. oleracea convar. capitata var. rubra (rode kool), B. oleracea convar. capitata var. sabauda (savooienkool), B. oleracea convar. acephela var. sabellica (boerenkool), B. oleracea convar. acephela var. gongyloides (koolrabi) en B. oleracea var. tranchuda syn. costata (Portugese kool).

De uitvinding heeft eveneens betrekking op de zaden, vruchten en/of andere plantendelen afkomstig van de hiervoor beschreven planten. Met plantendelen worden hierbij onder andere de eetbare delen van de plant bedoeld, zoals bijvoorbeeld okselknoppen (spruitjes).

De uitvinding heeft tevens betrekking op een werkwijze voor het verkrijgen van een B. oleracea plant met een resistentie tegen A. candida, welke werkwijze ten minste de volgende stappen omvat:

- (a) het verschaffen van een eerste B. oleracea plant, welke plant een resistentiegen tegen A. candida omvat;
- (b) het kruisen van de resistente plant met een vatbare tweede B. oleracea plant;

(c) het uit de nakomelingen isoleren van genomisch DNA voor het detecteren van de aanwezigheid van een introgressie met het resistentiegen met behulp van één of meer specifieke aan het resistentiegen gekoppelde DNA
5 merkers; en

(d) het uit de nakomelingen selecteren van een B. oleracea plant, waarin de aanwezigheid van de introgressie met het resistentiegen in stap (c) is aangetoond.

Met de werkwijze volgens de uitvinding kunnen op een
10 snelle en eenvoudige wijze resistente B. oleracea planten worden verschaft, door gebruik te maken van DNA-merkers die specifiek zijn voor de introgressie met het resistentiegen volgens de uitvinding.

Met behulp van de werkwijze volgens de onderhavige
15 uitvinding en het gebruik van de specifieke, aan een resistentiegen gekoppelde DNA-merkers kan op eenvoudige wijze worden vastgesteld of een plant het resistentiegen bevat. De uitvoering van de ziekte-toets is een zeer tijdrovende procedure. Selectie van resistente planten door de inzet van
20 de specifieke DNA-merkers die gekoppeld zijn aan een resistentiegen is veel efficiënter. Hierdoor kunnen gemakkelijker grotere aantallen planten getest worden. Ook is de introgressie met het resistentiegen beter in kaart te brengen, waardoor planten met de kleinst mogelijke
25 introgressie geselecteerd kunnen worden. Bovendien kan onderscheid gemaakt worden tussen homozygote en heterozygote resistente planten.

De in stap (d) van de werkwijze volgens de uitvinding geselecteerde planten kunnen optioneel worden onderworpen aan
30 aanvullende stappen, zoals het één of meerdere malen terugkruisen of zelfbevruchten van de plant verkregen in stap (d) met een vatbare B. oleracea plant en het vervolgens opnieuw selecteren uit de nakomelingen van een resistente B. oleracea plant met behulp van de specifieke DNA-merkers. De

in stap (d) verkregen planten kunnen bijvoorbeeld ook homozygoot worden gemaakt door middel van voor de vakman bekende technieken als antheren- en/of microsporencultuur.

In een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze wordt de aanwezigheid van de introgressie met het resistentiegen in de geselecteerde planten bevestigd door middel van een ziekte-toets. Door het uitvoeren van een ziekte-toets kan de aanwezigheid en werking van het resistentiegen definitief worden bevestigd.

De eerste B. oleracea plant omvat bij voorkeur een resistentiegen dat een monogene en dominante resistentie tegen A. candida geeft. In een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding is het resistentiegen in heterozygote vorm, bij voorkeur in een homozygote vorm aanwezig.

In een voorkeursuitvoeringsvorm omvat de eerste B. oleracea plant een resistentiegen dat afkomstig is uit de B. oleracea plant waarvan de zaden zijn gedeponneerd bij de American Type Culture Collection (ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, Verenigde Staten van Amerika) op 1 maart 2006 onder nummer PTA 74-12.

In een verdere voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding omvat het selecteren van de resistente B. oleracea plant in stap (d) het selecteren van een B. oleracea plant welke ten minste twee, bij voorkeur ten minste drie, meer bij voorkeur ten minste vier, meer bij voorkeur ten minste vijf en meest bij voorkeur zes aan het resistentiegen gekoppelde DNA-merkers omvat, waarbij de DNA-merkers het resistentiegen omsluiten. Hierdoor kan met zekerheid worden vastgesteld dat de plant daadwerkelijk de introgressie met het resistentiegen bezit.

De DNA-merkers volgens de uitvinding worden bij voorkeur gekozen uit tabel 1, waarbij de aanwezigheid van de DNA-merkers in het genoom van de plant wordt aangetoond met behulp van de primer sequenties gekozen uit de groep die

bestaat uit SEQ ID NO: 1 tot en met SEQ ID NO: 7 (tabel 2).

In een bijzondere uitvoeringsvorm volgens de uitvinding omvat de eerste B. oleracea plant een resistentiegen tegen A. candida afkomstig uit de B. oleracea plant waarvan de zaden zijn gedeponeerd bij de American Type Culture Collection ((ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, Verenigde Staten van Amerika) op 1 maart 2006 onder nummer PTA 74-12.

De vatbare B. oleracea plant waarin het resistentiegen wordt ingebracht wordt bij voorkeur gekozen uit de groep die bestaat uit B. oleracea convar. botrytis var. botrytis (bloemkool, romanesco), B. oleracea convar. botrytis var. cymosa (broccoli), B. oleracea convar. botrytis var. asparagoides (spruitbroccoli), B. oleracea convar. oleracea var. gemnifera (spruitkool), B. oleracea convar. capitata var. alba (witte kool, spitskool), B. oleracea convar. capitata var. rubra (rode kool), B. oleracea convar. capitata var. sabauda (savooienkool), B. oleracea convar. acephela var. sabellica (boerenkool), B. oleracea convar. acephela var. gongyloides (koolrabi) en B. oleracea var. tranchuda syn. costata (Portugese kool).

De uitvinding heeft verder betrekking op de B. oleracea planten, verkrijgbaar met de hiervoor beschreven werkwijze, alsmede de zaden en/of plantendelen daarvan.

De uitvinding betreft tevens het gebruik van ten minste één aan een resistentiegen tegen A. candida gekoppelde DNA-merker voor het identificeren van een B. oleracea plant welke resistent is tegen A. candida, waarbij de DNA-merker wordt gekozen uit de DNA-merkers van tabel 1 en waarbij de DNA-merker wordt aangetoond met de primersequenties gekozen uit de groep die bestaat uit SEQ ID No 1 tot en met SEQ ID No 7 (tabel 2).

Het resistentiegen is bij voorkeur afkomstig uit de B. oleracea plant waarvan de zaden zijn gedeponeerd

bij American Type Culture Collection ((ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, Verenigde Staten van Amerika) op 1 maart 2006 onder nummer PTA 74-12.

- 5 De uitvinding wordt verder toegelicht aan de hand van de volgende voorbeelden.

Voorbeeld 1 - Populaties en ziekte-toets

10 De witte roest resistentiebron is afkomstig van de ouderlijn 9002757 van Bejo Zaden BV, waarvan zaden zijn gedeponeerd bij de ATCC (ATCC, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, Verenigde Staten van Amerika) op 1 maart 2006 onder nummer PTA 74-12. Met deze
15 bron werden kruisingen gemaakt met verschillende B. oleracea soorten (boerenkool, koolrabi, broccoli, spruitbroccoli, witte kool, spitskool, rode kool, savooiekool, tronchuda, spruitkool en bloemkool). Na terugkruising met vatbare ouderlijnen werden TK1 populaties verkregen. Om uit deze
20 populaties de resistente planten te selecteren werd gebruik gemaakt van een ziekte-toets.

Voor de instandhouding van A. candida isolaten die gebruikt worden voor de ziekte-toets, zijn zoösporangia afkomstig van vatbare B. oleracea planten uit het veld
25 geïsoleerd. Na kieming in water zijn de sporen gebruikt om vatbare planten te inoculeren. Na ontwikkeling van de blaasjes zijn deze zoösporangia geoogst en in vloeibare stikstof opgeslagen tot gebruik. De uiteindelijke ziekteproef vond plaats in de kas op kiemplanten van de TK1 populatie,
30 waarvan de kiemlobben zich 24 tot 48 uur daarvoor hadden uitgevouwen. De planten werden geïnoculeerd met een verse zoösporensuspensie (5×10^4 zoösporen per ml) die bereid was door zoösporangia van vatbare planten af te spoelen en te laten kiemen in water. Op de kiemlobben werden enkele

druppels zoösporensuspensie gepipetteerd. Na het druppelen werden de planten onder een plastic tunnel verder opgekweekt om de optimale condities voor infectie te kunnen waarborgen. Twee weken na inoculatie werden de plantjes beoordeeld
 5 waarbij ze ingedeeld werden in de klassen resistent, vatbaar of intermediair (Williams, Screening crucifers for multiple disease resistance. Workshop september 2-3, 1981, J.F. Friedrich Center, University of Wisconsin, Madison, V.S.).

Na uitvoering van de ziekte-toets op de kiemplanten,
 10 werden de resistente planten aangehouden voor de volgende stap in het terugkruisingsprogramma. Uit de uitslagen van de ziekte-toets bleek dat de resistentie in principe een monogeen dominante eigenschap was. Echter naast planten met vatbare en resistente reacties, werden vaak ook planten met
 15 intermediaire reacties gevonden. Dit bleek ook sterk afhankelijk te zijn van de genetische achtergrond waarin werd gewerkt. Uit het programma werden verschillende populaties gekozen waarbij niet of nauwelijks sprake was van een intermediaire reactie en waarbij de verwachte
 20 splitsingsverhouding (1:1 voor een TK en 3:1 voor een zelfbestuiving) ook gevonden werd.

Voorbeeld 2 - Merkerontwikkeling

25 Voor de ontwikkeling van gekoppelde DNA-merkers werd gebruik gemaakt van 4 populaties van ongeveer 200 individuen (bloemkool, boerenkool, tronchuda, witte kool). Van alle individuen werd DNA geïsoleerd uit bladponsjes (~0.3 cm² / bladpons). Een BSA methode werd gebruikt om nauw gekoppelde
 30 merkers te genereren, waarbij gebruik werd gemaakt van de RAMP techniek (Random Amplified Microsatellite Polymorphisms) (Matsumoto et al., Mammalian Genome 9: 531-535, 1998; Reiter, PCR-based marker systems, in: R.L. Phillips & I.K. Vasil (eds.), DNA-based markers in plants, Kluwer Academic

Publishers, 2001; Weising et al., DNA fingerprinting in plants, principles, methods and application, CRC Press, 2nd. ed. 21-73, 2005).

De RAMP techniek, waarbij een iSSR- en een RAPD-
 5 primer werden gecombineerd, leverde bandenpatronen op met daarin fragmenten die specifiek co-segregeerden met de resistentie en waarbij onderscheid gemaakt kon worden tussen planten met en zonder het resistentiegen. Door kartering van de RAMP-fragmenten werden nauw gekoppelde RAMP-merkers
 10 geïdentificeerd die het resistentiegen omsluiten.

Voorbeeld 3 - PCR condities en Merkeranalyse

De gebruikte PCR condities voor de RAMP reacties zijn
 15 als volgt:

PCR-mix:

75 mM Tris-HCl (pH 8.8)
 20 20 mM NH₄SO₄
 0.01% (v/v) Tween20
 2.8 mM MgCl₂
 0.25 mM dNTPs
 0.15 µM forward primer
 25 0.2 µM reverse primer
 0.04 units/µl Red Hot ® DNA Polymerase (ABgene, Epsom U.K.)
 ~0.2 ng/µl genomisch plant DNA

PCR-programma:

30
 stap 1: 2 min 93 °C
 stap 2: 30 sec 93 °C
 stap 3: 30 sec 35 °C

stap 4: opwarmen met 0.3 °C/sec tot 72 °C
stap 5: 1 min 30 sec 72 °C
stap 2-5 40 x herhalen
stap 6: 5 min 72 °C

5

Poly-acryl-gelelelectroforese:

Voor het analyseren van de RAMP patronen werd gebruik gemaakt van "Gene ReadIR 4200 DNA analyzers" (Licor Inc.). Op basis van een optimale concentratie van 6.5% acrylamide kunnen fragmenten gescheiden worden die een verschil in grootte hebben van één enkele base.

Om de fragmenten zichtbaar te maken op dit systeem is het noodzakelijk om gelabelde (IRDye labels) primers te gebruiken. Hiertoe wordt een derde deel van de hoeveelheid van de forward primer vervangen door een gelabelde primer met dezelfde sequentie.

Voorbeeld 4 - Merkeroverzicht

20

In tabellen 1 en 2 worden voor de verschillende RAMP merkers de sequenties van de primers gegeven, de grootte van het informatieve fragment en de geschatte afstand tot de resistentie in cM op basis van het aantal overkruisingen in de populatie. Uit analyse van het aantal overkruisingen tussen de verschillende merkers onderling, blijkt dat de merkers het resistentiegen omsluiten.

25

Tabel 1. Overzicht van de RAMP merkers

RAMP SEQ ID	Fragmentgrootte (bp)	Positie in cM t.o.v. resistentiegen
Combinatie		
1+7	325	6,1
2+7	393	4,6
3+7	508	4,2
4+7	830	1,2
5+7	285	2,0
6+7	607	8,8

Tabel 2. Overzicht van SEQ ID nrs

SEQ ID nr.	Sequentie
1 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACAAAAAGAGAGAGAGAG
2 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACTACGACACACACACAC
3 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACATACATATATATATATATAT
4 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACCCAGGTGTGTGTGTGTGT
5 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACAGTGGAGAGAGAGAGAGAG
6 iSSR	CAGGAAACAGCTATGACACTATCTCTCTCTCTCTC
7 Operon	RAPD ® 10-mer kits A-01 t/m BH-20

5

Definities

BSA - Bulk Segregant Analysis - Selectiestrategie waarbij van grote splitsende populaties, individuen met een zelfde eigenschap (fenotype) of DNA van deze individuen worden samengevoegd tot "pools". Na screening van deze "pools" met DNA-technieken worden merkers geïdentificeerd die gekoppeld zijn aan het betreffende fenotype.

15

cM - centimorgan - Eenheid voor de genetische afstand tussen merkers, gebaseerd op het aantal overkruisingen per honderd individuen.

DNA marker - Een DNA fragment dat gekoppeld is aan een gen of een ander stuk DNA met een bekende locatie op het genoom

welke gebruikt wordt om overerving van dit gen of deze locatie te volgen.

Dominant - Allel dat de fenotypische expressie van een ander
5 allel maskeert wanneer beide aanwezig zijn.

Gel-elektroforese - Methode om moleculen (o.a. DNA, RNA, eiwit) te scheiden in een matrix (agarose of polyacrylamide) onder invloed van een elektrisch veld op basis van hun
10 grootte, vorm of lading.

Gen - De basale eenheid van overerving, waardoor erfelijke eigenschappen worden overgedragen van de ouders op de nakomelingen.
15

Introgressie - Een chromosoomfragment van een lijn dat bijvoorbeeld door kruising in een andere lijn kan worden ingebracht

20 **IRDye labels** - Labels die gebruikt worden voor Licor imaging systems, waarvan de detectie plaatsvindt bij 700 nm of 800 nm.

iSSR-primer (inter Simple Sequence Repeat primer) - Een
25 primer ontworpen op het 5' uiteinde van een SSR (Single Sequence Repeat), een stukje DNA bestaande uit een herhaling van 2 of 3 nucleotiden.

Monogeen - Bepaald door een enkel gen.
30

PCR (Polymerase Chain Reaction) - Een *in vitro* amplificatiemethode om een specifiek DNA fragment te vermeerderen. Deze synthesesreactie maakt gebruik van minimaal één oligonucleotide primer die hybridiseert met een stuk DNA

waarna via opeenvolgende temperatuurcycli een DNA polymerase de flankerende regio amplificeert.

Primer - Een korte oligonucleotide (~20-50bp) complementair
5 aan de sequentie van een enkelstrengs DNA-molecuul, welke dient als startpunt voor een polymerase.

RAPD-primer (Random Amplified Polymorphic DNA primer) - Een
10 10-meer met een random sequentie, waarbij het GC-gehalte tussen 60% en 70% ligt en waarbij de primeruiteinden niet zelfcomplementair zijn.

RAMPs (Random Amplified Microsatellite Polymorphisms) - DNA-
fingerprinting techniek gebaseerd op RAPD- en iSSR primers
15 waarmee polymorfismen tussen verschillende DNA monsters worden opgespoord.

Resistentie - Het vermogen van een plant om de effecten en/of
20 groei van een pathogeen volledig of gedeeltelijk tegen te gaan.

TK (Terugkruising) - Kruising van een individu met één van de oorspronkelijke ouders

CONCLUSIES

1. Brassica oleracea plant, omvattende een resistentiegen
tegen Albugo candida, de veroorzaker van witte roest.

5

2. Plant volgens conclusie 1, waarbij het resistentiegen
in heterozygote vorm aanwezig is.

3. Plant volgens conclusie 1, waarbij het resistentiegen
10 in homozygote vorm aanwezig is.

4. Plant volgens conclusie 1, 2 of 3, waarbij het
resistentiegen afkomstig is uit de B. oleracea plant, waarvan
de zaden zijn gedeponeerd op 1 maart 2006 bij de American
15 Type Culture Collection (ATCC, Patent Depository, 10801
University Boulevard, Manassas, VA 20110, Verenigde Staten
van Amerika) onder nummer PTA 74-12.

5. Plant volgens en van de conclusies 1-4, waarbij de
20 aanwezigheid van een introgressie met het resistentiegen
aantoonbaar is met behulp van ten minste één aan het
resistentiegen gekoppelde specifieke DNA-merker.

6. Plant volgens conclusie 5, waarbij de aanwezigheid van
25 een introgressie met het resistentiegen tegen A. candida
aantoonbaar is met behulp van ten minste twee aan het
resistentiegen gekoppelde DNA-merkers, waarbij de DNA-merkers
het resistentiegen omsluiten.

30 7. Plant volgens één van de conclusies 1-6, waarbij de
DNA-merkers worden gekozen uit tabel 1, waarbij de
aanwezigheid van de DNA-merkers in het genoom van de plant
wordt aangetoond met behulp van de primersequenties gekozen
uit de groep die bestaat uit SEQ ID NO: 1 tot en met SEQ ID

NO: 7 (tabel 2).

8. Plant volgens één van de conclusies 1-7, waarbij de plant wordt gekozen uit de groep die bestaat uit Brassica
 5 oleracea convar. botrytis var. botrytis (bloemkool, romanescos), Brassica oleracea convar. botrytis var. cymosa (broccoli), Brassica oleracea convar. botrytis var. asparagoides (spruitbroccoli), Brassica oleracea convar. oleracea var. gemnifera (spruitkool), Brassica oleracea
 10 convar. capitata var. alba (witte kool, spitskool), Brassica oleracea convar. capitata var. rubra (rode kool), Brassica oleracea convar. capitata var. sabauda (savooienkool), Brassica oleracea convar. acephela var. sabellica (boerenkool), Brassica oleracea convar. acephela var. gongyloides (koolrabi) en Brassica oleracea var. tranchuda
 15 syn. costata (Portugese kool).

9. Zaden, vruchten en/of andere plantendelen afkomstig van een plant volgens één van de conclusies 1-8.

20

10. Werkwijze voor het verschaffen van een B. oleracea plant met een resistentie tegen A. candida, omvattende

(a) het verschaffen van een eerste B. oleracea plant, welke een resistentie tegen A. candida omvat;

25 (b) het kruisen van de resistente plant met een vatbare tweede B. oleracea plant;

(c) het uit de nakomelingen isoleren van genomisch DNA voor het detecteren van de aanwezigheid van een introgressie met het resistentiegen met behulp van één of meer specifieke
 30 aan het resistentiegen gekoppelde DNA merkers; en

(d) het uit de nakomelingen selecteren van een B. oleracea plant, waarin de aanwezigheid van de introgressie met het resistentiegen in stap (c) is aangetoond.

11. Werkwijze volgens conclusie 10, waarbij het resistentiegen in heterozygote vorm aanwezig is.

12. Werkwijze volgens conclusie 10, waarbij het
5 resistentiegen in homozygote vorm aanwezig is.

13. Werkwijze volgens conclusie 10, 11 of 12, waarbij de aanwezigheid van de introgressie met het resistentiegen in de geselecteerde planten bevestigd wordt door middel van een
10 ziekte-toets.

14. Werkwijze volgens een van de conclusies 10-13, waarbij het resistentiegen afkomstig is uit de B. oleracea plant, waarvan de zaden zijn gedeponeerd op 1 maart 2006 bij
15 de American Type Culture Collection (ATCC) onder nummer PTA 74-12.

15. Werkwijze volgens een van de conclusies 10-14, waarbij het selecteren van de resistente B. oleracea plant in
20 stap (d) het selecteren van een B. oleracea plant omvat, welke ten minste twee aan het resistentiegen gekoppelde DNA-merkers omvat, waarbij de DNA-merkers het resistentiegen omsluiten.

25 16. Werkwijze volgens één van de conclusies 10-15, waarbij de DNA-merker wordt gekozen uit de DNA-merkers van tabel 1, waarbij de DNA-merker wordt aangetoond met een primer sequentie gekozen uit de groep die bestaat uit SEQ ID No1 tot en met SEQ ID No 7 (tabel 2).

30

17. Werkwijze volgens één van de conclusies 10-16, waarbij de vatbare B. oleracea plant wordt gekozen uit de groep die bestaat uit B. oleracea convar. botrytis var. botrytis (bloemkool, romanesco), B. oleracea convar. botrytis

var. cymosa (broccoli), B. oleracea convar. botrytis var. asparagoides (spruitbroccoli), B. oleracea convar. oleracea var. gemnifera (spruitkool), B. oleracea convar. capitata var. alba (witte kool, spitskool), B. oleracea convar. capitata var. rubra (rode kool), B. oleracea convar. capitata var. sabauda (savooienkool), B. oleracea convar. acephela var. sabellica (boerenkool), B. oleracea convar. acephela var. gongyloides (koolrabi) en B. oleracea var. tranchuda syn. costata (Portugese kool).

10

18. B. oleracea plant welke resistent is tegen A. candida, verkrijgbaar met een werkwijze volgens één van de conclusies 10-17.

15

19. Gebruik van ten minste één aan een resistentiegeen tegen A. candida gekoppelde DNA-merker voor het identificeren van een B. oleracea plant welke resistent is tegen A. candida, waarbij de DNA-merker wordt gekozen uit de DNA-merkers van tabel 1, en waarbij de DNA-merker wordt aangetoond met de primer sequenties gekozen uit de groep die bestaat uit SEQ ID NO 1 tot en met SEQ ID No 7 (tabel 2).

20

SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)

RAPPORT BETREFFENDE NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFICATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE		KENMERK VAN DE AANVRAGER OF VAN DE GEMACHTIGDE	
		2M/2CP61	
Nederlands aanvraag nr.		Indieningsdatum	
2000622		01-05-2007	
		Ingeroepen voorrangsdatum	
Aanvrager (Naam)			
BEJO Zaden 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.	
		SN 48548	
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)			
Volgens de internationale classificatie (IPC)			
A01H5/00		C12Q1/68	
II. ONDERZOCHETE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK			
Onderzochte minimumdocumentatie			
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen		
IPC8	C12N	A01H	
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 2000622

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)
C12N A01H

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, Sequence Search, PAJ, WPI Data

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	SANTOS M R ET AL: "Evaluation of a core collection of Brassica oleracea accessions for resistance to white rust of crucifers (Albugo candida) at the cotyledon stage" GENETIC RESOURCES AND CROP EVOLUTION, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, deel 51, nr. 7, 1 november 2004 (2004-11-01), bladzijden 713-722, XP019243221 ISSN: 1573-5109 in de aanvraag genoemd bladzijde 1	1-19
X	WO 00/08189 A (PLANT BIOSCIENCE LTD [GB]; JONES JONATHAN DALLAS GEORGE [GB]; BEYNON J) 17 februari 2000 (2000-02-17) het gehele document voorbeeld 8	1

-/--

☒ 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 vermeldde 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

Z lid van dezelfde octrooifamilie of overeenkomstige octrooi-publicatie

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

11 Januari 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 2000622

C. (Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Gediteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
A	MAY A W ET AL: "LINKAGE STUDIES IN BRASSICA-OLERACEA OF MORPHOLOGIC AND ISOZYMIC MARKERS AND DISEASE RESISTANCE" PHYTOPATHOLOGY, deel 77, nr. 12, 1987, bladzijde 1772, XP001536835 & ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY AND OF THE NORTH CENTRAL DIVISION, CINCINNA ISSN: 0031-949X het gehele document	
A	CHEUNG W Y ET AL: "Identification of RFLP markers linked to the white rust resistance gene (Acr) in mustard (Brassica juncea (L.) Czern. and Coss.)" GENOME, deel 41, nr. 4, augustus 1998 (1998-08), bladzijden 626-628, XP002460856 ISSN: 0831-2796 het gehele document	
A	BORHAN MOHAMMAD H ET AL: "White rust (Albugo candida) resistance loci on three Arabidopsis chromosomes are closely linked to downy mildew (Peronospora parasitica) resistance loci" MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, deel 2, nr. 2, maart 2001 (2001-03), bladzijden 87-95, XP002460857 ISSN: 1464-6722 het gehele document bladzijde 87 bladzijde 91, rechter kolom, alinea 1 bladzijde 92, rechter kolom, alinea 1	

**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 2000622

In het rapport genoemd octrooigescrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
WO 0008189	A	17-02-2000 AU	5429999 A
			28-02-2000



OCTROOICENTRUM NEDERLAND

WRITTEN OPINION

File No. SN48548	Filing date (day/month/year) 01.05.2007	Priority date (day/month/year)	Application No. NL2000622
International Patent Classification (IPC) INV. A01H5/00 C12Q1/68			
Applicant Bejo Zaden B.V. te Warmenhuizen			

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

NL2000622

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	6,7,10-19
	No: Claims	1,2-5,8,9
Inventive step	Yes: Claims	
	No: Claims	1-19
Industrial applicability	Yes: Claims	1-19
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

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

D1: Santos and Dias, Genetic Resources and Crop Evolution (2004), Vol. 51 ; pp. 713-722

D2: WO0008189

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 Brassica oleracea plants that are resistant towards infection with the oomycete pathogen *Albugo candida* leading to white rust/blister or staghead.

The respective resistance gene is originating from a specific Brassica oleracea plant line 9002757 from Bejo Zaden N.V. The line was deposited at ATCC.

The plant has been crossed to various Brassica oleracea plants. After backcrossing with susceptible lines and the resultant plants were screened with a seedling infection test.

The result of the infection test showed that one is dealing with a monogenic, dominant resistance phenotype.

The examples further disclose the development of closely linked DNA markers through the application of the BSA (bulk segregant analysis) method in combination with the RAMP (random amplified microsatellite polymorphisms) technique which combines ISSR- and RAPD-markers.

The resulting markers "surround" the - not further characterized - resistance gene. The sequence of the resistance gene was not determined.

2.2 The detection of the resistance gene of the present application using the screening test relied on the inoculation with not further defined *Albugo candida* isolates.

Different isolates of *Albugo candida* are known, see e.g. D1.

2.3 Current claim 1 is directed to any *Brassica oleracea* plant that comprises any not further defined resistance gene against *Albugo candida*. In the absence of proper definition concerning the nature of said "resistance gene", the discovered resistant *Brassica oleracea* plants of D1 are considered to comprise the resistance gene of the current application. Table 2 of D1 depicts three accessions that were characterized as "HN=resistant", four accessions as "FN=resistant", both resistance phenotypes are characterized by a hypersensitive reaction (HR). See page 721, right column; lines 16-18.

2.4 Document D2 (WO0008189) is disclosing the generation of transgenic *Brassica oleracea* plants (see Example 8) that are transformed with a transgene that mediates resistance against *Albugo candida* infection.

When strictly interpreting the broad wording of current claim 1, said document D2 is novelty-destroying for claim 1.

2.5 Consequently, in the absence of any stringent definition of which resistance gene is falling within the scope of current claim 1, the subject matter of said claim 1 and of claims 2-5, 8 and 9 is considered to be disclosed in document D1 and is hence not novel over the prior art pursuant to Art. 33(2) PCT.

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

3.1 D1 which is the closest prior art is disclosing the evaluation of 400 *Brassica oleracea* accessions as a source for genetic determinants that mediate resistance against *Albugo candida*. The difference between D1 and the current application is the identification of another *Albugo candida* resistance gene and the development of related markers.

The problem is the provision of a further *Brassica oleracea*-specific *Albugo candida* resistance gene and its mapping.

The solution is the identification of the *Albugo candida* resistance gene from the *Brassica oleracea* source ATCC PTA 74-12 and the identification of respective

markers as characterized by SEQIDS 1-7.

3.2 The prior art already discloses the identification of different Brassica oleracea plant accessions that are resistant against infection by the white rust pathogen Albugo candida and that could serve as a source for the fine-mapping and sequencing of the resistance locus. D1 states that "nine accessions presented 50-78% of resistant seedlings and so they should be considered as potential and useful sources for direct use in breeding programs".

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

3.3 Consequently, the identification of yet another - not stringently defined - Albugo candida resistance determinant from an alternative Brassica oleracea plant through the application of techniques already available to the skilled artisan is obvious and does not involve an inventive step.

The subject matter of current claims 1-19 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 Claims 10-17 are directed to methods of obtaining a B. oleracea plant that is resistant to Albugo candida infection by crossing a first resistant Brassica oleracea plant with another susceptible B. oleracea plant, followed by further selection steps comprising the application of the identified markers.

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 10-17 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 claims 10-17 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.