

(19)



Bureau voor de
Industriële Eigendom
Nederland

(11) 1002984

(12) C OCTROOI²⁰

(21) Aanvraag om octrooi: 1002984

(51) Int.Cl.⁶
G01N21/64, G01N33/483, A01C1/00

(22) Ingediend: 02.05.96

(41) Ingeschreven:
06.11.97

(47) Dagtekening:
06.11.97

(45) Uitgegeven:
05.01.98 I.E. 98/01

(73) Octrooihouder(s):
Centrum voor Plantenveredelings- en
Reproductieonderzoek (CPRO-DLO) te
Wageningen.

(72) Uitvinder(s):
Hendrik Jalink te Dodewaard

(74) Gemachtigde:
Mr. G.L. Kooy c.s. te 2514 BB Den Haag.

(54) **Werkwijze voor het bepalen van de rijpheid en kwaliteit van zaden middels het chlorofylgehalte en inrichting voor het selecteren van zaden met behulp van een dergelijke werkwijze.**

(57) De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze en een inrichting voor het bepalen van het chlorofylgehalte en daarmee de rijpheid en kwaliteit van vruchten, zaden, zaadbeginselen, kunstzaden en bloemen. De werkwijze is gebaseerd op het meten van de hoeveelheid chlorofyl van het omhulsel of de bloemblaadjes. De uitvinding bestaat uit het laten fluoresceren van het chlorofylmolecuul door de vruchten, zaden, zaadbeginselen, kunstzaden en bloemen te bestralen met elektromagnetische straling van een geschikte golflengte en de mate van fluorescentie te meten. Er worden proeven beschreven met onder andere zaden van wittekool, suikerbiet, wortel, paprika en tomaat.

NL C 1002984

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

WERKWIJZE VOOR HET BEPALEN VAN DE RIJPHEID EN KWALITEIT VAN
ZADEN MIDDELS HET CHLOROFYLGEHALTE EN INRICHTING VOOR HET
5 SELECTEREN VAN ZADEN MET BEHULP VAN EEN DERGELIJKE WERK-
WIJZE

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een
werkwijze voor het bepalen van de kwaliteit en rijpheid van
10 vruchten, zaden, zaadbeginselen, kunstzaden en bloemen door
de hoeveelheid chlorofyl te bepalen door bestraling met
electromagnetische straling. Tevens heeft de onderhavige
uitvinding betrekking op een inrichting voor het bepalen
van het chlorofylgehalte van vruchten, zaden, etc. en voor
15 het selecteren op rijpheid en kwaliteit.

Een dergelijke werkwijze is bekend uit een artikel
van Tkachuk en Kuzina, in "Chlorophyll analysis of whole
rapeseed kernels by near infrared reflectance", Canadian
Journal of Plant Science 62: 875-884, 1982. Met een spec-
20 trofotometer wordt een lichtstraal van bekende golflengte
op het zaad gericht. Na reflectie bepaalt het apparaat de
fractionele absorptie van de lichtstraal. Deze meting kan
bij iedere golflengte van het licht worden uitgevoerd. Bij
voorkeur wordt er gemeten in het gebied 400-2400 nm. Het
25 reflectiespectrum is nu een maat voor het chlorofylgehalte.
Het grote nadeel van deze methode bestaat hieruit dat er
bij verschillende golflengtes gemeten moet worden, bij
voorkeur 16, om een goede en betrouwbare uitslag te ver-
krijgen.

30 Het meten van het chlorofylgehalte in vruchten,
zaden, etc. is een goede methode om de rijpheid en kwali-
teit daarvan te bepalen. Gelijktijdig met het rijpen van de
zaden wordt namelijk het chlorofyl dat in de vruchten,
zaden, etc. aanwezig is, afgebroken. De kleur verandert
35 daarbij van groen (door het aanwezige chlorofyl in de
onrijpe zaden etc.) naar een van de soort afhankelijke
kleur. Met behulp van een kleurmeetinrichting kan op basis

van de groenheid van het zaad de rijpheid bepaald worden. Toch is een rijpheidsbepaling op basis van kleur niet geheel bevredigend: alleen grote verschillen in rijpheid kunnen met een kleurmeetinrichting worden gemeten. Het
5 chlorofylgehalte is derhalve een betere maat voor de rijpheid van de zaden.

Met de chlorofylgehaltebepaling volgens de uitvinding kan grote zekerheid worden verkregen omtrent de rijpheid van zaden. Dit maakt het mogelijk om zaden op
10 basis van rijpheid te sorteren zoals beschreven is in de voorbeelden. De kwaliteit van de zaden na sorteren in een klasse hangt af van de keuze van de klassengrenzen en het type zaad. Bij zaden die na rijping (bijv. koolzaden, wortelzaden) in een droge vrucht zitten, is het in het
15 algemeen zo dat rijpere zaden hoger van kwaliteit zijn dan minder rijpe of onrijpe zaden. Zaden die in een vochtige vrucht rijpen (bijv. paprika of tomaat), hebben een optimum in hun rijpheid. Onrijpe zaden maar ook zaden die te ver zijn doorgerijpt, zijn van lagere kwaliteit dan zaden van
20 optimale rijpheid. Zaden met een optimale en uniforme mate van rijpheid kiemen gelijkmatiger en leveren minder abnormale kiemplanten. Zaadbehandelingen, zoals voorkiemen (primen) van zaden, hebben een groter effect (snellere en uniformere kieming) wanneer de zaden een zekere rijpheid
25 bezitten. Tevens zijn rijpere zaden beter te bewaren dan minder rijpe of onrijpe zaden. Verder kan een afwijkende gezondheidstoestand tijdens de ontwikkeling van het zaad in de vrucht de verdere afrijping verstoren. Dit zal tot gevolg hebben dat ongezonde zaden een lagere rijpingsgraad
30 hebben dan gezonde zaden. Ook zijn onrijpe zaden gevoeliger voor aantastingen door ziektes.

In de techniek zijn eveneens andere methoden bekend om de rijpheid en kwaliteit van zaden te voorspellen. Zo bepaalden S. Gunasekaran, M.R. Paulsen en G.C.
35 Shove in "Optical Methods for Non-Destructive Quality Evaluation of Agricultural and Biological Materials", Review Paper, Journal of Agricultural Research (1985), 32,

209-241, het chlorofylgehalte in vruchten om de rijpheid daarvan te bepalen. Dat werkt echter volgens het principe van lichtabsorptie bij een golflengte van 670 nm. Er is geen sprake van het meten van het chlorofylgehalte in de
5 zaden van planten.

T.V. Veselova, V.A. Veselovsky, A.B. Rubin en P.Z. Bocharov beschrijven in het artikel "Delayed luminescence of air-dry soybean seeds as a measure of their viability", *Physiologia Plantarum* 65: 493-497, Copenhagen 1985, het
10 bepalen van de levensvatbaarheid van zaden van de sojaboon, door deze te bestralen met licht van $\pm$ 390 nm, waardoor vertraagde luminescentie optreedt bij golflengten van ongeveer 530 nm en ongeveer 610 nm. Bij verouderde sojabonen is de intensiteit groter dan bij niet verouderde
15 sojabonen. Veselova et al. gaan er vanuit dat de luminescentie afkomstig is van eiwitten en polysachariden. De toename bij veroudering schrijven zij toe aan een verandering in de samenstelling van de eiwitten en polysachariden in het zaad. Het is duidelijk dat Veselova et al. een
20 geheel ander effect meten dan de aanwezigheid van het chlorofylmolekuul zoals dat volgens de onderhavige uitvinding gebeurt.

De voorgaande methoden zijn niet-destructief ten opzichte van de zaden etc. die gemeten worden, maar bepalen
25 ook niet de hoeveelheid chlorofyl in het zaad. Er bestaat echter wel een destructieve methode voor het bepalen van de hoeveelheid chlorofyl. Deze methode, een extractie, is internationaal erkend als standaardmethode voor de bepaling van het chlorofylgehalte van zaden en wordt beschreven door
30 Daun in "Determination of chlorophyll content - Spectrophotometric method", International Standard Organization, Geneva, ISO Method 10519, Rapeseed. Van gevriesdroogde zaden wordt d.m.v. een vloeistof (aceton of chloroform) het chlorofyl geëxtraheerd. Daarna wordt er met een spectrofo-
35 tometer op soortgelijke wijze als bij de werkwijze van Tkachuk et al., maar nu in transmissie, een absorptiespectrum, welke karakteristiek is voor chlorofyl, van de vloeistof

stof gemaakt, bij drie verschillende golflengtes, 625,5, 665,5 en 705,5 nm. Uit deze gegevens wordt het chlorofylgehalte berekend. De bovengenoemde methode is destructief omdat het oplosmiddel de zaden aantast. Verder is het niet
5 mogelijk om kleine zaden individueel te meten, omdat de methoden niet gevoelig genoeg zijn om kleine hoeveelheden chlorofyl aan te tonen.

De onderhavige uitvinding heeft nu tot doel een werkwijze te verschaffen waarmee het op eenvoudige wijze
10 mogelijk is om de hoeveelheid chlorofyl in zaden, etc. te bepalen, zonder de zaden, etc. te vernielen. Verder heeft de uitvinding tot doel een inrichting te verschaffen voor het uitvoeren van deze werkwijze. Tenslotte heeft de uitvinding tot doel een inrichting te verschaffen waarmee
15 zaden snel en nauwkeurig op rijpheid en kwaliteit gesorteerd kunnen worden.

De werkwijze volgens de uitvinding wordt nu gekenmerkt, doordat de electromagnetische straling een zodanige golflengte heeft dat het chlorofyl directe fluo-
20 rescentie vertoont, welke fluorescentie wordt gemeten.

Momenteel worden zaden in de techniek nog steeds op kleur gesorteerd. Sorteren op groenheid en dus op het chlorofylgehalte van zaden is met een kleursorteerder moeilijk. De nauwkeurigheid van een sorteeractie die
25 gebaseerd is op een dergelijke meting, is doorgaans volledig afhankelijk van de nauwkeurigheid van die meting. Met kleurmeting kan alleen gesorteerd worden op zaden die duidelijk verschillen in groenheid. Met een dergelijke inrichting zullen derhalve ook niet-rijpe zaden goedgekeurd
30 kunnen worden. Bij een kleurmeting van de groenheid kan men niet volstaan door de absorptie van het licht rond 670 nm te meten. Een verandering in absorptie rond 670 nm kan ook het gevolg zijn van een verandering in concentratie van een andere stof van het zaad. Daarom moet men voor deze meting
35 meerdere golflengtes gebruiken. Een éénduidige bepaling van het chlorofylgehalte is met deze methode niet mogelijk.

Verder is het niet mogelijk om met een kleursorteerder kleine verschillen in groenheid aan te tonen.

De onderhavige uitvinding is gebaseerd op een fluorescentiemeting die zeer specifiek is voor het aanwezige chlorofyl. Andere stoffen die de kleur van het zaad beïnvloeden maar niet fluoresceren, zullen geen invloed hebben op de meting. Tevens kunnen met de vinding kleine verschillen in hoeveelheid chlorofyl worden aangetoond. Dit is vanwege het principe dat een fluorescentiemeting veel gevoeliger is dan een kleurmeting.

Volgens de uitvinding blijkt nu dat een verschil in chlorofylgehalte van verschillende zaden ook direct aantoonbaar aanwezig is in de zaadhuid, zelfs wanneer de huiden op het oog volledig uniform gekleurd zijn. Zaden van verschillende rijpheid kunnen dezelfde kleur hebben, maar verschillende chlorofylgehalten. Een geschikte methode om het chlorofylgehalte te meten, is door middel van bestraling van het chlorofylmolekuul met elektromagnetische straling, bij voorkeur blauw of oranje/rood licht, waardoor het chlorofylmolekuul in een elektronisch aangeslagen toestand komt. Bij terugval naar de grondtoestand vindt er fluorescentie plaats die bij voorkeur in het ver-rood gemeten wordt. Bij voorkeur wordt de meting zodanig uitgevoerd dat de ingestraalde elektromagnetische straling op het zaad een golflengte heeft van ongeveer 435 of 670 nm en de fluorescentie bij voorkeur gemeten wordt bij ongeveer 690 of 730 nm.

Wanneer volgens de uitvinding van elk zaadje afzonderlijk de intensiteit van de fluorescentie wordt gemeten, is het chlorofylgehalte bekend en daarmee de rijpheid van het zaadje.

De onderhavige uitvinding heeft verschillende voordelen ten opzichte van de bekende werkwijzen voor het bepalen van de rijpheid van zaden, en die op kleur werken.

Voor de kwaliteit van olie die uit zaad gewonnen wordt, is het belangrijk dat het chlorofylgehalte van olie zo laag mogelijk is. Chlorofyl verlaagt de kwaliteit van

olie, doordat het er minder attractief uitziet en omdat de olie sneller ranzig wordt. Chlorofyl moet na de oliewinning met extractiemethodes uit de olie worden verwijderd. Met de onderhavige uitvinding kunnen zaden op chlorofylgehalte
5 worden gesorteerd, zodat alleen zaad met een laag chlorofylgehalte wordt gebruikt om olie uit te winnen. Het grote voordeel van het sorteren van de zaden op chlorofylgehalte is dat er aan het begin van de extractie gesorteerd kan worden. Daarmee kan de nieuwe uitvinding een aanzienlijke
10 kostenbesparing geven.

Voor een goede en constante kwaliteit van koffie worden bonen voor het branden in het land van herkomst op kleur gesorteerd. Dit moet in het zgn. natte stadium van de bonen gebeuren voordat deze gedroogd worden, omdat bonen
15 van verschillende rijpheid na droging een uniforme bruine kleur krijgen. Met de onderhavige vinding kunnen met een grotere nauwkeurigheid koffiebonen in het natte stadium worden gesorteerd. Verder kunnen met de vinding, koffiebonen eveneens in het droge stadium worden gesorteerd. Het
20 grote voordeel voor de koffieproducenten is dan dat het niet meer noodzakelijk zal zijn koffiebonen in het natte stadium te sorteren in het land van herkomst, maar na droging op ieder gewenst tijdstip, bijvoorbeeld in het land waar deze worden gebrand. Dit kan niet alleen kostenbespa-
25 rend werken door een eenvoudigere en flexibelere bedrijfsvoering, maar ook de kwaliteit verhogen van de koffiebonen, doordat deze direct na de oogst gedroogd kunnen worden. Bij kleurmetingen in het natte stadium blijven de koffiebonen langer vochtig, waardoor de kwaliteit kan afnemen.

30 Het is een voordeel dat ook de rijpheid van oudere zaden gemeten kan worden. Zaden van enkele jaren oud kunnen zodoende ook met de methode van de onderhavige uitvinding geselecteerd worden.

De onderhavige uitvinding is toepasbaar op de
35 meeste soorten vruchten, zaden, kunstzaden (bijv. somatische embryo's via weefselkweek) en zaadbeginselen van tuinbouwgewassen, landbouwgewassen, siergewassen, bosbouw-

gewassen en andere vruchten en zaden zoals noten, pitten en bonen maar ook op bloemen. De vinding werkt bij zaden waarbij het chlorofyl wordt afgebroken tijdens het rijpingsproces.

5 Het heeft de voorkeur een fluorescentiemeting uit te voeren in een inrichting, zoals is weergegeven in Figuur 1. Dit is een eenvoudige vorm die de inrichting kan hebben. Het licht van de LED met een maximale emissie op 650 nm en een halfwaarde breedte van 22 nm wordt gefilterd door een
10 smalbandig filter van 656 nm met een halfwaarde breedte van 10 nm. De beamsplitter spiegelt circa 50% van het LED-licht in de richting van de lens, die het licht concentreert op het zaadje. De chlorofylfluorescentie wordt met dezelfde lens ingevangen. Met het filter is het zeker dat alleen
15 fluorescentie rond 730 nm door de fotodiode gedetecteerd wordt. De lock-in versterker moduleert het LED-licht met een modulatie diepte van 100% en een duty cycle van 50% en een geschikte frequentie. Hierdoor wordt ook de fluorescen-
20 tie met dezelfde frequentie gemoduleerd. De wisselspanning van de fotodiode wordt door de lock-in versterker omgezet in een signaal dat evenredig is met de intensiteit van de fluorescentie.

Er wordt verder gewezen op het feit dat het nu mogelijk is om, door de meetinrichting in te bouwen in een
25 handzaam, draagbaar apparaat, te bepalen of de zaden geschikt zijn om te oogsten. Dat kan op de teeltplek gedaan worden door enige zaden door te meten. Dit hoeft nu niet meer op het oog of "het gevoel" of bijvoorbeeld op een vaste tijd vanaf de bestuiving te gebeuren. Door weersin-
30 vloeden kan het namelijk nodig blijken om juist vroeger of later te oogsten.

Een fluorescentiebepaler volgens de uitvinding kan ook in een zaden sorteerinrichting worden ingebouwd. Inbouw is mogelijk in alle sorteerinrichtingen die in de techniek
35 bekend zijn. Met name is de uitvinding toepasbaar in een bekende kleursorteerinrichting.

De uitvinding zal nu aan de hand van een aantal voorbeelden gedemonstreerd worden.

Voorbeelden

5 In de volgende voorbeelden werd van zaden met behulp van de werkwijze volgens de uitvinding van ieder zaadje het chlorofylgehalte gemeten. Proeven werden met de volgende zaden uitgevoerd, waarbij gemeten werd aan de zaadhuid van wittekoolzaden (*Brassica oleracea*), de vrucht-
10 wand van suikerbietenzaden (*Beta vulgaris*), de gepolijste vruchtwand van suikerbietenzaden (*Beta vulgaris*), de vruchtwand van ontsmette wortelzaden (*Daucus carota*), de zaadhuid van paprikazaden (*Capsicum annuum*) en de zaadhuid van tomatenzaden (*Lycopersicon esculentum*). Met de beschre-
15 ven werkwijze zijn verbeteringen in de opkomst van de zaden en het aantal normale kiemplanten, d.w.z. het aantal kiemplanten dat uitgroeit tot normale planten, verkregen.

Voorbeeld 1

20 Met de onderhavige uitvinding werden van 1500 wittekoolzaden (*Brassica oleracea*) cv. 'Bartolo F1' individueel het chlorofylfluorescentiesignaal gemeten en vervolgens in 2 verschillende willekeurig gekozen klassen ingedeeld. De procentuele verdeling over de 2 klassen is
25 vermeld in tabel 1. De kiemproeven werden uitgevoerd door de zaden te imbiberen op met water bevochtigd filtreerpapier op een petriskaal bij een temperatuur van 20°C en afgedekt met een transparant afdekkapje bij 12 uur donker en 12 uur licht. De zaden werden visueel beoordeeld op het
30 verschijnen van het wortelpuntje (tabel 1). De kiemsnelheid, t_{50} , werd berekend en na 5 en 10 dagen werden de kiemplanten beoordeeld volgens de standaard ISTA regels zoals beschreven in "International Rules for Seed Testing 1993", Seed Science and Technology 21, 1993 (tabel 1). De
35 zaden in de klasse met lage fluorescentie gaven een opkomst van 100%, met 98% normale kiemplanten tegen respectievelijk 68% en 24% voor de hoge klasse. De verbetering van de lage

klasse t.o.v. de controlegroep is klein, doordat de hoge klasse slechts uit 1,8% van de oorspronkelijke populatie bestaat. De resultaten tonen aan dat het in de handel verkrijgbaar Brassica-zaad van zeer hoge kwaliteit, verbeterd kon worden en dat zaden met een lage kwaliteit werden geselecteerd, ook al was dit een kleine fractie van het totaal. De opkomst t.o.v. de controlegroep kon worden verhoogd van 99,4 naar 100% en het percentage normale kiemplanten van 96,7 naar 98%.

Tabel 1

Kwaliteit van de wittekoolzaden na sorteren in 2 klassen d.m.v. chlorofylfluorescentie en zonder sorteren (controle)

chlorofylfluorescentie	laag	hoog	controle
fractie (%)	98,2	1,8	100
gekiemde zaden (%)	100	68	99,4
normale kiemplanten (%)	98	24	96,7
kiemsnelheid t_{50} (dagen)	2,24	2,18	2,23

Voorbeeld 2

Deze proef werd uitgevoerd zoals beschreven in voorbeeld 1 maar nu voor 700 wittekoolzaden (*Brassica oleracea*) cv. 'Megaton F1'. De zaden in de klasse met lage en hoge fluorescentie gaven een gelijke opkomst van 100%, terwijl de lage klasse een verbetering gaf in het percentage normale kiemplanten. De snelheden van opkomst van zowel de lage klasse als de hoge klasse waren nagenoeg gelijk. De verbetering bij deze partij van zeer hoge kwaliteit blijkt niet uit de directe kiemgegevens, maar komt tot stand door een verbetering in het uiterlijk van de kiemplanten. Van de lage klasse had 8% niet egaal groen gekleurde kiemblaadjes (gele vlekken), terwijl bij de hoge klasse dit 26% bedroeg. De resultaten tonen aan dat ook voor Brassica-zaad van zeer hoge kwaliteit door selectie de kwaliteit verbeterd kon worden.

Tabel 2

Kwaliteit van wittekoolzaden na sorteren in 2 klassen d.m.v. chlorofylfluorescentie en zonder sorteren (controle)

chlorofylfluorescentie	laag	hoog	controle
fractie (%)	92,6	7,4	100
gekiemde zaden (%)	100	100	100
normale kiemplanten (%)	99,5	96	99,2
kiemsnelheid t_{50} (dagen)	1,35	1,38	1,36
afwijkende kiemblaadjes (%)	8	26	9,3

1002984

Voorbeeld 3

Deze proef werd uitgevoerd zoals beschreven in voorbeeld 1 maar nu voor 700 wittekoolzaden (*Brassica oleracea*) cv. 'Transam F1'. De zaden in de klasse met lage fluorescentie gaven een opkomst van 99%, terwijl de opkomst bij de hoge klasse 68% bedroeg. Er was tevens een groot verschil tussen het percentage normale kiemplanten voor de lage en hoge klasse, 88 tegen 48%. Er was ook een verbetering in de snelheid van opkomst tussen de lage en hoge klasse. De resultaten tonen aan dat ook voor dit ras Brassicazaad de kwaliteit door selectie op basis van het chlorofylgehalte verbeterd kon worden.

Tabel 3

15

Kwaliteit van wittekoolzaden na sorteren in 2 klassen d.m.v. chlorofylfluorescentie en zonder sorteren (controle)

20

chlorofylfluorescentie	laag	hoog	controle
fractie (%)	92,7	7,3	100
gekiemde zaden (%)	99	64	96,7
normale kiemplanten (%)	88	48	85,1
kiemsnelheid t_{50} (dagen)	1,68	1,97	1,69

1002984

Voorbeeld 4

Deze proef werd uitgevoerd zoals beschreven in voorbeeld 1 maar nu voor 1180 wittekoolzaden (*Brassica oleracea*) in 4 verschillende, willekeurig gekozen klassen.

5 De zaden in de klasse met een zeer lage fluorescentie gaven een opkomst van 100%, allemaal normale kiemplanten. De snelheid van opkomst van deze klasse was bovendien veel beter dan voor de overige klassen en van de zaden vóór selectie (de controlegroep). Er is een negatieve correlatie

10 tussen het chlorofylgehalte en het percentage normale kiemplanten en een positieve correlatie tussen het chlorofylgehalte en de snelheid van opkomst. De kwaliteit van de zaden neemt dus toe naarmate het chlorofylgehalte lager is. De resultaten tonen aan dat de kwaliteit van gebruikelijk

15 in de handel verkrijgbaar Brassica-zaad verbeterd kon worden. De opkomst t.o.v. de controlegroep kon worden verhoogd van 95,6 naar 100% en het percentage normale kiemplanten van 89,7 naar 100%.

20

Tabel 4

Kwaliteit van wittekoolzaden na sorteren in 4 klassen d.m.v. chlorofyl-fluorescentie en zonder sorteren (controle)

	chlorofylfluorescentie	zeer laag	laag	hoog	zeer hoog	controle
25	fractie (%)	41,9	30,1	14,8	13,2	100
	gekiemde zaden (%)	100	100	97	70	95,6
	normale kiemplanten (%)	100	96	90	42	89,7
	kiemsnelheid t_{50} (dagen)	1,34	1,47	1,72	2,82	1,41

1002984

Voorbeeld 5

Met de onderhavige uitvinding werden van 500 suikerbietenzaden (*Beta vulgaris*) individueel het chlorofylfluorescentiesignaal gemeten en vervolgens in 2 verschillende willekeurig gekozen klassen ingedeeld. De procentuele verdeling over de twee klassen is vermeld in tabel 5. Het verschil met koolzaden uit de voorafgaande voorbeelden is dat suikerbietenzaden in een vrucht zitten en dat het chlorofylgehalte van de vruchtwand werd bepaald. De kiemproeven werden
10 uitgevoerd door de zaden eerst te ontsmetten met thiram, daarna vier uur te spoelen bij 25°C en terug te drogen bij dezelfde temperatuur. Daarna werden de zaden ingezet tussen met water bevochtigde vouwfilters in kunststof bakjes in een kiemkast bij een temperatuur van 20°C in het donker. De zaden
15 werden visueel beoordeeld op het verschijnen van het wortelpuntje, waarna de kiemsnelheid, t_{50} , kon worden berekend (tabel 5). Na 7 en 14 dagen werden de kiemplanten beoordeeld volgens de standaard ISTA regels zoals beschreven in "International Rules for Seed Testing 1993", Seed Science and Technology 21, 1993 (tabel 5). De zaden in de klasse met lage
20 fluorescentie gaven een opkomst van 97,5%, terwijl de opkomst bij de hoge klasse 90% bedroeg. Er was tevens een groot verschil tussen het percentage normale kiemplanten voor de lage en hoge klasse, 95 tegen 86%. De snelheid van opkomst van de
25 lage klasse en hoge klasse waren gelijk. De resultaten tonen aan dat ook voor suiker-bietenzaad, waarbij door meting aan het vruchtomhulsel het chlorofylgehalte werd bepaald, de kwaliteit door selectie verbeterd kon worden.

Tabel 5

Kwaliteit van suikerbietenzaden na sorteren in 2 klassen
d.m.v. chlorofylfluorescentie en zonder sorteren (controle)

5	chlorofylfluorescentie	laag	hoog	controle
	fractie (%)	79,6	20,4	100
	gekiemde zaden (%)	97,5	90	96
	normale kiemplanten (%)	95	86	93
	kiemsnelheid t_{50} (dagen)	2,76	2,76	2,76

10

1002984

Voorbeeld 6

Deze proef werd uitgevoerd zoals beschreven in voorbeeld 5 maar nu voor 900 suikerbietenzaden (*Beta vulgaris*) met dit verschil dat de zaden gepolijst waren. De gekozen 5 klassen waren hetzelfde als in voorbeeld 6. De zaden in de klasse met lage fluorescentie gaven een opkomst van 98%, terwijl de opkomst bij de hoge klasse 92% bedroeg. Er was tevens een duidelijk verschil tussen het percentage normale kiemplanten voor de lage en hoge klasse, 97 tegen 90%. De 10 snelheid van opkomst voor de twee klassen waren nagenoeg gelijk. De resultaten tonen aan dat ook voor gepolijst suikerbietenzaad de kwaliteit door selectie verbeterd kon worden.

Tabel 6

15

Kwaliteit van gepolijste suikerbietenzaden na sorteren in 2 klassen d.m.v. chlorofylfluorescentie en zonder sorteren (controle)

20

chlorofylfluorescentie	laag	hoog	controle
fractie (%)	88,9	11,1	100
gekiemde zaden (%)	98	92	97,3
normale kiemplanten (%)	97	90	96,2
kiemsnelheid t_{50} (dagen)	2,40	2,45	2,43

1002984

Voorbeeld 7

Met de onderhavige uitvinding werden van 700 wortelzaden (*Daucus carota*) cv. 'Amsterdam' individueel het chlorofylfluorescentiesignaal gemeten van het vruchtomhulsel en vervolgens in 2 verschillende willekeurig gekozen klassen ingedeeld. De procentuele verdeling over de 2 klassen is vermeld in tabel 7. Het grote verschil met de voorafgaande voorbeelden is dat deze zaden waren ontsmet met thiram waardoor de zaden oranje gekleurd waren. De kiemproeven werden uitgevoerd door de zaden eerst drie dagen onder te dompelen in water bij een temperatuur van 10°C. Daarna werden de zaden ingezet op met water bevochtigd filtreerpapier in kunststof bakjes in een kiemkast bij een wisseltemperatuur van 20°C-30°C, bij 20°C in het donker (16 uur) en bij 30°C in het licht (8 uur). De zaden werden visueel beoordeeld op het verschijnen van het wortelpuntje, waarna de kiemsnelheid, t_{50} , kon worden berekend (tabel 7). Na 7 en 14 dagen werden de kiemplanten beoordeeld volgens de standaard ISTA regels zoals beschreven in "International Rules for Seed Testing 1993", Seed Science and Technology 21, 1993 (tabel 5). De zaden in de klasse met lage fluorescentie gaven een opkomst van 97%, terwijl de opkomst bij de hoge klasse 91% bedroeg. Er was eveneens een verbetering van het percentage normale kiemplanten voor de lage t.o.v. de hoge klasse, 95 tegen 86%. Ook bij de kiemsnelheid was het waar te nemen dat de zaden uit de lage klasse van betere kwaliteit waren dan uit de hoge klasse. De resultaten laten zien dat de vinding verbeteringen gaf voor wortelzaad waarbij zaden behandeld waren met een ontsmettingsmiddel.

Tabel 7

Kwaliteit van ontsmette (thiram) wortelzaden na sorteren in 2
klassen d.m.v. chlorofylfluorescentie en zonder sorteren
5 (controle)

	chlorofylfluorescentie	laag	hoog	controle
	fractie (%)	70,7	29,3	100
	gekiemde zaden (%)	97	91	95,2
	normale kiemplanten (%)	95	86	92,4
10	kiemsnelheid t_{50} (dagen)	1,51	1,70	1,55

Voorbeeld 8

Met de onderhavige uitvinding werden van 500 paprikazaden (*Capsicum annuum*) cv. 'Flair F1' individueel het chlorofylfluorescentiesignaal gemeten en vervolgens in 2
5 verschillende willekeurig gekozen klassen ingedeeld. De procentuele verdeling over de 2 klassen is vermeld in tabel 8. De kiemprouven werden uitgevoerd op een oplossing van water met 0,2% KNO₃ bevochtigd filtreerpapier in kunststof bakjes in een kiemkast bij een wisseltemperatuur van 20°C-30°C, bij 20°C
10 in het donker (16 uur) en bij 30°C in het licht (8 uur). De zaden en kiemplanten werden beoordeeld zoals beschreven in voorbeeld 7. Het verschil met de zaden uit de voorgaande voorbeelden is dat paprikazaden in een vrucht zitten die na rijping van de zaden een hoog vochtgehalte bezitten. Dit in
15 tegenstelling tot de voorgaande voorbeelden, waarbij de vrucht waarin de zaden zich bevinden uitdrogen en de zaden in droge toestand nauwelijks fysiologisch actief meer zijn. Paprikazaden kunnen door hun vochtige omgeving nog wel fysiologisch actief zijn. Na volledig uitgerijpt te zijn, kunnen paprikazaden in
20 kwaliteit achteruit gaan als zij niet op tijd worden gedroogd. De zaden in de klasse met lage fluorescentie gaven een opkomst van 99,5%, terwijl de opkomst bij de hoge klasse 100% bedroeg. Er was tevens een klein verschil tussen het percentage normale kiemplanten voor de lage en hoge klasse, 96 tegen 98%. De
25 verschillen bij de kiemsnelheden waren voor de twee klassen zeer klein. Wel valt op dat de gezondheid van de zaden uit de hoge klasse beter was dan uit de lage klasse: 2,5 tegen 27% infectie (*Alternaria*) op de zaadhuid. Bij deze keuze van de klassen is het dus blijikbaar zo, dat de hoge klasse van betere
30 kwaliteit is dan de lage klasse. Dit is waarschijnlijk toe te schrijven aan het feit dat de kans op aantasting door microflora groter is als de zaden langer in een vochtige omgeving, de vrucht zitten. Uit de kiemresultaten blijkt dat de twee klassen al voldoende waren uitgerijpt, maar dat door verdere
35 uitrijping de kans op infecties toenam.

Tabel 8

Kwaliteit van paprikazaden na sorteren in 2 klassen d.m.v. chlorofylfluorescentie en zonder sorteren (controle)

5	chlorofylfluorescentie	laag	hoog	controle
	fractie (%)	54,8	45,2	100
	gekiemde zaden (%)	99,5	100	99,7
	normale kiemplanten (%)	96	98	96,9
	kiemsnelheid t_{50} (dagen)	3,99	4,27	4,06
10	infectiegraad (%)	27	2,5	15,9

Voorbeeld 9

Deze proef was uitgevoerd op analoge wijze als beschreven in voorbeeld 8 maar nu voor 600 paprikazaden (15 *Capsicum annuum*) cv. 'Kelvin F1' en ingedeeld na het meten van de chlorofylfluorescentie in 3 klassen. De zaden in de klasse met lage fluorescentie gaven een opkomst van 98%, terwijl de opkomst bij de midden en hoge klasse 100% bedroeg. Er was tevens een verbetering van het percentage normale kiem-
 20 planten van respectievelijk 100 tegen 97,5 tegen 92% voor de hoge, midden en lage klasse. Bij geen van de klassen zijn infecties van de zaden waargenomen. Bij de indeling van de zaden in deze 3 klassen was het blijkbaar zo dat de lage klasse van lagere kwaliteit was dan de midden klasse en de
 25 hoge klasse net iets beter in kwaliteit dan de midden klasse. Zaden uit deze twee laatste klassen waren nagenoeg van dezelfde kwaliteit.

Tabel 9

Kwaliteit van paprikazaden na sorteren in 3 klassen d.m.v.
chlorofylfluorescentie en zonder sorteren (controle)

5	chlorofylfluorescentie	laag	midden	hoog	controle
	fractie (%)	11,7	79,8	8,5	100
	gekiemde zaden (%)	98	100	100	99,8
	normale kiemplanten (%)	92	97,5	100	97,1
	kiemsnelheid t_{50} (dagen)	3,92	3,97	4,05	3,97

10

1002984

Voorbeeld 10

Met de onderhavige uitvinding werden van 500 tomatenzaden (*Lycopersicon esculentum*) cv. 'Tanaki' individueel het chlorofylfluorescentiesignaal gemeten en vervolgens in 3 verschillende willekeurig gekozen klassen ingedeeld. De procentuele verdeling over de drie klassen is vermeld in tabel 10. De kiemproeven werden uitgevoerd op filtreerpapier bevochtigd met een oplossing van water met 0,2% KNO₃ in kunststof bakjes in een kiemkast bij een wisseltemperatuur van 20°C-30°C, bij 20°C in het donker (16 uur) en bij 30°C in het licht (8 uur). De zaden en kiemplanten werden beoordeeld en de kiemsnelheid, t_{50} , werd berekend zoals beschreven in voorbeeld 7. Net als bij paprikazaden zitten tomatenzaden na rijping van de zaden in de vrucht bij een hoog vochtgehalte. Na volledig uitgerijpt te zijn, kunnen tomatenzaden in kwaliteit achteruitgaan als zij niet op tijd worden gedroogd. Uit de tabel blijkt dat de middenklasse zaden bevat met de beste kwaliteit. Dit volgt uit resultaten voor de kiemsnelheid en normale kiemplanten. De lage klasse was van slechtere en de hoge klasse van nog slechtere kwaliteit. Uit de resultaten blijkt dat met de vinding klassen konden worden gemaakt waarbij de kwaliteit van de tomatenzaden in de middenklasse het hoogst was en verbeterd kon worden t.o.v. de controlegroep.

Tabel 10

Kwaliteit van tomatenzaden na sorteren in 3 klassen d.m.v. chlorofylfluorescentie en zonder sorteren (controle)

chlorofylfluorescentie	laag	midden	hoog	controle
fractie (%)	13,4	74,8	11,8	100
gekiemde zaden (%)	100	99,5	96	99,2
normale kiemplanten (%)	94	97,5	84	95,4
kiemsnelheid t_{50} (dagen)	4,02	3,72	4,35	3,79

1002984

Voorbeeld 11

In Figuur 2 is het resultaat uitgezet van de meting van het chlorofylgehalte door middel van chlorofylfluorescentie in tomatenzaden (*Lycopersicon esculentum*) cv. 'Moneymaker' verkregen van R.H. Ellis, Department of Agriculture, University of Reading, Early Gate, PO Box 236, Reading RG6 2AT, UK en beschreven door I. Demir en R.H. Ellis in "Changes in seed quality during seed development and maturation in tomato", Seed Science Research (1992) 2, 81-87. De zaden werden tijdens verschillende rijpheidsstadia verzameld, d.w.z. verschillende dagen na bestuiving. Demir et al. vonden dat de kieming van normale zaaillingen voor de eerste en tweede tros vergelijkbaar waren, terwijl bij de derde tros de zaden die normale kiemplanten opleverden ongeveer 10 dagen eerder kiemden. Uit de metingen van het chlorofylgehalte bleek dat tomatenzaden uit de eerste en de tweede tros overeenkomstige chlorofylgehaltes hadden (Figuur 2) dus vergelijkbare rijpheden op een gelijk aantal dagen na bestuiving. De zaden uit de derde tros van dezelfde plant lopen ongeveer 10 dagen in rijpheid vóór. Dit kan een verklaring geven voor de snellere opkomst van de zaden van de derde tros. De tomatenzaden werden in 1989/1990 verzameld, wat aangeeft dat de bepaling volgens deze uitvinding na vijf jaar nog steeds mogelijk was. Dit is vanwege het feit dat chlorofyl een stabiel molecuul is, dat niet gemakkelijk wordt afgebroken wanneer zaden in een droge toestand worden bewaard.

De resultaten geven aan dat met de vinding de rijpheid van tomatenzaden kon worden bepaald en een verklaring kon worden gegeven voor het verschil in kieming van tomatenzaden van de eerste/tweede tros en de derde tros.

1002984

5

C O N C L U S I E S

10

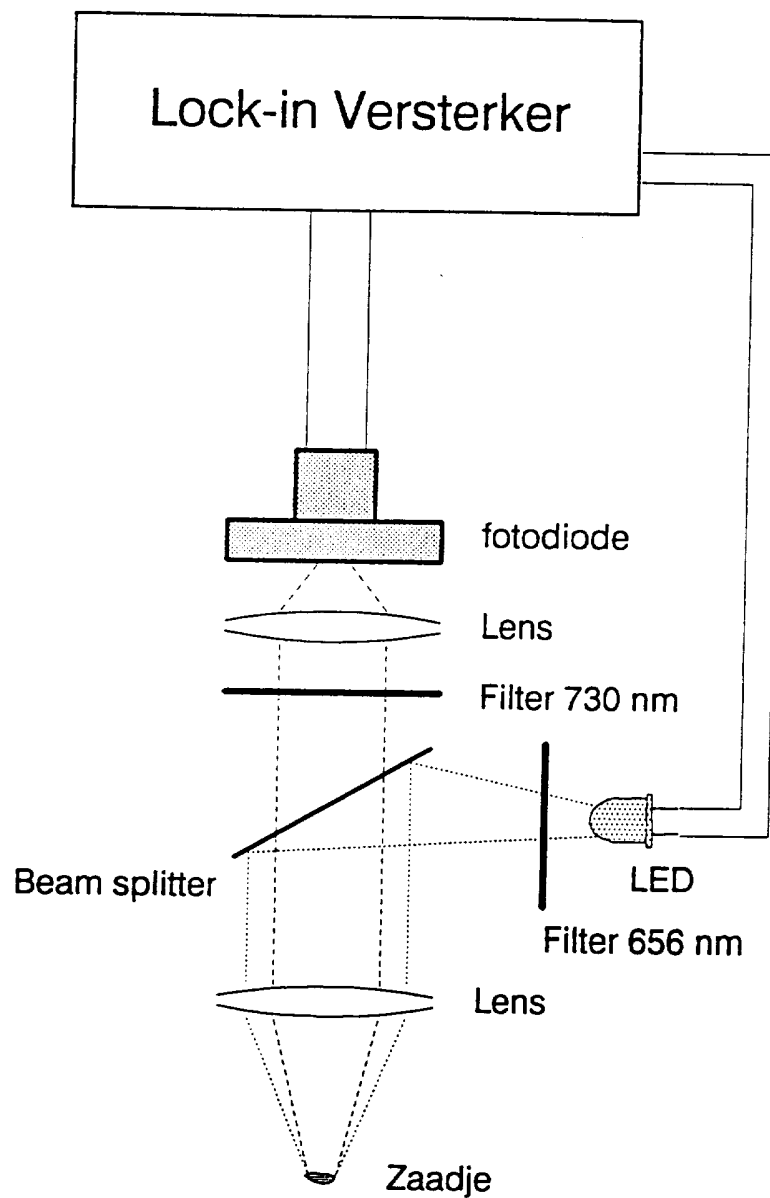
1. Werkwijze voor het bepalen van de kwaliteit en rijpheid van vruchten, zaden, zaadbeginselen, kunstzaden en bloemen door de hoeveelheid chlorofyl te bepalen door bestraling met electromagnetische straling, **met het kenmerk**, dat de
15 electromagnetische straling een zodanige golflengte heeft dat het chlorofyl directe fluorescentie vertoont, welke fluorescentie wordt gemeten.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, **met het kenmerk**, dat de ingestraalde elektromagnetische straling een golflengte
20 heeft van ongeveer 435 of 670 nm en dat fluorescentie bij ongeveer 690 of 730 nm wordt gemeten.

3. Inrichting voor het bepalen van de rijpheid en kwaliteit van vruchten, zaden, zaadbeginselen, kunstzaden en bloemen, tenminste bestaande uit een lichtbron die licht geeft
25 met een golflengte die geschikt is om chlorofyl te doen fluoresceren en een meetinrichting die de fluorescentie van chlorofyl kan detecteren.

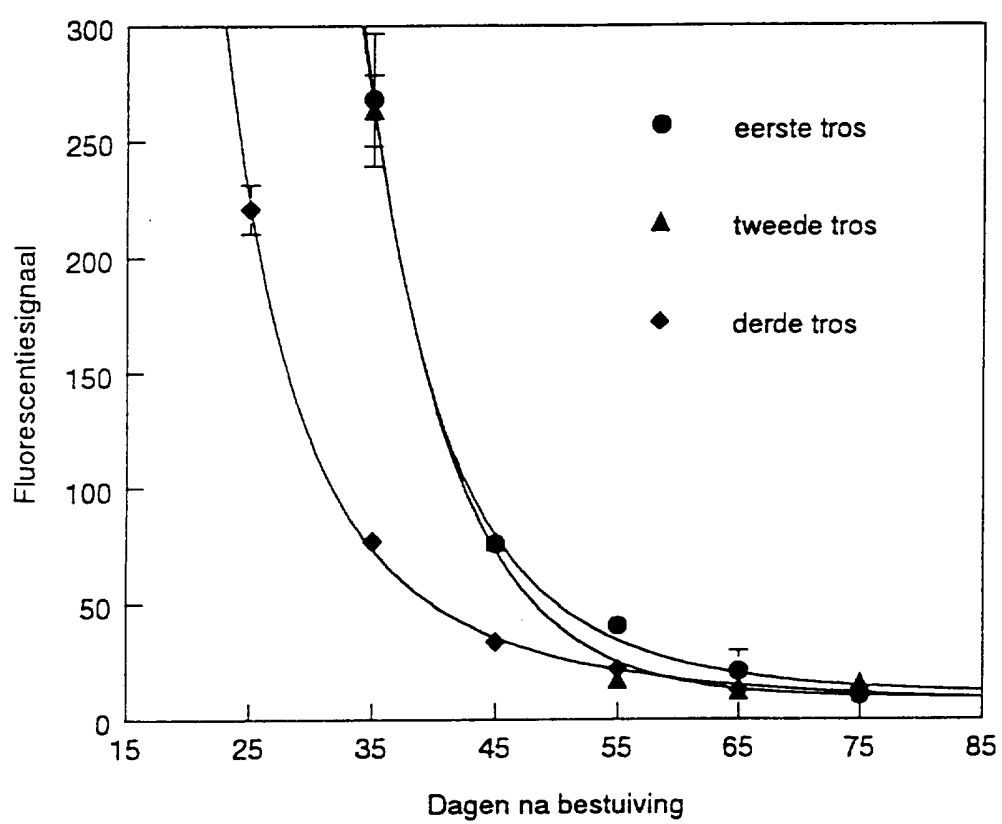
4. Inrichting voor het scheiden op basis van chlorofylgehalte van vruchten, zaden, zaadbeginselen, kunstza-
30 den en bloemen, tenminste bestaande uit een toevoergedeelte voor de vruchten, zaden, zaadbeginselen, kunstzaden en bloemen, een meetgedeelte voor het bepalen van het chlorofylgehalte van de vruchten, zaden, zaadbeginselen, kunstzaden en bloemen, en een scheidingsgedeelte dat werkt op basis van de
35 hoeveelheid chlorofyl die is gemeten in het meetgedeelte, **met het kenmerk**, dat het meetgedeelte overeenkomt met de inrichting volgens conclusie 3.

1002984



Figuur 1. Schematische weergave van de gebruikte apparatuur

1002984



Figuur 2. Metingen aan tomatenzaden van verschillende rijpingsstadia.

1002984

**SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)
RAPPORT BETREFFENDE
NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE**

IDENTIFIKATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE	Kenmerk van de aanvrager of van de gemachtigde 150084
Nederlandse aanvrage nr. 1002984	Indieningsdatum . 2 mei 1996
	Ingeroepen voorrangsdatum
Aanvrager (Naam) CENTRUM VOOR PLANTENVEREDELINGS- EN REPRODUKTIEONDERZOEK (CPRO-DLO)	
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type --	Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek (ISA) aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. SN 27603 NL
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)	
Volgens de internationale classificatie (IPC) Int. Cl. ⁶ : G 01 N 21/64, A 01 C 1/00, B 07 C 5/342	
II. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK	
Onderzochte minimum documentatie	
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen
Int. Cl. ⁶	G 01 N
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)	

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1002984

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
IPC 6 G01N21/64 A01C1/00 B07C5/342

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

B. ONDERZOCHETE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)
IPC 6 G01N

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

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

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie *	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	EP,A,0 434 644 (CONSIGLIO NAZIONALE RICERCHE) 26 Juni 1991 zie bladzijde 3, regel 14 - regel 18; conclusie 1 zie bladzijde 2, regel 32 - regel 34 zie bladzijde 2, regel 1 - regel 3 ---	1-3
X	ASEAN FOOD JOURNAL, deel 3, nr. 2, Juni 1987, bladzijden 55-59, XP000610212 R.M.SMILLIE ET AL.: "Applications of Chlorophyll Fluorescence to the Postharvest Physiology and Storage of Mango and Banana Fruit and the Chilling Tolerance of Mango Cultivars" zie het gehele document --- -/--	1-4



Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.



Leden van dezelfde octrooifamilie zijn vermeld in een bijlage

* Speciale categorieën van aangehaalde documenten

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document dat deel uitmaakt van dezelfde octrooifamilie

Datum waarop het nieuwheidsonderzoek van internationaal type werd voltooid

25 November 1996

Verzenddatum van het rapport van het nieuwheidsonderzoek van internationaal type

Naam en adres van de instantie

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

De bevoegde ambtenaar

Scheu, M

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1002984

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie *	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	EP,A,0 237 363 (NORRISH RICHARD JOHN ;WISKICH JOSEPH TONY (AU); LUMINIS PTY LTD (A) 16 September 1987 zie samenvatting; conclusies 1,4-6 ---	1-3
A	PHOTOBIOCHEMISTRY AND PHOTOBIOPHYSICS, deel 9, 1985, bladzijden 89-97, XP000609941 W.SCHMIDT: "Prompt and delayed fluorescence in mature tobacco leaves: a spectral comparison" zie bladzijde 89 - bladzijde 90 zie bladzijde 94 ---	1-3
T	internet http://www.optisci.com/msu/index.htm N.A.MIR ET AL.: "Chlorophyll Fluorescence and Whole Fruit Senescence ..." XP002019311 ---	
T	internet http://www.optisci.com/msu2/index.htm J.Song ET AL.: "Chloroplast Fluorescence can be Used as a Nondestructive Tool..." XP002019312 -----	

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

NL 1002984

EP-A-0434644	26-06-91	IT-B-	1236230	25-01-93
EP-A-0237363	16-09-87	AU-B-	587534	17-08-89
		AU-A-	7017187	17-09-87
		US-A-	4804850	14-02-89