

19



Bureau voor de  
Industriële Eigendom  
Nederland

11 1003239

12 C OCTROOI<sup>20</sup>

21 Aanvraag om octrooi: 1003239

51 Int.Cl.<sup>6</sup>  
A01H1/02

22 Ingediend: 31.05.96

41 Ingeschreven:  
03.12.97

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

47 Dagtekening:  
03.12.97

72 Uitvinder(s):  
Pieter Barten te Noord Scharwoude

45 Uitgegeven:  
02.02.98 I.E. 98/02

74 Gemachtigde:  
Drs. A.J.W. Hooiveld c.s. te 2517 GK Den Haag.

54 **Cytoplasmatisch mannelijk steriele Brassica oleracea plant, alsmede werkwijze voor het verkrijgen van een dergelijke plant.**

57 B. oleracea plant waarvan het cytoplasma middels protoplasten fusie is voorzien van mitochondriën met DNA dat althans gedeeltelijk afkomstig is van een B. napus plant, en dat is gekoppeld aan (de eigenschap van) cytoplasmatisch mannelijke steriliteit (CMS), dat wil zeggen verantwoordelijk is voor cytoplasmatisch mannelijke steriliteit bij de B. oleracea plant en waarvan cellen zijn voorzien van voor deze plant normaal, soorteigen kerngenoom.

NL C 1003239

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

**CYTOPLASMATISCH MANNELIJK STERIELE BRASSICA OLERACEA PLANT,  
ALSMEDE WERKWIJZE VOOR HET VERKRIJGEN VAN EEN DERGELIJKE  
PLANT**

5 De uitvinding heeft betrekking op een cytoplasmatisch  
mannelijk steriele Brassica oleracea plant overeenkomstig  
de hoofdconclusie, dat wil zeggen op de ontwikkeling van  
nieuwe ouderlijnen van een dergelijke plant. De uitvinding  
heeft voorts betrekking op een werkwijze om de eerderge-  
10 noemde cytoplasmatisch mannelijk steriele plant te  
verkrijgen, alsmede op hybride zaad verkregen uit de nieuwe  
ouderlijnen.

Brassica gewassen worden al enkele eeuwen gebruikt als  
15 voedselgewassen , terwijl de zaadinhoud daarvan als basis  
fungeert van diverse voedselprodukten (spijsolie, mosterd  
etcetera).

Sinds 1970 worden verschillende Brassica groentesoorten in  
20 de vorm van hybride zaden verkocht. Dergelijke zaden leiden  
tot hybride Brassica planten die als kruisingsprodukt van  
twee sterk ingeteelde ouderlijnen de erfelijke eigenschap-  
pen daarvan in zich verenigen. Indien één of beide  
ouderlijn(en) (gedeeltelijk) zelfbestuivend is/zijn, dienen  
25 maatregelen te worden genomen om zelfbestuiving tegen te  
gaan, teneinde zuiver hybride Brassica planten te verkrij-  
gen. Eén anti-zelfbestuivingsmaatregel maakt gebruik van  
zogenaamde zelf-incompatibiliteit van één of beide  
ouderlijnen. Daarbij wordt voorkomen dat fertiele stuif-  
30 meelkorrels in staat zijn te groeien in de stempel van  
specifieke planten, waaronder de stempel van de stuifmeel-  
korrels producerende Brassica plant zelf. Een bezwaar van  
deze methodiek is dat in sommige gevallen toch zelfbestui-  
ving optreedt. Dit resulteert in zaadpartijen met een te  
35 hoog percentage inteelt. Een andere maatregel om zelfbe-

1003239

stuiving van één van beide ouderlijnen te voorkomen, gaat uit van het gebruik van cytoplasmatisch mannelijke steriliteit (CMS). In radijs (Raphanus sativus) is namelijk een cytoplasma gevonden dat mannelijke steriliteit

5 verleent, welk cytoplasma ook wel bekend staat als Ogura CMS cytoplasma. Via protoplasten fusie worden mitochondriën van het Ogura CMS cytoplasma geïntroduceerd in Brassica oleracea planten, waarbij de kern afkomstig is van normaal vruchtbare B. oleracea planten. Aldus worden CMS B.

10 oleracea planten verkregen. De in het Ogura CMS cytoplasma aanwezige chloroplasten met DNA verantwoordelijk voor koudegevoeligheid van planten met dit cytoplasma zijn door middel van de uitgevoerde fusies verwijderd.

15 Het is het doel van de uitvinding een cytoplasmatisch mannelijk steriele B. oleracea plant te verkrijgen, waarbij de eerdergenoemde bezwaren volgens de stand van de techniek worden ondervangen en waarbij een alternatief wordt geboden voor het Ogura CMS cytoplasma, en daartoe is het cytoplasma

20 van deze plant middels protoplasten fusie voorzien van mitochondriën met DNA dat althans gedeeltelijk afkomstig is van een Brassica napus plant en dat is gekoppeld aan (de eigenschap van) cytoplasmatisch mannelijke steriliteit, dat wil zeggen verantwoordelijk is voor cytoplasmatisch

25 mannelijke steriliteit bij de B. oleracea plant. Uit uitvoerig onderzoek is verrassenderwijs gebleken dat, ondanks het feit dat B. napus planten normaal fertiel zijn, middels protoplasten fusie op efficiënte wijze cytoplasmatisch mannelijke steriliteit in een B. oleracea plant kan

30 worden gecreëerd door gebruik te maken van geschikt mitochondriaal DNA van een B. napus plant. De eerdergenoemde protoplasten fusie wordt bij voorkeur uitgevoerd met enerzijds bladprotoplasten van de B. napus plant (donor) en anderzijds hypocotyl protoplasten van de B. oleracea plant

35 (acceptor).

1003239

In een voorkeursuitvoeringsvorm overeenkomstig de uitvinding is het cytoplasma van de B. oleracea plant voorts voorzien van voor deze plant normaal, soorteigen kernge-  
5 noom. Hierdoor is sprake van een 100% raszuiver produkt.

In een volgende voorkeursuitvoeringsvorm volgens de uitvinding zijn de cellen voorzien van voor B. napus normaal, soorteigen mitochondriën.

10

In een volgende voorkeursuitvoeringsvorm overeenkomstig de uitvinding zijn de soorteigen mitochondriën geïntroduceerd middels somatische hybridisatie. Bij celfusie blijft de kern gecodeerde genetische samenstelling van een plant  
15 welke het cytoplasma ontvangt (bij voorkeur in zijn geheel) onaangetast. Een terugkruisingsprogramma is derhalve niet nodig, daar het cytoplasma in één keer van het gewenste type is. In de praktijk blijken uit protoplasten fusie ontstane B. oleracea planten veelal tetraploïd of aneuploïd  
20 te zijn. Ploidie niveaus kunnen hierbij oplopen tot meer dan 10 maal C, waarbij C voor haploïd genoom staat. Planten met een niet diploïd genoom worden gekarakteriseerd door een afwijkende groei en door een mannelijke en vrouwelijke steriliteit. Gebruik makend van flowcytometrie worden alle  
25 niet zuiver diploïde planten uit een populatie via fusie gegenereerde B. oleracea planten verwijderd. De resulterende diploïde planten worden onderworpen aan een moleculaire analyse; door middel van deze analyse wordt vastgesteld welke van de planten mitochondriaal DNA (of een fragment  
30 daarvan) bezitten waarvan bekend is dat dit genetisch nauw gekoppeld is aan CMS.

In een volgende voorkeursuitvoeringsvorm volgens de uitvinding is de B. oleracea plant gekozen uit de groep

35

**1003239**

- bloemkool (B. oleracea L. convar. botrytis (L.) Alef. var. botrytis L.),
- broccoli (B. oleracea L. convar. botrytis (L.) Alef. var. cymosa Duch.),
- 5 - Romanesco (B. oleracea L. convar. botrytis (L.) Alef. var. botrytis L.),
- spruitkool (B. oleracea L. convar. oleracea var. gemnifera DC.),
- witte kool (B. oleracea L. convar. capitata (L.) Alef. var. alba DC.),
- 10 - spitskool (B. oleracea L. convar. capitata (L.) Alef. var. alba DC.),
- rode kool (B. oleracea L. convar. capitata (L.) Alef. var. rubra DC.),
- 15 - savooie kool (B. oleracea L. convar. capitata (L.) Alef. var. sabauda L.),
- koolrabi (B. oleracea L. convar. acephala (DC.) Alef. var. gongyloides),
- boerenkool (B. oleracea L. convar. acephala (DC.) Alef. var. sabellica L.),
- 20 - portugese kool (B. oleracea var. tronchuda syn. costata).

De uitvinding heeft tevens betrekking op zaden of plantede-  
25 len afkomstig van de plant volgens de uitvinding.

Voorts heeft de uitvinding betrekking op een werkwijze als beschreven in de hieronder staande voorbeelden.

- 30 Zaden van zowel een B. napus (donor) als een B. oleracea plant (acceptor) worden gesteriliseerd en gekiemd op MS30 of een soortgelijk medium; voor de donor gebeurt dit in licht, planten worden aangehouden door topjes af te snijden en op vers medium te plaatsen. Zaden van de acceptor kiemen
- 35 in donker; van de ontstane geëtioleerde plantjes wordt het

**1003239**

hypocotyl gebruikt. Protoplasten worden geïsoleerd door blad- respectievelijk hypocotylmateriaal na preplasmolyse te behandelen met celwandoplossende enzymen als pectinase en cellulase; dit gebeurt in een plasmolyserende oplossing.

5 Na filtratie en centrifugatie worden de protoplasten van de donor bestraald met gamma straling. De protoplasten van de acceptor worden behandeld met IOA waarna beide soorten protoplasten worden gefuseerd. Bij deze fusie dient PEG als agens om agglutinatie te bevorderen; een hoge pH tijdens

10 fusie is essentieel. Tijdens de fusie worden de protoplasten niet beroerd om het versmeltingsproces niet te verstoren. Na de fusie wordt de PEG oplossing gewassen en vervangen door regeneratiemedium. Regeneratie van de protoplasten vindt plaats in dit medium, waarin de

15 aanwezigheid van suikers als sucrose en hormonen als 2,4D, BA en NAA en dergelijke doorslaggevend zijn. Gedurende de regeneratie wordt de osmotische waarde van het regeneratiemedium stapsgewijs verlaagd door medium toe te voegen met een afnemende concentratie sucrose. Ontstane microcalli

20 worden overgebracht op vast regeneratiemedium. Iedere twee weken worden de calli op vers regeneratiemedium gebracht. Ontstane scheutjes worden geplaatst op bewortelingsmedium, waarin wortelvorming wordt bevorderd door een phytohormoon als IAA. Geregenereerde planten worden onderzocht op hun

25 ploïdieniveau door een bladmonster te nemen en met een flowcytometer de relatieve DNA inhoud van de kernen vast te stellen. Planten welke het zuiver diploïde genoom bevatten worden aangehouden, de overige planten worden vernietigd. De overgebleven planten worden verder geanalyseerd met

30 behulp van moleculaire technieken. Gebruikmakend van DNA geïsoleerd uit blad wordt met behulp van een probe specifiek voor het mitochondriaal DNA onderzocht of de juiste mitochondriën in de planten aanwezig zijn. Planten met het cytoplasma van de acceptor (te beschouwen als

35 ontsnappers) worden vernietigd. De overgebleven planten

worden door middel van kruising vermeerderd en onder kas- en veldcondities onderzocht op hun bruikbaarheid. Hierbij wordt onder andere gelet op steriliteit, zaadzetting en kwaliteit van de plant.

5

De uitvinding zal nader worden toegelicht aan de hand van hier onder besproken voorbeelden, die alle voorkeursvarianten volgens de uitvinding vormen.

10 **Voorbeeld 1. Oppervlakte sterilisatie van zaad.**

Zaden van kool (B. oleracea) worden in een filtreerpapier gevouwen en dit wordt 10 seconden ondergedompeld in een mengsel bestaande uit 70 % ethanol/30 % water; daarna volgt een onderdompeling in steriel water van 55°C gedurende 5  
15 minuten. Na deze behandeling volgt een behandeling met 0,3 % (w/v) NaOCl + Tween80 gedurende 20 minuten; deze behandeling vindt plaats in een laminair flowkast.

20 Na deze behandeling wordt het zaadpakketje 3 maal gespoeld met steriel water, gedurende respectievelijk 5, 5 en 10 minuten.

25 **Voorbeeld 2. Uitzaaïen van het uitgangsmateriaal voor hypocotyl protoplasten.**

Na een laatste spoeling wordt het zaadpakketje geopend en worden op  $\frac{1}{2}$ MS15 medium in een container geplaatst. De containers worden bij 25 °C in het donker weggezet. Na  $\pm$  7  
30 dagen zijn de hypocotylen bruikbaar voor protoplastisolatie.

**Voorbeeld 3. Uitzaaïen van het uitgangsmateriaal voor blad protoplasten.**

1003239

De gesteriliseerde zaden worden uitgezaaid als in voorbeeld 2. De containers worden bij 25°C in het licht weggezet. Na 14 tot 28 dagen zijn de plantblaadjes bruikbaar voor protoplastisolatie; topjes van de plantjes worden op vers 5 BB geplaatst; de containers worden bij 25°C in het licht weggezet. Het volgroeide blad wordt voor protoplastisolaties gebruikt.

#### **Voorbeeld 4. Protoplast isolatie.**

10

Het blad- en hypocotylmateriaal wordt in glazen petrischalen (ø 11 cm) of petrischalen van TC-kwaliteit (ø 9 cm) met daarin een bodempje (12 ml) plasmolyse-oplossing fijn gesneden. Na het snijden wordt hieraan 12 ml plasmolyse- 15 oplossing toegevoegd.

De petrischalen worden in aluminiumfolie ingepakt en blijven gedurende minstens één uur in een laminair flowkast staan.

20

Na dit uur wordt de plasmolyse oplossing vervangen door ± 24 ml verse enzymoplossing.

Het geheel wordt in aluminiumfolie overnacht weggezet bij 25 25°C; het enzymmengsel voor het verkrijgen van de hypocotylprotoplasten op een schudder, maar die voor de bladprotoplasten niet! Deze schudder wordt ingesteld op 30 rpm., de amplitude van de schudbeweging is 15 mm.

30 Na de incubatie wordt de suspensies gefiltreerd over een teflon filterhouder met twee nylon filters van respectievelijk 110 µm en 53 µm. De filters worden nagespoeld met 1/3 volume CPW16 (± 8 ml).

**1003239**

De suspensies worden gedurende 5 minuten gecentrifugeerd bij 110 x g).

De ontstane bandjes, met daarin de protoplasten, worden opgezogen met een steriele Pasteurpipet en overgebracht in een nieuwe centrifugebuis. Hierna worden de protoplastensuspensies, na voorzichtig met  $\pm$  9 ml W5 aangevuld te zijn, gedurende 5 minuten gecentrifugeerd bij 75 x g.

10 De bladprotoplasten worden als volgt verder behandeld: het supernatant van de verschillende centrifugebuizen wordt afgegoten en de pellets worden voorzichtig geresuspendeerd in 1-2 ml W5. De inhoud van de verschillende centrifugebuizen wordt samengevoegd en tot 10 ml aangevuld met W5.

15

Het centrifugebuisje met de protoplasten (donor) wordt afgesloten met Parafilm, omwikkeld met aluminiumfolie en overgebracht op ijs tot bestraling plaatsvindt met 50 kRad.

20 De hypocotylprotoplasten worden op de volgende manier verder behandeld: het supernatant van de verschillende centrifugebuizen wordt afgegoten en de pellets worden voorzichtig geresuspendeerd in 1-2 ml W5 + 2 mM IOA (4°C). De inhoud van de verschillende centrifugebuizen wordt samengevoegd, tot 10 ml aangevuld met W5 + 2 mM IOA en gedurende 10 minuten in de koelkast bij 4°C geïncubeerd.

Hierna wordt de suspensie 5 minuten gecentrifugeerd bij 75 x g (de totale incubatietijd in de IOA is dus 15 minuten).

30

Het pellet wordt geresuspendeerd in 1-2 ml W5 en de suspensie wordt, aangevuld met W5 tot 10 ml, overgebracht in een steriel flesje van 50 ml. Dit flesje wordt, in aluminiumfolie gehuld, gedurende de tijd dat de protoplasten bestraald worden op een schudder ( $\pm$  30 r.p.m.;

**1003239**

amplitude 15 mm) bij 25 °C geïncubeerd. Hierna wordt de inhoud van het flesje overgebracht naar een centrifugebuis.

Beide buizen met zowel de blad- als hypocotylprotoplasten  
5 worden 5 minuten gecentrifugeerd bij 75 x g, waarna het pellet wordt geresuspendeerd in 1-3 ml W5.

Met behulp van de haemocytometer wordt de dichtheid van beide protoplastensuspensies bepaald.

10

#### **Voorbeeld 5. Protoplastfusie.**

Van beide suspensies worden de protoplasten in een dichtheid van  $9 \cdot 10^7$  protoplasten/ml samengevoegd voor de  
15 fusie.

Met behulp van een microliterpipet worden 40 µl druppels in een petrischaal geplaatst:

20 11 druppels van 40 µl in een petrischaal van ø 6 cm of 25 druppels van 40 µl in een petrischaal van ø 9 cm

Het deksel wordt op het petrischaaltje geplaatst, waarna het licht wordt uitgeschakeld en de laminair flowkast  
25 gedurende 15 minuten uitgezet, zodat de protoplasten zich kunnen vasthechten aan de petrischaalbodem.

De laminair flowkast wordt weer aangezet en aan elke druppel met protoplasten wordt voorzichtig 60 µl PEG-  
30 oplossing toegevoegd.

Na 3-5 minuten wordt aan de petrischalen SV I toegevoegd:

4 ml in een petrischaal van ø 6 cm

**1003239**

9 ml in een petrischaal van  $\varnothing$  9 cm

Na 3-5 minuten wordt de oplossing afgezogen en SV II toegevoegd:

4 ml in een petrischaal van  $\varnothing$  6 cm

5 9 ml in een petrischaal van  $\varnothing$  9 cm

Na 3-5 minuten wordt de oplossing afgezogen en voorzichtig 8p toegevoegd:

4 ml in een petrischaal van  $\varnothing$  6 cm

10 9 ml in een petrischaal van  $\varnothing$  9 cm

Het is belangrijk dat het 8p medium voorzichtig wordt toegevoegd, omdat de protoplasten anders te vroeg van de bodem van het petrischaaltje los komen.

15 Na 3-5 minuten wordt het 8p medium afgezogen en nieuw 8p medium toegevoegd. Nu mogen de protoplasten van de petrischaalbodemp los komen:

4 ml in een petrischaal van  $\varnothing$  6 cm

9 ml in een petrischaal van  $\varnothing$  9 cm

20 De petrischalen worden met Parafilm afgesloten en bij een lichtintensiteit van  $\pm$  500 lux weggezet.

### **Voorbeeld 6. Regeneratie**

25 Op de achtste dag na fusie wordt aan de petrischalen 8pA toegevoegd tot 3x het oorspronkelijke volume, dat wil zeggen:

8 ml aan een petrischaal van  $\varnothing$  6 cm

18 ml aan een petrischaal van  $\varnothing$  9 cm

30 De petrischalen worden in het licht geplaatst.

Op de vijftiende dag na de fusie worden de microcalli die in de fusieschalen aan de bodem zijn vastgehecht met de vlakke kant van een gesteriliseerde spatel voorzichtig afgeschraapt. De inhoud van de petrischaal wordt met behulp

**1003239**

van een 10 ml pipet verdeeld over vier centrifugebuizen en gedurende 5 minuten bij 75 x g gecentrifugeerd. In de vier nieuwe petrischalen wordt ondertussen 6 ml K<sub>3</sub>PPS-V medium gepipetteerd. Na het centrifugeren wordt het supernatant  
 5 afgegoten en wordt aan het pellet 6 ml K<sub>3</sub>PPS-V toegevoegd. Het pellet bestaat uit delende cellen en microcalli en is zeer eenvoudig te resuspenderen in het K<sub>3</sub>PPS-V medium. Met behulp van een 10 ml pipet wordt het medium en het pellet opgezogen en in de gereedstaande petrischalen gepipetteerd.  
 10 Vanaf dag 21 na fusie worden de gevormde microcalli vanuit het K<sub>3</sub>PPS-V medium overgeënt op K<sub>3</sub>PPS-R medium. De groeiende (micro)calli worden elke 2 weken op vers K<sub>3</sub>PPS-R medium overgezet.

15 Zodra de calli scheutvorming vertonen, worden ze overgezet in containers met K<sub>3</sub>PPS-R medium. Zodra de scheuten groot genoeg zijn, worden deze geoogst en op bewortelingsmedium (BB medium) overgezet.

## 20 **Voorbeeld 7. Flowcytometrische bepalingen**

Van een te analyseren plant wordt een bladmonster van ongeveer 1 cm<sup>2</sup> genomen en overgebracht in 2 ml DAPI oplossing. Met een scherp scheermes wordt dit blad fijngesneden  
 25 en gefiltreerd door een 15 µm filter. Het monster wordt gemeten met een Partec CA-II cell analyzer volgens de methode van De Laat *et al.* De relatieve DNA-inhoud van de planten is bepaald door de piek-posities van de fusieplanten te vergelijken met die van diploïde planten.

30

## **Voorbeeld 8. Moleculaire bepalingen**

B. oleracea planten met cytoplasmatisch mannelijke steriliteit verkregen door middel van somatische hybridisatie,

1003239

worden onderscheiden van B. oleracea planten met ander cytoplasma (andere koolsoorten inclusief die met ogura cytoplasma) met behulp van een DNA probe. Deze probe bestaat uit een mitochondriaal B. napus DNA fragment geïsoleerd uit B. oleracea planten met het steriele fenotype en na digestie met EcoRI gekloneerd in Escherichia coli. De band wordt gekenmerkt door het feit dat zij weer uit het E. coli plasmide DNA te knippen is met EcoRI en op een kenmerkende manier hybridiseert met mitochondriaal DNA van B. oleracea (zie figuur).

Van te analyseren planten wordt 200 milligram blad verzameld in een reageerbuisje en met vloeibare stikstof bevroren. Hieraan wordt 750 µl extractiebuffer toegevoegd en met een Potterstaaf gehomogeniseerd. Het monster wordt 10 minuten bij 13000 x g gecentrifugeerd en het supernatant inclusief het groene materiaal voorzichtig afgegoten. Aan het pellet wordt 125 µl extractiebuffer toegevoegd, na resuspenderen wordt 135 µl lysisbuffer en 60 µl laurylsarcosine oplossing toegevoegd. Na kort mengen wordt het mengsel wordt gedurende 20 minuten tot 65°C verwarmd. Voeg 375 µl chloroform/isoamylalcohol toe en schud de reactievaatjes minimaal 40 maal. Centrifugeer 10 minuten bij 13000 x g; breng de bovenfractie over naar een nieuw reactievaatje, en herhaal de CHCl<sub>3</sub>/IAA stap zonodig een keer. Voeg tenslotte 500 µl isopropanol toe en schud de reactievaatjes enkele malen. Centrifugatie volgt gedurende 5 minuten bij 13000 x g. Het pellet wordt geresuspendeerd in 500 µl TE buffer.

Digestie van DNA met restrictie-endonucleasen wordt als volgt uitgevoerd: voor RFLP analyse is ongeveer 4 µg DNA nodig. Het uiteindelijke mengsel waarin restrictie plaatsvindt bestaat uit 0,1 volume universele knip-buffer als One-Phor-All Buffer PLUS (Pharmacia), 4 µg DNA, 4mM spermi-

**1003239**

dine en 2 units restrictieenzym. Incubatie vindt plaats bij 37°C gedurende minimaal 3 uur.

De reactie wordt gestopt door vanuit een stock-oplossing de  
5 EDTA concentratie op 10 mM te brengen. Het DNA wordt  
geprecipiteerd door 0,1 volume 3 M NaAc en 2,5 volume  
ethanol van -20°C toe te voegen. Het mengsel wordt 2 uur op  
-20°C gehouden; na centrifugatie gedurende 10 minuten bij  
10000 x g wordt het pellet gewassen met ijskoude 70 %  
10 ethanol/water, gedroogd en in TE buffer opgelost.

Agarose gel electroforese van de te scheiden DNA fragmenten  
vindt op de volgende manier plaats: 2 gram agarose wordt  
afgewogen en opgekookt in 250 ml TAE buffer. Na afkoelen  
15 tot handwarm wordt ethidiumbromide toegevoegd tot een  
eindconcentratie van 0,5 mg/l. De gel wordt gegoten en  
afgekoeld tot ze gestold is. De monsters worden in loading-  
buffer opgebracht en DNA fragmenten worden gescheiden. De  
electroforese wordt beëindigd wanneer de frontmarker BFB  
20 het einde van de gel tot op ongeveer een centimeter is  
genaderd.

Ter voorbereiding op blotting wordt de gel als volgt behan-  
deld:

25 5 minuten in 0,25 M HCl

2 maal 15 minuten in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl

2 maal 10 minuten 1 M NH<sub>4</sub>Ac/20 mM NaOH.

Een Hybond N membraan (Amersham) wordt op dezelfde grootte  
als de gel gesneden en bevochtigd door deze enkel seconden  
30 in 2xSSC te leggen en daarna in 1 M NH<sub>4</sub>Ac/20 mM NaOH. Verder  
worden 3 stukken Whatman 3MM filtreerpapier op deze grootte  
gesneden. Er wordt een opstelling gemaakt waarin gedurende  
minstens 4 uur door middel van vloeistoftransport het DNA  
vanuit de gel wordt overgedragen op het membraan. De trans-  
35 fer vindt plaats in 1 M NH<sub>4</sub>Ac/20 mM NaOH. Na droging van het

**1003239**

membraan wordt het DNA gebonden door bestraling met UV licht gedurende 1 minuut aan elke zijde van het membraan.

De benodigde DNA probe wordt als volgt gelabeld: de overgebrachte DNA wordt gedenateerd door verhitting gedurende 10 minuten tot 95°C en snelle afkoeling op ijs. In een reactievaatje worden bijeengebracht:

- 10 ng - 3 µg DNA
- 2 µl hexanucleotidemix
- 10 2 µl dNTP's (met digoxigenine - dUTP)
- 1 µl Klenow polymerase

Na menging volgt overnacht incubatie bij 37°C. DNA wordt geprecipiteerd door toevoegen van 2 µl 3 M NaAc en 44 µl ethanol (96 %). Plaats het geheel gedurende 30 minuten bij -20°C. Centrifugeer 15 minuten bij 10000 x g, was het pellet met 70 % ethanol in water (v/v) en los het gedroogde pellet op in 50 µl TE.

20 Hybridisatie van de gelabelde fragmenten aan de membraan: de membraan wordt enkele seconden in 2xSSC gelegd. Het membraan wordt hierna in een zakje met 20 ml prehybridisatiemix geseald. Gedurende minstens 1 uur wordt het membraan geïncubeerd bij een temperatuur van 60 - 65°C. De prehybridisatiemix wordt verwijderd en vervangen door 4 ml hybridisatiemix en overnacht geïncubeerd. Na incubatie wordt de membraan gewassen: 4 x 2 minuten in wasoplossing 1; 4 x 2 minuten in wasoplossing 2 en 2 x 15 minuten in wasoplossing 3 (bij 60 - 65°C).

30 Detectie van de gelabelde banden gebeurt bij kamertemperatuur: de blot wordt in spoelbuffer 1 gespoeld en daarna met 10 ml spoelbuffer 2 per 100 cm<sup>2</sup> membraan geseald. Na 30 minuten incubatie op een schudapparaat wordt spoelbuffer 2 35 vervangen door 15 ml anti-dig oplossing per 100 cm<sup>2</sup> mem-

**1003239**

braan. Na incubatie gedurende 30 minuten op een schudapparaat wordt de membraan gewassen: 2 à 3 x 10 minuten in spoelbuffer 2; 3 à 4 x 10 minuten in spoelbuffer 1 en 1 maal in spoelbuffer 3. Het membraan wordt met 10 ml AMPPD  
 5 oplossing per 100 cm<sup>2</sup> membraan geïncubeerd gedurende 20 minuten. Het membraan wordt in een cassette gelegd met een Polaroid film erop; de film wordt na voldoende belichting verwijderd en ontwikkeld.

10 **Voorbeeld 9. Beschrijving bloemfenotype cytoplasmatisch mannelijk steriele B. oleracea met mitochondriën afkomstig van Brassica napus**

Bloeiwijze: hoofdas van de tros naar de top toe soms verkort of tot bundels vergroeid; vaak vertakt. Schutblaadjes  
 15 zelden aanwezig, soms draaiend en opgerold. Bloemsteeltjes soms verkort of tot bundels vergroeid.

Bloemknop: vaak gesloten, soms open, waarbij de randen van de kelkbladen elkaar niet raken en ingevouwen zijn. Het  
 20 oppervlak is glad tot gebobbeld; de top is meestal ingerold, soms spits. De stamper groeit vaak boven de top uit.

25 Bloem: kelkbladen 1-4 mm breed, 4-12 mm lang, rechtopstaand, vaak zwak draaiend, randen soms ingebogen, top gebogen naar de binnenzijde. Honingklieren aanwezig. Kroonbladen 4, soms tot een veelvoud hiervan, tot wel 40; 4-7 mm breed, 11-19 mm lang. Bij een veelvoud van 4 zijn de bin-  
 30 nenste kroonbladen vaak zeer veel korter. Nagel kan schijnbaar tot een buis vergroeid zijn. Plaat overwegend niet teruggebogen, vaak zijdelings sterk opgerold, soms sterk draaiend. Kleur bovenzijde wit of geel RHS 2A-3A-2C-3C-4A-5A-5B-6A, onderzijde wit of geel RHS 2A-2B-2C-3A-3C-4B-4C-

1003239

- 4A, rand van de top veelal gaaf, soms getand. Meeldraden 6, tot 2, en dan soms 2 aan 2 vergroeid, lengte tot halverwege het kelkblad, soms even lang als kelkblad. Helmhokjes klein en driehoekig. Stuifmeel ontbrekend. Stamper 1, soms tot 3  
5 waarvan dan één langer dan de andere; overwegend recht, zonder bestuiving vaak uitgroeiend tot circa 30 mm. Snavel met stempel soms krom, soms iets opgezwollen. Vruchtbegin- sel vaak draaiend en opgerold.
- 10 Bloem in de top van de tros soms vrijwel zonder kelk-, kroonbladen en meeldraden en met sterk draaiende en opge- rolde vruchtbeginsels, of schijnbaar met elkaar vergroeide vruchtbeginsels; langs een vergroeiingsnaad opengespleten; op blad op schutblad lijkend, met parallelle nervatuur.

1003239

## Benodigde oplossingen voor celfusies:

	CPW16	W5	pre plasmolyse	plasmolyse	K3PPS-I	K3PPS-V	K3PPS-R	8P	8PA	½MS15	MS30	BB
KNO <sub>3</sub> (mM)	10	---	---	---	24.73	24.73	24.73	18.80	18.80	9.40	18.79	18.79
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (mM)	---	---	---	---	3.13	3.13	3.13	7.49	7.49	10.3	20.61	20.61
FeNaEDTA (mM)	---	---	---	---	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.20
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (mM)	1.0	---	---	---	1.01	1.01	1.01	1.22	1.22	0.75	1.50	1.50
CaCl <sub>2</sub> (mM)	10	125	50	50	2.00	2.00	2.00	4.08	4.08	1.50	2.99	2.99
KCl (mM)	---	10.7	---	---	---	---	---	4	4	---	---	---
NaCl (mM)	---	154	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mM)	0.2	---	---	---	---	---	---	1.25	1.25	0.63	1.25	1.25
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mM)	---	---	---	---	1.09	1.09	1.09	---	---	---	---	---
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mM)	---	---	---	---	1.01	1.01	1.01	---	---	---	---	---
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (μM)	---	---	---	---	48.52	48.52	48.52	48.52	48.52	0.10	0.10	0.10
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (μM)	0.10	---	---	---	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (μM)	---	---	---	---	59.16	59.16	59.16	59.16	59.16	0.10	0.10	0.10
KI (μM)	0.97	---	---	---	6.00	6.00	6.00	4.52	4.52	5.00	5.00	5.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (μM)	---	---	---	---	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (μM)	---	---	---	---	6.96	6.96	6.96	6.96	6.96	29.91	29.91	29.91
CuCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (μM)	---	---	---	---	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
glycine (μM)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	26.64	26.64	26.64
myo-inositol (μM)	---	---	---	---	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56
pyridoxine-HCl (μM)	---	---	---	---	4.86	4.86	4.86	4.86	4.86	2.43	2.43	2.43
thiamine HCl (μM)	---	---	---	---	29.65	29.65	29.65	29.65	29.65	0.30	0.30	0.30
nicotinezuur (μM)	---	---	---	---	8.12	8.12	8.12	8.12	8.12	4.06	4.06	4.06

5

10

15

20

25

1003239

18

	CPW16	W5	pre-plasmolyse	plasmolyse	K3PPS-I	K3PPS-V	K3PPS-R	8P	8PA	1/2MS15	MS30	BB
Na-pyruvaat (µM)	---	---	---	---	---	---	---	181	181	---	---	---
citroenzuur (µM)	---	---	---	---	---	---	---	208	208	---	---	---
appelzuur (µM)	---	---	---	---	---	---	---	298	298	---	---	---
fumaarzuur (µM)	---	---	---	---	---	---	---	344	344	---	---	---
ascorbinezuur (µM)	---	---	---	---	---	---	---	5.7	5.7	---	---	---
glucose (mM)	---	5.55	---	---	---	---	---	379	379	---	---	---
fructose (mM)	---	---	---	---	---	---	---	1.39	1.39	---	---	---
ribose (mM)	---	---	---	---	---	---	---	1.67	1.67	---	---	---
mannose (mM)	---	---	---	---	---	---	---	1.39	1.39	---	---	---
rhamnose (mM)	---	---	---	---	---	---	---	1.52	1.52	---	---	---
cellobiose (mM)	---	---	---	---	---	---	---	0.73	0.73	---	---	---
sorbitol (mM)	---	---	50	300	---	---	---	1.37	1.37	---	---	---
manitool (mM)	---	---	---	---	---	---	---	1.37	1.37	---	---	---
caseïnehydrolysaat (mg/l)	---	---	---	---	---	---	---	250	250	---	---	---
sucrose (mM)	467	---	---	---	400	100	30	0.73	0.73	43.82	43.82	43.82
xylose (mM)	---	---	---	---	1.67	1.67	1.67	1.67	1.67	---	---	---
kokosmelk (ml/l)	---	---	---	---	---	---	---	20	20	---	---	---
2,4-D (µM)	---	---	---	---	0.45	0.45	---	4.5	---	---	---	---
BA (µM)	---	---	---	---	4.4	4.4	2.2	2.2	---	---	---	---
NAA (µM)	---	---	---	---	0.13	0.13	---	0.49	---	---	---	---
IAA (µM)	---	---	---	---	---	---	0.57	---	---	---	---	5.71
zeatine (µM)	---	---	---	---	---	---	2.28	---	---	---	---	---
agarose (% (w/v))	---	---	---	---	---	0.4	---	---	---	---	---	---
agar (% (w/v))	---	---	---	---	---	---	0.7	---	---	0.7	0.7	0.7
pH (temp.comp)	ambient	5.6	7.0	6.4	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.8	5.8	6.0

5

10

15

20

25

Overige oplossingen voor celbiologie:**enzymoplossing:**

- 5 1% (w/v) cellulase R-10 in K3PPS-I  
 0,1% (w/v) pectinase in K<sub>3</sub>PPS-I  
 pH = 5,6

**PEG oplossing:**

- 10 PEG1500 266.7 mM  
 glucose 300 mM  
 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 50 mM  
 pH = 7,0

15 **SV I:**

50 ml PEG oplossing + 100 ml Pre-plasmolyse oplossing

**SV II:**

20 ml PEG oplossing + 100 ml Pre-plasmolyse oplossing

20

**IOA (iodacetamide)**

2 mM IOA in W<sub>0</sub>; pH=5,6

**1% agarose oplossing in MilliQ water.**

25

Oplossingen voor moleculaire biologie:

## extractiebuffer:

- 30 350 mM sorbitol  
 100 mM Tris-base  
 5 mM EDTA  
 vers toevoegen: 20 mM Na-bisulfiet

## lysisbuffer:

**1003239**

- 20 mM Tris-base
- 50 mM EDTA
- 2 M NaCl
- 2 % (w/v) CTAB
- 5 N-laurylsarcosine, Na zout: 10 % (w/v)
- chloroform/isoamylalcohol: 24:1 (v:v)
- isopropanol
- TE: 10 mM Tris-HCl; pH 8,0
- 1 mM EDTA
- 10 4mM spermidine
- EDTA stockoplossing: 1 M
- 3 M NaAc
- ethanol 96 %
- 70 % ethanol/water v/v
- 15 ethidiumbromide oplossing: 10 mg/ml H<sub>2</sub>O
- TAE buffer:
  - 4.84 gram Tris base / 1
  - 1,14 ml ijsazijn
  - 10 mM EDTA; pH 8,0
- 20 loadingbuffer:
  - 24 % Ficoll 400
  - 0,1 % SDS
  - 0,1 % xylenecyanole
  - 0,1 % broomfenolblauw
- 25 0,25 M HCl
- 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl
- 1M NH<sub>4</sub>Ac/20 mM NaOH
- 2xSSC:
  - 30 mM Na-citraat.2H<sub>2</sub>O; pH 7.2
- 30 300 mM NaCl
- 0,2 SSC: 10 x verdunde 2xSSC
- 0,1xSSC: 20 x verdunde 2xSSC
- hexanucleotidemix: 10 x geconcentreerde hexanucleotidemix
- van Boehringer Mannheim

35

**1003239**

## dNTP:

0,1 mM dATP

0,1 mM dCTP

0,1 mM dGTP

5 0,65 mM dTTP

0,35 mM digoxigenine-dUTP (Boehringer)

blocking reagens: Boehringer Mannheim; art.nr 1175041

## prehybridisatiemix:

75 mM Na-citraat

10 750 mM NaCl

0,5 % blocking reagens

0,1 % N-lauroylsarcosine (w/v)

0,2 % SDS

## hybridisatiemix:

15 75 mM Na-citraat

750 mM NaCl

0,5 % blocking reagens

0,1 % N-lauroylsarcosine

0,2 % SDS

20 40 - 50 ng digoxigenine-dUTP gelabelde probe/ml

wasoplossing 1: 2xSSC + 0,1 % (w/v) SDS

wasoplossing 2: 0,2xSSC + 0,1 % (w/v) SDS

wasoplossing 3: 0,1xSSC + 0,1 % (w/v) SDS

## spoelbuffer 1:

25 100 mM Tris-HCl pH 7,5

150 mM NaCl

## spoelbuffer 2:

spoelbuffer 1

0,5 % blocking agens (vers maken)

30 spoelbuffer 3:

spoelbuffer 1

50 mM MgCl<sub>2</sub>

anti-dig-AP conjugaat: Boehringer Mannheim; art.nr 1175041

AMPPD oplossing: 10 µl AMPPD per ml spoelbuffer 3 (0.26 µM)

35

**1003239**

## Gebruikte afkortingen:

	2,4D:	2,4-dichloorfenoxiazijnzuur
	AMPPD:	disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-
5		tricyclo-[3.3.1.1 <sup>0,2</sup> ]decan)-4-yl)phenyl phosphate
	AP:	zure fosfatase
	BA:	6-benzylaminopurine
	CMS:	cytoplasmatische mannelijke steriliteit
	DIG:	digoxigenine
10	dATP:	desoxyadenosinetrifosfaat
	dCTP:	desoxycytosinetrifosfaat
	dGTP:	desoxyguaninetrifosfaat
	DNTP:	desoxynucleotidetrifosfaat
	dTTP:	desoxythyminetrifosfaat
15	DUTP:	desoxyuracyltrifosfaat
	EDTA:	ethyleendiaminetetraazijnzuur
	g:	versnelling van de zwaartekracht (9,8 m.sec <sup>-2</sup> )
	IOA:	iodacetamide
	kRad:	1000 Rad, eenheid van ioniserende straling
20	µg:	microgram
	µl:	microliter
	mM:	millimolair
	µM:	micromolair
	M:	molair
25	MS:	Murashige & Skoog
	NAA:	naftaleenazijnzuur
	PEG:	polyethyleenglycol
	pH:	maat voor zuurgraad
	rpm:	toeren per minuut
30	SSC:	saline sodium citrate
	SDS:	sodiumdodecylsulphate
	TC:	tissue culture
	UV:	ultraviolet
	v/v:	volume/volume
35	w/v:	gewicht/volume

Bij vrijwel alle behandelingen is aan te geven binnen welke grenzen een pH, een concentratie e.d. moet zijn en wat de waarde is waarmee de experimenten in de praktijk gedaan worden. De drie waarden voor deze oplossingen/behandelingen  
5 zijn hieronder gegeven:

weefselkweekmedia:

½MS15, MS30 en BB:

suiker bijvoorbeeld sucrose; concentratie 0.5 - 600 mM,  
10 normaal is 200 - 400 mM.  
pH 5 - 10; normaal 5.5 - 6.0.

temperatuur opkweek: 22 - 27°C, normaal 25 °C.

bestraling: 0 - 60 kRad; normaal 50 kRad.

15 fusietemperatuur: 20 - 25 °C; gebruikelijk 22°C

concentraties van plantenhormonen: 0 - 10 µM; normaal 0 - 3  
µM.

**CONCLUSIES**

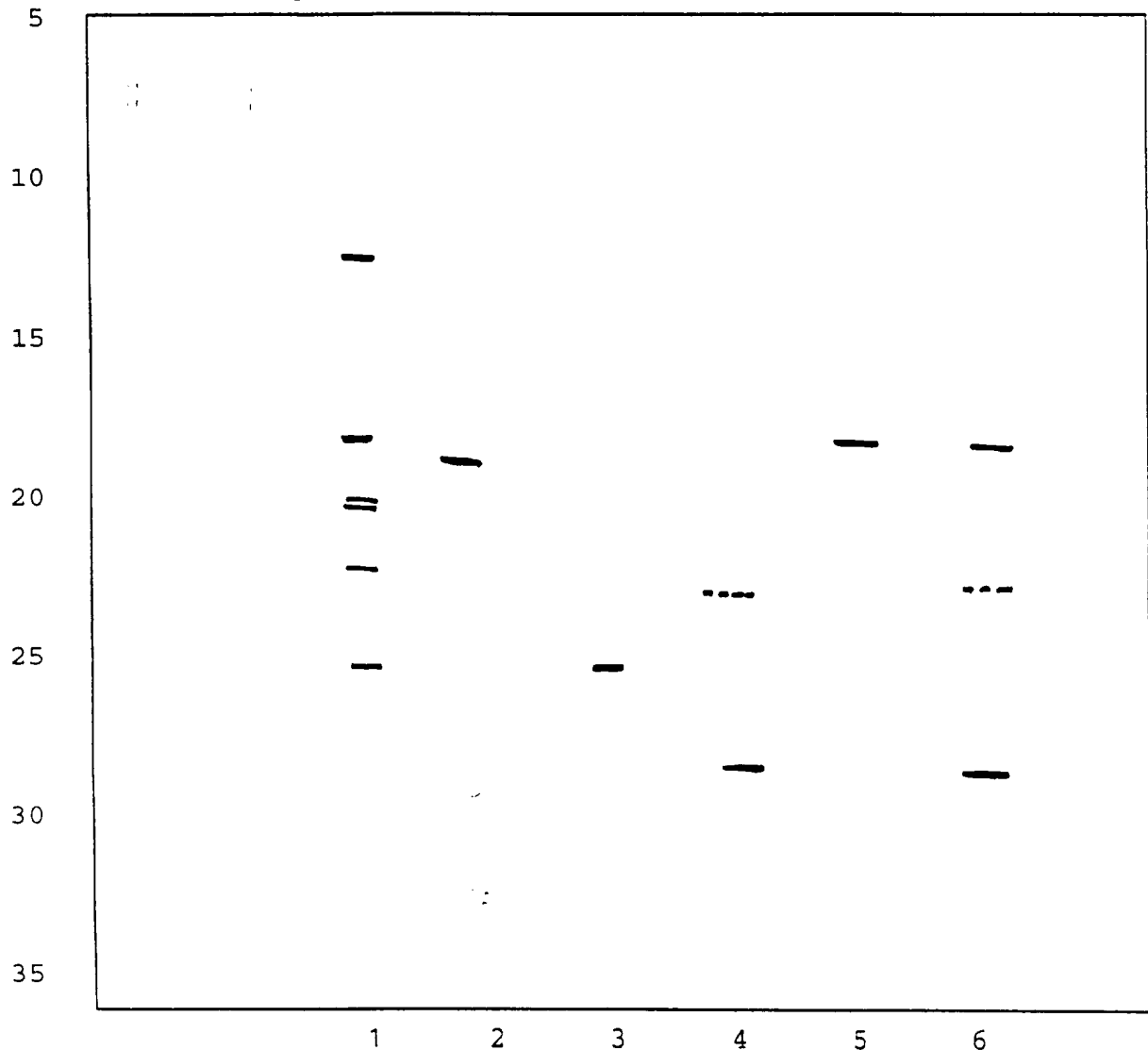
1. B. oleracea plant waarvan het cytoplasma middels  
 5 protoplasten fusie is voorzien van mitochondriën met  
 DNA dat althans gedeeltelijk afkomstig is van een B.  
napus plant, en dat is gekoppeld aan (de eigenschap  
 van) cytoplasmatisch mannelijke steriliteit (CMS) (i.e.  
 verantwoordelijk is voor cytoplasmatisch mannelijke  
 steriliteit bij de B. oleracea plant).
- 10 2. B. oleracea plant volgens conclusie 1, waarvan cellen  
 zijn voorzien van voor deze plant normaal, soorteigen  
 kerngenoom.
- 15 3. B. oleracea plant volgens conclusie 1 of 2, waarvan  
 cellen zijn voorzien van voor B. napus normaal,  
 soorteigen mitochondriën.
4. B. oleracea plant volgens conclusie 3, waarbij de  
 20 soorteigen mitochondriën zijn geïntroduceerd middels  
 somatische hybridisatie.
5. B. oleracea plant volgens een der voorgaande conclu-  
 sies 1 tot en met 4, gekozen uit de groep bestaande  
 25 uit:
- bloemkool (B. oleracea L. convar. botrytis (L.)  
 Alef. var. botrytis L.),
  - broccoli (B. oleracea L. convar. botrytis (L.)  
 Alef. var. cymosa Duch.),
  - 30 - Romanesco (B. oleracea L. convar. botrytis (L.)  
 Alef. var. botrytis L.),
  - spruitkool (B. oleracea L. convar. oleracea var.  
gemnifera DC.),
  - witte kool (B. oleracea L. convar. capitata (L.)

**1003239**

- Alef. var. alba DC.),
- spitskool (B. oleracea L. convar. capitata (L.) Alef. var. alba DC.),
- rode kool (B. oleracea L. convar. capitata (L.) Alef. var. rubra DC.),
- 5 - savooie kool (B. oleracea L. convar. capitata (L.) Alef. var. sabauda L.),
- koolrabi (B. oleracea L. convar. acephala (DC.) Alef. var. gongyloides),
- 10 - boerenkool (B. oleracea L. convar. acephala (DC.) Alef. var. sabellica L.),
- Portugese kool (B. oleracea var. tronchuda syn. costata).
- 15 6. Zaden of plantedelen afkomstig van een B. oleracea plant volgens een der voorgaande conclusies 1 tot en met 5.
7. Werkwijze als beschreven in de beschrijving en/of
- 20 voorbeelden.

1003239

Figuur Weergave van een luminescogram met cytoplasma van B. oleracea, B. oleracea met het ogura cytoplasma en B. oleracea met mitochondriën afkomstig van B. napus.



40 **laan 1:** moleculair gewicht markers, van boven naar beneden:

21226 bp

7421 bp

5804 bp

5643 bp

4878 bp

45 3530 bp

(λ DNA :: EcoRI; Boehringer Mannheim)

**laan 2:** donor met B. napus mitochondriën

**laan 3:** B. oleracea met ogura

50 **laan 4:** B. oleracea als acceptor; de bovenste band kan, afhankelijk van de stringentie van de was-stappen soms afwezig zijn.

**laan 5:** B. oleracea plant met CMS welke is ontstaan uit fusie met het patroon van de donor als in laan 2.

55 **laan 6:** B. oleracea plant met CMS welke is ontstaan uit fusie met een gecombineerd patroon van de donor als in laan 2 en de acceptor in laan 4. Een dergelijke plant is steriel en wordt daarom tevens aangeduid als in het bezit van de eigenschap CMS.

1003239

**VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN  
INTERNATIONAAL TYPE**

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1003239

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP  
IPC 6 C12N15/05 A01H1/06

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 A01H C12N

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	NL 9 400 518 A (SAKATA SEED CORP) 1 Februari 1995 zie het gehele document ---	1-7
X	EP 0 255 355 A (ALLELIX INC) 3 Februari 1988 zie bladzijde 3, regel 27 - regel 40 ---	1,2,5-7
X	TAG, THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, nr. 83, 1992, bladzijden 313-320, XP002028243 KAO, H.M. ET AL: "Synthesis of Brassica oleracea / Brassica napus somatic hybrid plants with novel organelle DNA compositions" zie bladzijde 313 - bladzijde 314 --- -/--	1,5-7

Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.

Leden van dezelfde octroofamilie 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

\*Z\* document dat deel uitmaakt van dezelfde octroofamilie

Datum waarop het nieuwheidsonderzoek van internationaal type werd voltooid

25 Maart 1997

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

FONTS CAVESTANY, A

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN  
INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek  
NL 1003239

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN		
Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
A	GB 2 211 205 A (ZAADUNIE BV) 28 Juni 1989 zie bladzijde 1, alinea 1 - alinea 2 ---	1-7
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8941 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A97, AN 89-296558 XP002028244 & JP 01 218 530 A (MITSUBISHI KASEI CORP) , 31 Augustus 1989 zie samenvatting ---	1-7
A	PLANT SCIENCE, deel 53, nr. 3, 1 Januari 1987, bladzijden 243-248, XP0000564234 BARSBY T L ET AL: "THE TRANSFER OF CYTOPLASMIC MALE STERILITY TO WINTER-TYPE OILSEED RAPE (BRASSICA NAPUS L.) BY PROTOPLAST FUSION" zie bladzijde 247, rechter kolom, alinea 2-3 ---	3,4
A	WO 92 05251 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH) 2 April 1992 zie bladzijde 22 - bladzijde 23 ---	1-7
A	PHYSIOLOGIA PLANTARUM, deel 85, 1992, bladzijden 325-333, XP002028271 EARLE E.D. ET AL: "Organelle assortment and mitochondrial DNA rearrangements in Brassica somatic hybrids and cybrids" zie bladzijde 325 - bladzijde 328 -----	1-7

**VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN  
INTERNATIONAAL TYPE**

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek  
NL 1003239

In het rapport genoemd octrooigeschrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
NL 9400518 A	01-02-95	JP 7031307 A	03-02-95
		NL 9401153 A	01-02-95
		US 5650559 A	22-07-97
-----			
EP 0255355 A	03-02-88	GEEN	
-----			
GB 2211205 A	28-06-89	DE 3842473 A	29-06-89
		FR 2628601 A	22-09-89
		FR 2695798 A	25-03-94
		NL 8803089 A	17-07-89
		US 5254802 A	19-10-93
-----			
WO 9205251 A	02-04-92	FR 2667078 A	27-03-92
		AU 652964 B	15-09-94
		AU 8663191 A	15-04-92
		CA 2092097 A	22-03-92
		CZ 9300454 A	16-02-94
		EP 0549726 A	07-07-93
		HU 66675 A	28-12-94
		JP 6501613 T	24-02-94
		PL 168666 B	29-03-96
		PL 169149 B	28-06-96
		PL 169165 B	28-06-96
		PL 169783 B	30-08-96
SK 22293 A	06-10-93		
-----			