

Korte aanduiding: Werkwijze voor het moduleren van zetmeelkorrelgrootte in planten, transgene planten met veranderde zetmeelkorrelgrootte en toepassing van de zetmeelkorrels.

Zetmeel is een plantaardige substantie met een zeer breed toepassingsgebied. Zetmeel vormt het hoofdbestanddeel van de belangrijkste voedingsgewassen. Het type zetmeel heeft een belangrijke invloed op de toepasbaarheid van b.v. meel voor het bereiden van b.v. brood, koek en pasta's.

5 Daarnaast wordt zetmeel in gezuiverde en aangepaste vorm wel gebruikt in dressings, sausen, toetjes, bindmiddel en b.v. zelfs in boorvloeistoffen. Ook kan zetmeel door fysisch en/of chemische manipulaties worden omgezet in een grondstof voor (biologisch afbreekbare) verpakkingsmaterialen of alternatieve voedingsmiddelen (b.v snacks).

10

Het is gebleken dat de vorm waarin zetmeel wordt aangeboden van belang is voor de fysische en/of chemische eigenschappen van het zetmeel en het product waarin het zetmeel wordt verwerkt. In de onderhavige uitvinding is gevonden dat planten kunnen worden aangezet om zetmeelkorrels met een
15 veranderde grootte te produceren. Hierdoor is mogelijk gewenste groottes te laten produceren en toe te passen. Een niet limiterend voorbeeld is bijvoorbeeld het verbeteren van het mondgevoel van voedselproducten als sauzen en spreads. Een grotere zetmeelkorrel geeft bijvoorbeeld een minder zalvig en meer rul gevoel in de mond hetgeen in bepaalde toepassingen als
20 prettiger wordt ervaren.

Wereldwijd bestaat er brede kennis over de opbouw en opslag van zetmeel in planten zoals de zaad- en knol-gewassen (b.v granen en aardappels). Zetmeelkorrels worden gevormd in zogenaamde amyloplasten. Dit
25 zijn celorganellen die zich middels insnoering vermenigvuldigen. In een aspect voorziet de onderhavige uitvinding in een werkwijze voor het veranderen van de gemiddelde zetmeelkorrelgrootte of de spreiding in de zetmeelkorrelgrootte

in een verzameling amyloplast bevattende plantencellen waarbij de genoemde plantencellen worden voorzien van een middel voor het moduleren van een proces van plastide-deling. Verrassenderwijs is gevonden dat de gemiddelde grootte van de zetmeelkorrels of de spreiding van de zetmeelkorrelgrootte in een plantencel kan worden gemoduleerd door te interfereren met de deling van amyloplasten. Bij voorkeur wordt op een zodanig specifieke wijze met de plastide-deling geïnterfereerd dat andere dan plastide-deling gerelateerde processen in de cel niet of nauwelijks worden beïnvloed. Een geschikte wijze voor een dergelijke specifieke modulering is het manipuleren van het insnoeringsproces waarmee een plastide zich deelt in twee separate plastiden.

Het proces van plastiden-deling is een nauwkeurig gereguleerd proces. Van verschillende genen is bekend dat zij betrokken zijn bij de deling van plastiden in planten. Enkele van deze genen zijn FtsZ genen en de Min-genen (zie ook Colleti 2000; Osteryoung 1998; WO 98/00436 en WO 01/81601). FtsZ eiwitten vormen een contractiele ring aan de binnenkant van de buitenmembraan van een plastide (Colleti (2000; Osteryoung 1998). Bij insnoering wordt de contractiele ring kleiner tot dat uiteindelijk de afsnoering plaatsvindt. Bijvoorbeeld de Min-genen blijken, althans in bacteriën, betrokken bij de plaatsing van de ring tijdens plastiden-deling. In de onderhavige uitvinding is gebleken dat het mogelijk is de zetmeelkorrelgrootte verdeling in planten te moduleren door interferentie met de expressie van eiwitten die betrokken zijn bij de plastiden-deling in planten. Door interferentie met de Min eiwit expressie is het mogelijk een grotere dan wel kleinere spreiding in de gemiddelde zetmeelkorrelgrootte te bereiken. Dit wordt bereikt door de plaatsing van de ring zodanig te beïnvloeden dat zij meer centraal gelegen is (hetgeen leidt tot een homogenere verdeling van de korrelgrootte en dus een lagere spreiding) of juist meer extreem gelegen is zodat juist een grotere spreiding in de korrelgrootte wordt verkregen. Bij voorkeur wordt het proces van plastidendeling gemoduleerd door de expressie

van FtsZ eiwitten te beïnvloeden en dan bij voorkeur de expressie van het FtsZ1 eiwit.

Middelen waarmee het proces van plastidendeling kan worden gemoduleerd omvatten middelen voor het manipuleren van de expressie van nucleizuren die coderen voor de endogene eiwitten die betrokken zijn bij het proces van plastidendeling. Dit kan bijvoorbeeld door veranderingen aan te brengen in regulator-sequenties in genen voor deze endogene eiwitten waardoor een hogere of lagere expressie van het endogene eiwit wordt verkregen. Een dergelijke ingreep is mogelijk middels bijvoorbeeld homologe recombinitie. In deze uitvoeringsvorm is het middel het nucleïnezuur waarmee de homologe recombinitie wordt gekatalyseerd. In een geprefereerde uitvoeringsvorm is het middel een nucleïnezuur coderend voor een FtsZ gen of een functioneel deel, afgeleide of analoog daarvan. Bij voorkeur een nucleïnezuur van een FtsZ1 gen of een functioneel deel, afgeleide of analoog daarvan. Andere middelen voor het moduleren van plastidendeling in een cel zijn peptiden of antilichamen die de functie beïnvloeden van een eiwit dat is betrokken bij het plastideninsnoeringsproces of complex, bijvoorbeeld een FtsZ eiwit of een Min-eiwit. Deze beïnvloeding van de functie hoeft niet noodzakelijkerwijs de hoeveelheden van deze componenten zoals FtsZ, in de cel te beïnvloeden.

Door het gehele coderende gebied middels een expressiecassette in het genoom van de plantencel te verankeren, bijvoorbeeld door gebruikmaking van ongerichte integratie in het genoom via *Agrobacterium tumefaciens* gemedieerde plant transformatie, is het mogelijk gebleken de gemiddelde zetmeelkorrelgrootte in plantencellen te moduleren. In de verschillende klonale lijnen werden lijnen met een gemiddeld kleinere zetmeelkorrel en lijnen en met een gemiddeld grotere zetmeelkorrel gevonden. De verschillen in de diverse lijnen zijn vermoedelijk het resultaat van verschillen in expressie van het nucleïnezuur door een verschillende integratieplaats of door

epigenetische mechanismen. Een vergroting van de gemiddelde korrelgrootte werd ook bereikt door zogenaamde antisense moleculen van een FtsZ gen in te brengen. Zonder gebonden te zijn aan theorie wordt verondersteld dat in beide gevallen met de expressie van het FtsZ eiwit in de behandelde plantencel en

5 zijn nakomelingen wordt geïnterfereerd. Deze specifieke interferentie leidt tot een veranderde plastidendeling, waarschijnlijk via interferentie met het insnoerings-mechanisme, en daarmee een afwijking van de gemiddelde grootte van de zetmeelkorrel. Er wordt verondersteld dat een uiteindelijke verlaging van de FtsZ eiwit expressie in de behandelde plantencel leidt tot een

10 gemiddeld grotere zetmeelkorrel terwijl een uiteindelijke verhoging van de FtsZ eiwit expressie leidt tot een gemiddeld kleinere zetmeelkorrel. Wat het mechanisme ook is, het blijkt dat de gemiddelde grootte van de zetmeelkorrel kan worden beïnvloed door nucleïnezuur dat afkomstig is van een FtsZ gen of een functioneel deel, afgeleide of analoog daarvan in de cel te brengen. Een

15 functioneel deel van een FtsZ gen is een deel dat instaat is de expressie van endogeen FtsZ eiwit te verlagen of de hoeveelheid FtsZ eiwit (afkomstig van een endogeen gen of toegevoegd gen) te verhogen, bijvoorbeeld door een antisense, een co-suppressie effect, een RNAi, een selectieve restrictie of een overexpressie van het endogene RNA en/of eiwit te bewerkstelligen of

20 overexpressie van een functioneel deel van een FtsZ gen te bewerkstelligen. Dergelijke strategieën kunnen worden geïmplementeerd door expressiecassettes voor productie van de nucleïezuren in de cel in te brengen of door de nucleïezuren op zich in te brengen. Er zijn natuurlijk nog veel meer methoden om expressie van endogeen FtsZ eiwit te verlagen of te verhogen, en

25 deze zijn ook onderdeel van de onderhavige uitvinding. Een functioneel deel heeft typisch een lengte van minimaal 19 baseparen en kan een coderend en/of een niet coderend deel van het gen betreffen. Het heeft de voorkeur een nucleïnezuur te gebruiken dat volledig identiek is aan het FtsZ gen of een functioneel deel daarvan. Het moge echter duidelijk zijn dat kleine

30 veranderingen die de specifieke hybridisatie mogelijkheden met

FtsZnucleïnezuur in de plantencel niet dramatisch veranderen, ook getolereerd worden. Het is niet goed mogelijk de exacte grenzen van de maximaal toelaatbare afwijkingen te geven, maar een vakman is in staat deze afdoende te beoordelen en te ontwerpen. Dergelijke afgeleiden van een nucleïnezuur van een FtsZ gen zijn daarom ook onderdeel van de onderhavige uitvinding. Nucleïnezuren kunnen verschillende soorten modificaties ondergaan en toch nog functioneel hybridiseren met hun doelsequentie. Dergelijke analogen zijn natuurlijk ook onderdeel van de uitvinding. Ook kunnen tegenwoordig peptiden gemaakt worden die op een nucleïnezuurachtige wijze met een doelsequentie kunnen hybridiseren. Dergelijke peptiden met als voorbeeld PNA en morpholino achtige peptiden zijn ook geschikte analogen van een nucleizuur sequentie van een (functioneel deel van) een FtsZ gen. Ook kunnen peptiden of antilichamen toegepast worden die de functie beïnvloeden van het FtsZ eiwit of het plastiden insnoerings complex zonder dat de hoeveelheden van deze componenten zoals FtsZ worden veranderd.

Een expressiecassette zoals hierboven genoemd is Stand van de Techniek voor de vakman. Behalve dat expressie cassettes met een constitutieve promoter kunnen worden gebruikt (b.v 35S CaMV promoter) die in de gehele plant tot expressie komen, worden bij voorkeur expressiecassettes gebruikt die bijvoorbeeld specifiek expressie geven in een deel van een plant. Bij voorkeur wordt een knol- of zaad-specifieke promoter gebruikt. Het voordeel van een dergelijke promoter is de beperking van de invloed op plastidendeling tot die cellen die belangrijk zijn voor een groot deel van de zetmeelproductie in een plant. Er zijn diverse knol- en zaadspecifieke promotoren verkrijgbaar en het is waarschijnlijk dat nog meer zullen volgen.

De verzameling amyloplast bevattende plantencellen is bij voorkeur een transgene plant. In deze uitvoeringvorm wordt het genoom van de plant voorzien van een recombinant nucleïnezuur voor het moduleren van het proces

van plastidendeling in genoemde plant of een amyloplast bevattend deel daarvan. Bij voorkeur wordt het nucleïnezuur ingebracht in de vorm van een expressiecassette die het nucleïnezuur tot expressie brengt. De transgene plant of de genetische veranderde cel is natuurlijk onderdeel van de

5 uitvinding. Bij voorkeur behoort de plant tot de knol-, wortel- of zaadgewassen, of tot de granen en van deze bij voorkeur tot de aardappelplanten, cassaveplanten, tarwe, rijst, gerst en maïs. Dergelijke planten of plantencellen mogen nog verdere genetische modificaties hebben ondergaan. Geprefereerde modificaties omvatten modificaties die tot gevolg hebben dat amylosevrije

10 zetmeelrijke plantendelen worden aangemaakt. Dit is bijvoorbeeld bekend uit de aardappel-industrie.

De uitvinding voorziet met name in het zetmeelrijke deel van een plant van de uitvinding. Hieruit kan op eenvoudige wijze

15 zetmeelsamenstelling met de aangepaste gemiddelde korrelgrootte of spreiding daarin worden gewonnen. Zetmeelrijke delen zijn onder andere knollen, zaden en sommige wortels. De uitvinding omvat ook een werkwijze voor het maken van een dergelijke zetmeelsamenstelling met het kenmerk dat een plantencel of een plant of amyloplast bevattend deel daarvan volgens de uitvinding wordt

20 gebruikt. Ook in een aldus verkregen zetmeelsamenstelling wordt voorzien. Ook wordt voorzien in een zetmeelsamenstelling die althans voor een deel een dergelijke zetmeelsamenstelling omvat. Zetmeelsamenstellingen worden vaak chemische of fysisch gemodificeerd, deze en andere afgeleiden van zetmeelsamenstelling behoren natuurlijk ook tot de uitvinding.

25 Zetmeel of zetmeelsamenstellingen worden gebruikt in een grote variëteit aan producten. Dergelijke producten vallen ook onder de onderhavige uitvinding. Geprefereerde producten zijn voedselproducten, fysisch en/of chemisch bewerkte (bio)grondstoffen voor de fabricage van een voedselproduct of gebruiksvoorwerp zoals b.v. boorvloeistoffen en verpakkingsmaterialen.

Het is gebleken dat veranderingen in de gemiddelde grootte van zetmeelkorrels een duidelijk effect hebben op het mondgevoel van voedselproducten waar deze samenstellingen in zijn verwerkt. Een grotere gemiddelde korrelgrootte resulteert in een rullere smaaksensatie. Terwijl een

5 kleinere gemiddelde korrelgrootte resulteert in een zalvigere smaaksensatie. Dit is met name het geval bij sauzen, spreads, vla en andere verdikte min of meer vloeibare voedselproducten die direct voor gebruik zijn bestemd. De onderhavige uitvinding omvat aldus ook de toepassing van een zetmeelsamenstelling of een product volgens de uitvinding voor het

10 veranderen van het mondgevoel van een voedselproduct, bij voorkeur een verdikt min of meer vloeibaar voedselproduct dat voor directe consumptie is bedoelt en hiervan bij voorkeur de sauzen, spreads en vla producten. Een voorbeeld van een min of meer vloeibaar product is een custard of een pudding. De uitvinding omvat ook de toepassing in granen. Middels de vinding kan de

15 zetmeelkorrel grootte verdeling in meelproducten van granen worden gemoduleerd hetgeen kan worden gebruik om de toepasbaarheid in meelproducten zoals brood, koek of pasta's te veranderen, te verbreden of te verbeteren. Hetzelfde geldt natuurlijk voor andere gewassen waarvan de zetmeelhoudende delen worden gebruikt voor de productie van (gebakken)

20 meelproducten.

In een verdere uitvoeringsvorm voorziet de uitvinding in de toepassing van een middel voor het beïnvloeden van de plastidendeling in een plantencel ten behoeve van het beïnvloeden van de grootte van zetmeelkorrels

25 in genoemde plantencel. Dit effect geldt in het bijzonder voor plantencellen die amyloplasten bevatten met gemiddeld één zetmeelkern per amyloplast.

Voorbeelden

Voorbeeld 1

- 5 Het Fts-Z1-gen werd geïsoleerd uit aardappels. Door middel van een constitutieve of weefsel specifieke promotor werden er constructen gemaakt voor overexpressie of antisenseonderdrukking in de gehele plant (35S-promoter) of alleen in de zetmeelproducerende organen (GBSS-promoter). Aardappelplanten werden getransformeerd door middel van *Agrobacterium*-
- 10 transformatie. Middels een PCR-analyse werden transgene planten geïdentificeerd die de desbetreffende plant-vreemde promoter-FtsZ1 cassette bevatten. De effecten op chloroplastendeling in de huidmondjes werden geanalyseerd met behulp van fluorescentiemicroscopie. Zetmeelkorrels uit knollen van transgene planten werden geanalyseerd met behulp van een
- 15 coulter counter.

Materiaal en methoden

Het klonen van aardappel-FtsZ

- 20 Aardappel-FtsZ-1-cDNA werd gekloneerd met behulp van de Clontech SMART[™] RACE cDNA amplification kit volgens de aanbevelingen van de producenten. Er werd een aardappel-EST-sequentie (dbEST Id 53498s38) gebruikt om de 5'-primer te construeren (SP 107, tabel 1). Teneinde PCR-fragmenten te verkrijgen die zichtbaar zijn op gel, werd de touchdown-PCR
- 25 uitgevoerd met 30 cycli. De PCR-producten werden gekloond in pGEM[®]-T easy (Promega). De klonen werden getest op de aanwezigheid van FtsZ met behulp van nested PCR door middel van de primers SP102 en SP103. Van één kloon werd de complete sequentie bepaald (BaseClear).

Vectorconstructie

- Teneinde het FtsZ coderend gebied te kunnen kloneren in expressie vectoren werd het pGEM®-T easy plasmide welke het FtsZ-PCR-fragment bevatte, geknipt met het restrictie-enzym EcoRI. De overhangende uiteinden van het
- 5 FtsZ fragment werden verwijderd met Klenov DNA polymerase hetgeen resulteert in een stomp EcoRI-FtsZ-fragment. Het stompe EcoRI-FtsZ-fragment werd in twee orientaties gekloneerd tussen de stompe uiteindes van een met SmaI-geopend pBluescript SK+ plasmide waardoor het FtsZ fragment omsloten wordt door unieke polyklonering knipplaatsen die het mogelijk
- 10 maken het FtsZ fragment makkelijk naar andere plasmiden over te kloneren. Om het 35S-FtsZ-sense-construct te genereren, werd het GFP-gen in pMP2164 (bevattende een 35S-promotor) vervangen door FtsZ met behulp van NcoI- en PstI-knipplaatsen. Voor constructie van de antisense orientatie (35S-antisense FtsZ) werd het GFP-gen in pMP2164 verwijderd door knippen met NcoI en
- 15 NotI en stomp maken met Klenov. Na ligatie van het boven beschreven stompe EcoRI-FtsZ-fragment in plaats van het GFP-gen werd de anti-sense FtsZ-orientatie gecontroleerd via restrictie enzym analyse. De EcoRI-fragmenten van de ontstane plasmiden met de expressie cassettes voor 35S-FtsZ en 35S-antisense-FtsZ werden gekloneerd in de plantvector pMOG402.
- 20 Voor de constructie van weefsel specifieke promotor-FtsZ-fusies werd de plantvector pPGB121S [Kuipers et al., 1995] gebruikt, die de GBSS-promotor bevat. FtsZ werd gekloneerd als BamHI-SalI-fragmenten in beide richtingen. Alle plantvectoren werden geïntroduceerd in *Agrobacterium tumefaciens* MOG101 [Hood et al., 1993] door middel van 3-punts kruisingen.

25

Aardappeltransformatie

- Er werden *in vitro* aardappelplanten (cultivar Kardal, geleverd door Avebe) gebruikt om transgene planten te verkrijgen via de stengeltransformatiemethode van Visser (1991) met gebruikmaking van
- 30 bovengenoemde transgene *Agrobacterium tumefaciens* MOG101 stammen met

- de 4 verschillende FtsZ genconstructen (35S-FtsZ-sense, 35S-FtsZ-antisense, GBSS-FtsZ-sense en GBSS-FtsZ-antisense). Planten die groeien op selectiemedium dat kanamycine bevat, werden door middel van PCR-analyse getest op de aanwezigheid van het FtsZ-construct. 1-2 cm² blad werd gemalen met een potter in 200 µl CTAB extractiebuffer (2% CTAB (N-cetyl-NNN-trimethylammoniumbromide), 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8,0) op kamertemperatuur. Na het wassen van de potter met 300 µl CTAB en het samenvoegen van het monster en de wasoplossing, werd het monster gedurende 10 min op 37°C geïncubeerd met 10 µl RNase (10 mg/ml).
- 10 Vervolgens werd het monster geïncubeerd met 100 µl chloroform op 65°C en twee maal geëxtraheerd met fenol/chloroform/isoamylalcohol (24/24/1) en één maal met chloroform bij kamertemperatuur. Het DNA werd geprecipiteerd met 10 µl NaAC (pH 4,8) en 1 ml ethanol. Het DNA werd gewassen, gedroogd en opgelost in 50-200 µl 10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8,0). Één µl werd
- 15 gebruikt voor PCR-reacties in een eindvolume van 25 µl. De voorwaartse PCR-primer werd gekozen in het promotor gebied : primer as-1b voor 35S-promotorconstructen en primer GBSS1 voor GBSS-promotorconstructen. Voor senseconstructen werd SP103 gebruikt als achterwaartse PCR-primer en voor antisenseconstructen werd SP108 gebruikt als achterwaartse PCR-primer.
- 20 Om ze in aarde te kunnen potten, werden *in vitro* planten gekweekt in een medium zonder kanamycine. De planten werden gedurende een aantal weken gekweekt in potten van voldoende grootte in een kas (Karna).

Chloroplastvisualisatie

- 25 Chloroplasten in huidmondjes van het epidermis van de lagere bladeren werden onderzocht met behulp van fluorescentiemicroscopie (Biorad MRC1024ES; excitatie 488 nm; emissie 680 DF 32 nm).

Resultaten

Het kloneren van aardappel-FtsZ-1

Aardappel-FtsZ-1 werd gekloneerd met behulp van de Clontech SMARTtm
 5 RACE cDNA amplification kit. Als 5' primer werd de sequentie die aanwezig
 was in de database gebruikt (SP107, tabel 1) en als 3' primer de 3'RACE
 primer. Het PCR-product werd gekloneerd in pGEM[®]-T easy (Promega).
 Vierentwintig klonen werden getest met een tweede PCR-reactie met nested
 primers (SP102 en SP103, tabel 1). Twee inserties met een lengte van
 10 ongeveer 1500 bp waren positief. Van één kloon werd de sequentie bepaald
 (pFtsZ-1). De nucleotidensequentie en de afgeleide eiwitsequentie zijn te
 vinden in figuur 1. De eiwitsequentie was voor 79% identiek (86%
 overeenkomst) aan FtsZ uit Arabidopsis (figuur 2).

15 *Agrobacterium-stammen*

De FtsZ-1-insertie (*Eco*RI-blunt-fragment) werd overgebracht in pBluescript
 SK⁺ (*Sma*I) in beide richtingen. Vervolgens werden de FtsZ-coderende
 gebieden gekloond in de plantvector pPGB121S, waardoor er sense- en anti-
 senseconstructen ontstonden, aangestuurd door de knolspecifieke GBSS-
 20 promotor.

Voor de constructen die de constitutieve CaMV 35S promotor bevatten, werd
 het voor FtsZ coderende gebied gekloond in pMP2164 tussen de 35S promotor
 en de NOS terminator in beide richtingen. De ontstane constructen werden
 gekloond als *Eco*RI-fragment in de plantvector pMOG402.

25 De binaire vectoren werden door 3-punts kruisingen in de *Agrobacterium*
tumefaciens-stam MOG101 geïntroduceerd.

Planttransformatie

Steriele aardappelplanten (cultivar Kardal) werden genetisch gemodificeerd
 30 door middel van de stamtransformatiemethode [Visser, 1991] met behulp van

de hierboven beschreven *Agrobacterium*-stammen. Onafhankelijk getransformeerde uitlopers werden gekweekt op selectiemedium en voor elk van de 4 constructen werden er 25 tot 30 plantjes gekweekt in bakken van 10 cm hoog. Van elke transformant werd DNA geïsoleerd uit het blad en gebruikt voor PCR-reacties. De voorwaartse PCR-primers waren in de 35S- (As-1b) of GBSS- (GBSS1) promotor gelegen en de achterwaartse PCRprimers in het FtsZ-coderende gebied (SP103 of SP108) (tabel 1). De resultaten zijn te vinden in tabel 2. De meeste transformanten bevatten het juiste PCR-fragment indicatief voor de aanwezigheid van de gewenste expressie cassette in het genoom van de plant.

Chloroplasten

De planten met het FtsZ-gen (sense of antisense) dat wordt aangestuurd door de 35S CaMV promotor werden geanalyseerd door middel van fluorescentiemicroscopie om het aantal en de grootte van de chloroplasten in huidmondjes te onderzoeken, aangezien verwacht wordt dat een verandering in FtsZ de plastidendeling beïnvloedt. In figuur 3 zijn representatieve gebieden van het epidermis van de lagere bladeren afgebeeld. Sommige transformanten hebben minder en grotere chloroplasten in hun huidmondjes (S4, S10, S11, A5, A6, A8, A11) en één plant heeft duidelijk kleinere chloroplasten (S1).

Knolinductie en zetmeelanalyse

Alle planten met het correcte PCR-fragment werden *in vitro* verder gekweekt en van elke transformant werd er één plant in aarde gepoot bij Avebe (Karna).

Deelconclusie

Er werden aardappelplanten geproduceerd die in het genoom het aardappel-FtsZ coderende gebied bevatten in sense of antisensierichting onder controle van de constitutieve 35S-promotor of de knolspecifieke GBSS-promotor. De

chloroplasten in de huidmondjes van de 35S-transformanten werden geanalyseerd door middel van fluorescentie. Bij sommige planten wijkt het aantal of de grootte van de plastiden af, wat aangeeft dat de expressie van FtsZ interfereerde met de plastidendeling.

5

Voorbeeld 2

In het eerste voorbeeld werd alleen de plastiden deling in de huidmondjes bestudeerd van de transgene aardappel planten met 35S-promoter constructen. In voorbeeld 2 werd ook de zetmeel korrelgrootte verdeling van het zetmeel in de transgene aardappel planten bestudeerd die de 4 verschillende FtsZ constructen bevatten.

De eerste generatie Kardal-planten met overexpressie (GS) of onderdrukking (35S-AS) van de expressie van het FtsZ1-gen bevat een aantal planten met zetmeelkorrelgroottes tussen 40 and 54 μm , terwijl de zetmeelkorrelgrootte van de controleplanten rond de 30 μm ligt (Caspers et al). Een selectie van deze planten werd in kassen gekweekt op grotere percelen. Uit deze planten werd zetmeel geïsoleerd en de deeltjesgrootteverdelingen van het zetmeel van deze planten werd bepaald met een coulter counter.

20

Materiaal en methode

Er werden vijf planten uit elke geselecteerde controle klonen (4 stuks), GBSS-FtsZ (GS)-klonen (4 stuks) en 35S-asFtsZ (35S-AS)-klonen (2 stuks) onder kascondities gekweekt in potten bij een kweekstation.

Er werd zetmeel geïsoleerd uit de grootste geoogste knollen (ca. 20-30 g / knol). Voor de zetmeelisolatie werd ongeveer 100 gram knol (de vijf grootste knollen) vormalen in een Wearing-blender. Er werd een hoeveelheid demiwater toegevoegd, met een verhouding tussen het gewicht van de knollen en het gewicht van het demiwater van 2 staat tot 1. Om bruine verkleuring te

30

voorkomen, werd 1000 ppm natriumwaterstofsulfiet (natriumbisulfiet) toegevoegd en de knollen werden gedurende 1 minuut gemalen. Vervolgens werd de slurry gefiltreerd door een kaasdoek en werd het zetmeel geprecipiteerd. Het bovenstaande vocht werd afgegoten en vervangen door 150
 5 ml demiwater. Na bezinking van het zetmeel werd de bovenstaande vloeistof afgegoten en werd het zetmeel overgebracht naar een aluminium schotel. Het zetmeel werd één nacht gedroogd in een incubator bij 37°C.

10 Voor de bepaling van de deeltjesgrootteverdelingen werd de Sympatec laserdiffractiemethode gebruikt met de volgende specificaties: Sympatec HELOS (H1140), meetcondities: 10 s (QUIXEL) geen focus ref. opt.<1%, meetbereik: R4: 0.5 / 1.8...350 µm, meetduur: 10 s, QUIXEL (HD23xx model): Quix sp20%, noclean lowl. 60 s ultrasoon. De resultaten werden
 15 geanalyseerd als volume-grootteverdeling.

Resultaten

20 De deeltjesgrootteverdeling werd gemeten in 4 geselecteerde klonen van de niet-getransformeerde Kardal controlegroep, 4 klonen van GS met FtsZ1 -overexpressie en 2 klonen van 35S-AS met repressie van FtsZ1-expressie . Volume-deeltjesgrootteverdelingen voor elke aardappellijn zijn te vinden in tabel 3. De 4 Kardal klonen uit de controlegroep hebben een
 25 gemiddelde volume-mediane diameter van 42.0 µm met waarden die variëren tussen 38.2 µm en 43.8 µm. De volume-mediane diameter van de 35S-AS-klonen is over het algemeen gelijk aan of iets groter (tot 23% toename) dan de Kardal controlegroep , met waarden van respectievelijk 45.3 µm en 51.8 µm. De volume-mediane diameter van de GS-klonen is veel hoger dan de diameter
 30 die werd gevonden voor de Kardal planten uit de controlegroep, met waarden

tot 73.7 μm . De significantie van de gemeten diameter toenames bij de 35S-AS en GS klonen wordt onderstreept door de geringe variatie in de diameter metingen aan de 4 onafhankelijke controle plant groepen.

- Met name twee GS-klonen (GS04 and GS25) hebben een aanzienlijk hogere volume-mediane diameter dan de controlegroep. Vergeleken met het gemiddelde van de Kardal controlegroep, is de toename in de volume-mediane diameter van kloon GS04 75% en van kloon GS25 45%. De differentiële deeltjesgrootteverdelingen van iedere aardappelkloon staan in figuur 4 en tabel 4.

10

Deelconclusies

- Kardal die genetisch gemodificeerd is met een 35S-antisense-FtsZ-genconstruct dat FtsZ-expressie onderdrukt, heeft over het algemeen een gering effect op de volume-mediane diameter (tot 23% toename) vergeleken met de Kardal controlegroep.

- Kardal die genetisch gemodificeerd is met een GBSS-FtsZ-genconstruct dat overexpressie van FtsZ veroorzaakt, leidt tot een toename van de volume-mediane diameter tot 75%.

Literatuur

1. Colleti KS, Tattersall EA, Pyke KA, Froelich JE, Stokes KD, Osteryoung
5 KW (2000). A homologue of the bacterial cell division site-determining
factor MinD mediates placement of the chloroplast division apparatus.
Current Biol 10, 507-516.
2. Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993). New Agrobacterium
helper plasmids for gene transfer to plants. Transgen Res 2, 208-218.
- 10 3. Kuipers AGJ, Soppe WJJ, Jacobse E Visser RGF (1995). Factors affecting
the inhibition by antisense RNA of korrel-bound zetmeel synthase gene
expression in potato. Mol Gen Genet 246, 745-755.
4. Osteryoung KW (2000). Organelle fission. Crossing the evolutionary divide.
Plant Phys 123, 1213-1216.
- 15 5. Osteryoung KW, Stokes KD, Rutherford SM, Percival AL Lee WY (1998).
Chloroplast division in higher plants requires members of two functional
divergent gene families with homology to bacterial ftsZ. Plant Cell 10,
1991-2004.
6. Visser RGF (1991). Regeneration and transformation of potato by
20 Agrobacterium tumefaciens. In: Lindsay K (ed) Plant Tissue Culture
Manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Vol B5, pp 1-9.
7. Caspers M.P.M., Brunt K. (2001); TNO rapportage zetmeelkorrel analyse
transgene aardappellijnen, TNO Nutrition and Food Research.

Tabel 1. Gebruikte primers voor PCR-reacties.

Naam	Sequentie
SP102	GCGCCTCGAGCTTCTATGCTATAAACACGG
SP103	GGCCGAGCTCCGTCCTTCAAAGCTGAAAGG
SP107	TTCAGTAGTGATTCCATGGCGATTTTAGGG
SP108	GGAGCAAAGCTACTTGAGAAGGGC
As-1b	CCACTGACGTAAGGGATGAC
GBSS1	GAGGGAGTTGGTTTAGTTTTTAGA

Tabel 2. Transgene aardappelplanten.

Tabel 2A. 35S senseplanten

	DNA-isolatie	PCR-analyses	35S-fts aanwezig	Microscopische waarneming	Grote plastiden	Kleine plastiden
1	+	+	+	+		+
2	+	+	+	+		
3	+	+	+	+		
4	+	+	+	+	+	
5	+	+	+	+		
6	+	+	+	+		
7	+	+	+	+		
8	+	+	+	+		
9	+	+	+	+		
10	+	+	+	+	+	
11	+	+	+	+	+	
12	+	+	+	+		
13	+	+	-			
14	+	+	-			
15	+	+	+	+		+/- veel
16	+	+	+	+		
17	+	+	-			
18	+	+	-			
19	+	+	-			
20	+	+	-			
21	+	+	-			
22	+	+	-			
23	+	+	+	+	+	
24	+	+	+	+		
25	+	+	+	+		
26	+	+	+	+		
27	+	+	-			
28	+	+	-			
29	+	+	+	+		
30	+	+	+	+		

Tabel 2B. 35S antisenseplanten

	DNA-isolatie	PCR-analyses	Ftsz-35S aanwezig	Microscopische observatie	Grote plastiden	Kleine plastiden
1	+	+	-	+		
2	+	+	-	+		
3	+	+	-	+		
4	+	+	+	+		
5	+	+	+	+	+/vreemd	
6	+	+	+	+	+/vreemd	
7	+	+	+	+		
8	+	+	+	+	+	
9	+	+	+	+		
10	+	+	+	+		
11	+	+	+	+	+	
12	+	+	+	+		
13	+	+	+	+	+	
14	+	+	+	+	+	
15	+	+	+	+	+	
16	+	+	+	+		
17	+	+	+	+		
18	+	+	+	+		
19	+	+	+	+	ontbreken bij sommige huidmondjes	
20	+	+	+	+		
21	+	+	+	+		
22	+	+	-			
23	+	+	+	+		
24	+	+	+	+		
25	+	+	+	+	+	
26	+	+	+	+	+	
27	+	+	+	+		
28	+	+	+	+	+	
29	+	+	+	+	+/veel	

Tabel 2C. GBSS sense-planten

	DNA- isolatie	PCR- analyses	GBSS-fts aanwezig
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	+	+
13	+	+	+
14	+	+	+
15	+	+	+
16	+	+	+
17	+	+	+
18	+	+	+
19	+	+	+
20	+	+	+
21	+	+	+
22	+	+	+
23	+	+	+
24	+	+	+
25	+	+	+

Tabel 2D. GBSS antisense-planten

	DNA- isolatie	PCR- analyses	Ftsz-GBSS aanwezig
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	-
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	+	+
13	+	+	+
14	+	+	+
15	+	+	+
16	+	+	+
17	+	+	+
18	+	+	+
19	+	+	-
20	+	+	+
21	+	+	+
22	+	+	+/-
23	+	+	+
24	+	+	+
25	+	+	+
26	+	+	+
27	+	+	+

Tabel 3. Volume-deeltjesgrootteverdeling in zetmeelmonsters zoals gemeten door middel van laserdiffractie

5

Monster	VMD (μm) ¹	d10 (μm) ²	d50 (μm) ³	d90 (μm) ⁴
Controle 1	38.2	13.4	36.1	59.1
Controle 2	42.6	14.0	37.1	64.2
Controle 3	43.5	10.1	31.0	78.4
Controle 4	43.8	12.7	34.9	67.4
<i>Gemiddelde van controlegroep</i>	<i>42.0</i>	<i>12.6</i>	<i>34.8</i>	<i>67.3</i>
GS04	73.7	19.8	56.1	166.2
GS12	56.7	15.7	49.1	96.0
GS14	47.3	14.8	41.0	75.6
GS25	60.9	16.7	44.9	103.5
35S-AS15	51.8	16.2	44.6	80.8
35S-AS28	45.3	13.4	35.1	70.9

¹volume-mediane diameter (μm)

²10% van de zetmeeldeeltjesdiameter is kleiner dan de waarde in μm (m.a.w. 90% van de zetmeeldeeltjesdiameter is groter dan de waarde)

10

³50% van de zetmeeldeeltjesdiameter is kleiner dan de waarde in μm (m.a.w. 50% van de zetmeeldeeltjesdiameter is groter dan de waarde)

⁴90% van de zetmeeldeeltjesdiameter is kleiner dan de waarde in μm (m.a.w. 10% van de zetmeeldeeltjesdiameter is groter dan de waarde)

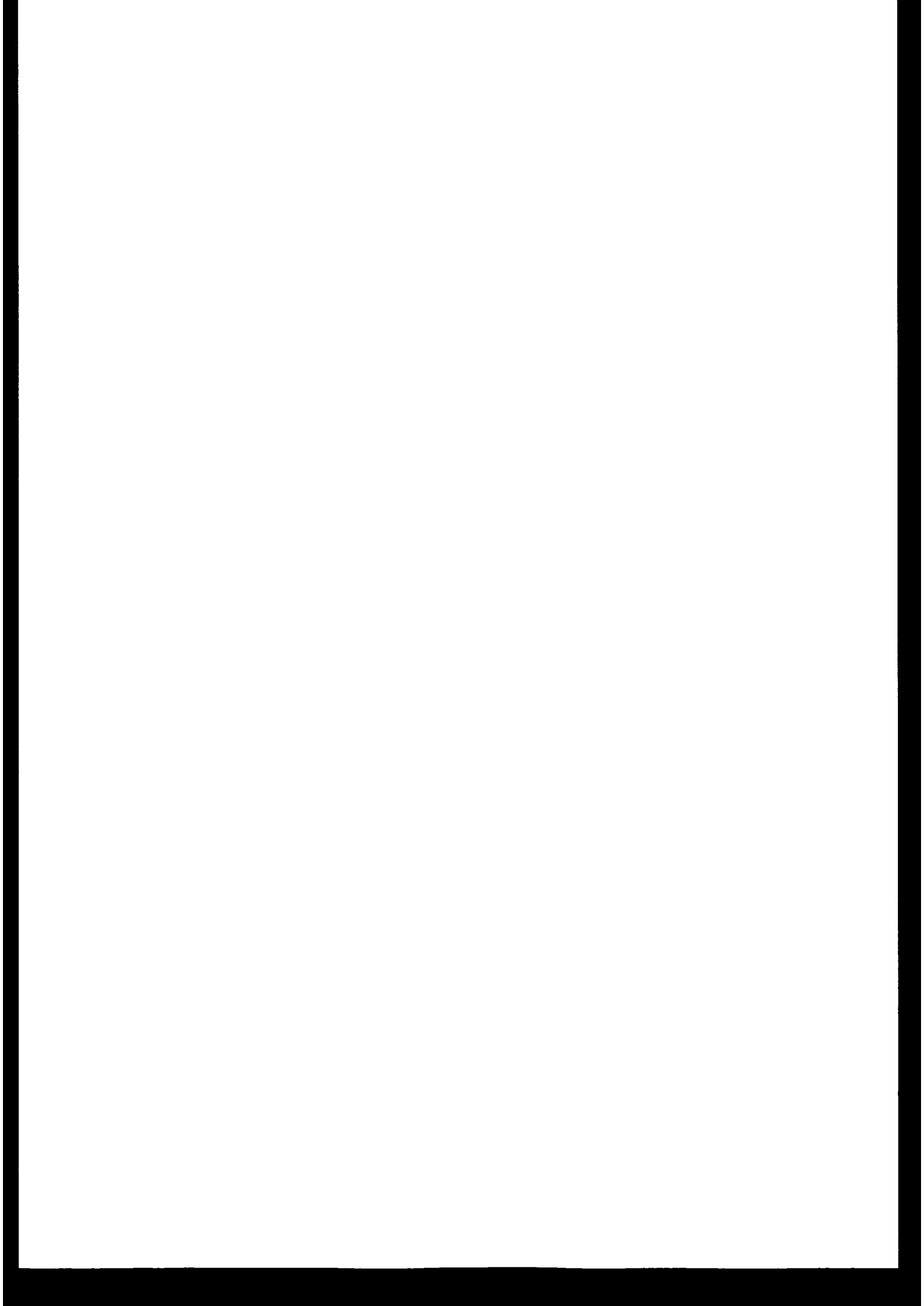
Tabel 4

Partikel diameter (μm)	Differentiele frequentie (%)						
	Controle Gemiddelde	G- S04	G- S12	G- S14	G- S25	35S- AS15	35S- AS28
1.8	0.06	0.04	0.05	0.06	0.05	0.05	0.07
2.2	0.08	0.05	0.06	0.07	0.07	0.07	0.08
2.6	0.08	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07
3.0	0.07	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
3.6	0.06	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05
4.4	0.05	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03
5.2	0.04	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03
6.2	0.04	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02
7.4	0.04	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02
8.6	0.06	0.03	0.05	0.04	0.03	0.03	0.04
10.0	0.10	0.05	0.08	0.07	0.05	0.05	0.07
12.0	0.17	0.08	0.13	0.12	0.10	0.10	0.15
15.0	0.32	0.14	0.22	0.23	0.19	0.20	0.30
18.0	0.50	0.22	0.32	0.38	0.31	0.32	0.51
21.0	0.71	0.30	0.42	0.53	0.44	0.45	0.73
25.0	0.97	0.41	0.55	0.72	0.62	0.61	1.00
30.0	1.32	0.57	0.72	1.00	0.88	0.85	1.34
36.0	1.68	0.78	0.95	1.35	1.20	1.17	1.67
42.0	1.86	1.05	1.20	1.64	1.49	1.53	1.80
50.0	1.75	1.36	1.45	1.81	1.70	1.83	1.65
60.0	1.25	1.66	1.65	1.70	1.68	1.90	1.16
72.0	0.61	1.72	1.62	1.23	1.31	1.49	0.58
86.0	0.20	1.34	1.25	0.64	0.74	0.78	0.23
102.0	0.08	0.73	0.71	0.24	0.31	0.28	0.10
122.0	0.06	0.33	0.31	0.09	0.13	0.09	0.09
146.0	0.08	0.20	0.15	0.06	0.10	0.07	0.12
174.0	0.12	0.24	0.13	0.09	0.13	0.10	0.18
206.0	0.14	0.31	0.15	0.13	0.19	0.15	0.21
246.0	0.13	0.34	0.17	0.13	0.23	0.18	0.19
294.0	0.11	0.33	0.14	0.09	0.26	0.15	0.13
350.0	0.00	0.27	0.00	0.00	0.27	0.00	0.00

Conclusies

1. Een werkwijze voor het veranderen van de gemiddelde zetmeelkorrelgrootte of de spreiding van de zetmeelkorrelgrootte in een verzameling amyloplast bevattende plantencellen waarbij de genoemde plantencellen worden voorzien van een middel voor het moduleren van een proces van plastidendeling
2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarin het middel een nucleïnezuur is van een FtsZ gen of een functioneel deel, afgeleide of analoog daarvan.
3. Werkwijze volgens conclusie 2, waarin het middel een nucleïnezuur is van een FtsZ1 gen of een functioneel deel, afgeleide of analoog daarvan.
4. Werkwijze volgens een der conclusies 1-3, waarin de verzameling plantencellen een plant is die transgeen is gemaakt door het genoom te voorzien van een recombinant nucleïnezuur voor het moduleren van het proces van plastidendeling in genoemde plant of een amyloplast bevattend deel daarvan.
5. Een amyloplast bevattende plantencel omvattende een middel voor het veranderen van het proces van plastidendeling in genoemde cel.
6. Een transgene plant die in het genoom een recombinant nucleïnezuur bevat voor het moduleren van een proces van plastidendeling in genoemde plant of een amyloplast bevattend deel daarvan
7. Een transgene plant volgens conclusie 6, waarbij de plant behoort tot de knol- of zaadgewassen, of tot de granen.
8. Een aardappelplant, een graanplant of een cassaveplant volgens conclusie 7.
9. Een zetmeelrijk deel van een plant volgens een der conclusies 6-8.
10. Een zetmeelrijk deel van een plant volgens conclusie 9, waarbij het deel een knol, een wortel of een zaad omvat.

11. Een werkwijze voor het maken van een zetmeelsamenstelling met het kenmerk dat een plantencel volgens conclusie 5, of een plant of amyloplast bevattend deel daarvan volgens een der conclusies 6-10, wordt gebruikt.
12. Een zetmeelsamenstelling met het kenmerk dat althans een deel
5 daarvan verkregen is volgens conclusie 11, of een afgeleide van een dergelijke zetmeelsamenstelling.
13. Een product omvattende een zetmeelsamenstelling of een afgeleide daarvan volgens conclusie 12.
14. Een product volgens conclusie 13 waarbij het product een
10 voedselproduct is.
15. Een product volgens conclusie 13, waarbij het product een fysisch en/of chemisch bewerkte (bio)grondstof is voor de fabricage van een voedselproduct of gebruiksvoorwerp.
16. De toepassing van een zetmeelsamenstelling volgens conclusie 12 of
15 een product volgens conclusie 13, voor het veranderen van het mondgevoel van een voedselproduct.
17. In nucleïnezuur volgens figuur 1 of een functioneel deel daarvan.
18. Een eiwitmolecuul volgens figuur 1 of een functioneel deel daarvan.



Figuur 1. DNA- sequentie en afgeleide eiwitsequentie van aardappel-FtsZ1.

ATGGCGATTTTAGGGCTCTCAAATCCAGCAGAATTAGCTTCTTCTCTTCTTCTCCTTA
 M A I L G L S N P A E L A S S P S S S L

 ACTTTTCCACAGGCTACATACTTCCTTCATTCTAAACAATGCTTCTTACCAGGAGTT
 T F S H R L H T S F I P K Q C F F T G V

 CGCCGAAAAGTTTTGGCCGGCTCAACGTTTCAGCATTTCAGTTCATTTACTCCGATG
 R R K S F C R P Q R F S I S S S F T P M

 GATTCTGCTAAGATTAAGGTTCGTCGGCGTCGGTGGAGGTGGAACAATGCCGTTAACCGT
 D S A K I K V V G V G G G G N N A V N R

 ATGATTGGTAGTGGCTTACAGGGTGTGACTTCTATGCTATAAACACGGATGCTCAAGCA
 M I G S G L Q G V D F Y A I N T D A Q A

 CTGGTACAGTCTGCTGCCGAGAACCCTTCAAATTGGAGAACTTCTGACTCGTGGGCTT
 L V Q S A A E N P L Q I G E L L T R G L

 GGTACTGGTGGCAATCCTCTTTTAGGGGAACAGGCAGCGGAGGAGTCAAAGGAAGCTATT
 L V Q S A A E N P L Q I G E L L T R G L

 GCAAATCTCTAAAAGGTTTCAGATATGGTTCATAACAGCAGGAATGGGTGGAGGTACA
 A N S L K G S D M V F I T A G M G G G T

 GGATCTGGTGGGCTCCTGTGTGGCTCAAATAGCAAGAAGCAGGTTATTGACTGTT
 G S G A A P V V A Q I A K E A G Y L T V

 GGTGTGTTACATATCCTTTTCAGCTTTGAAGGACGTAAGATCTGTGCAGGCTCTGGAA
 G V V T Y P F S F E G R K R S V Q A L E

 GCAATTGAAAACTTCAGAGAAATGTTGACACTCTTATAGTAATCCCAATGATCGTCTA
 A I E K L Q R N V D T L I V I P N D R L

 CTAGATATTGCCGATGAGCAGACACCACTTCAAGATGCTTCTTCTTGCAGATGATGTA
 L D I A D E Q T P L Q D A F L L A D D V

 TTACGTCAAGGTGTCCAAGGAATATCTGATATAATCACTATTCTGGGCTTGTGAATGTG
 L R Q G V Q G I S D I I T I P G L V N V

 GATTTTCCGATGTAAAGGCAGTGATGAAAGACTCTGGAAGTCTATGCTCGGAGTGGGG
 D F A D V K A V M K D S G T A M L G V G

 GTTTCATCAAGCAAGGACCGAGCTGAAGAAGCAGCCGAACAAGCAACTCTGGCCCTCTA
 V S S S K D R A E E A A E Q A T L A P L

 ATTGGGTCGTCGAATTCATCTGCAACTGGGGTAGTTTATAACATTACAGGAGGAAAAGAC
 I G S S I Q S A T G V V Y N I T G G K D

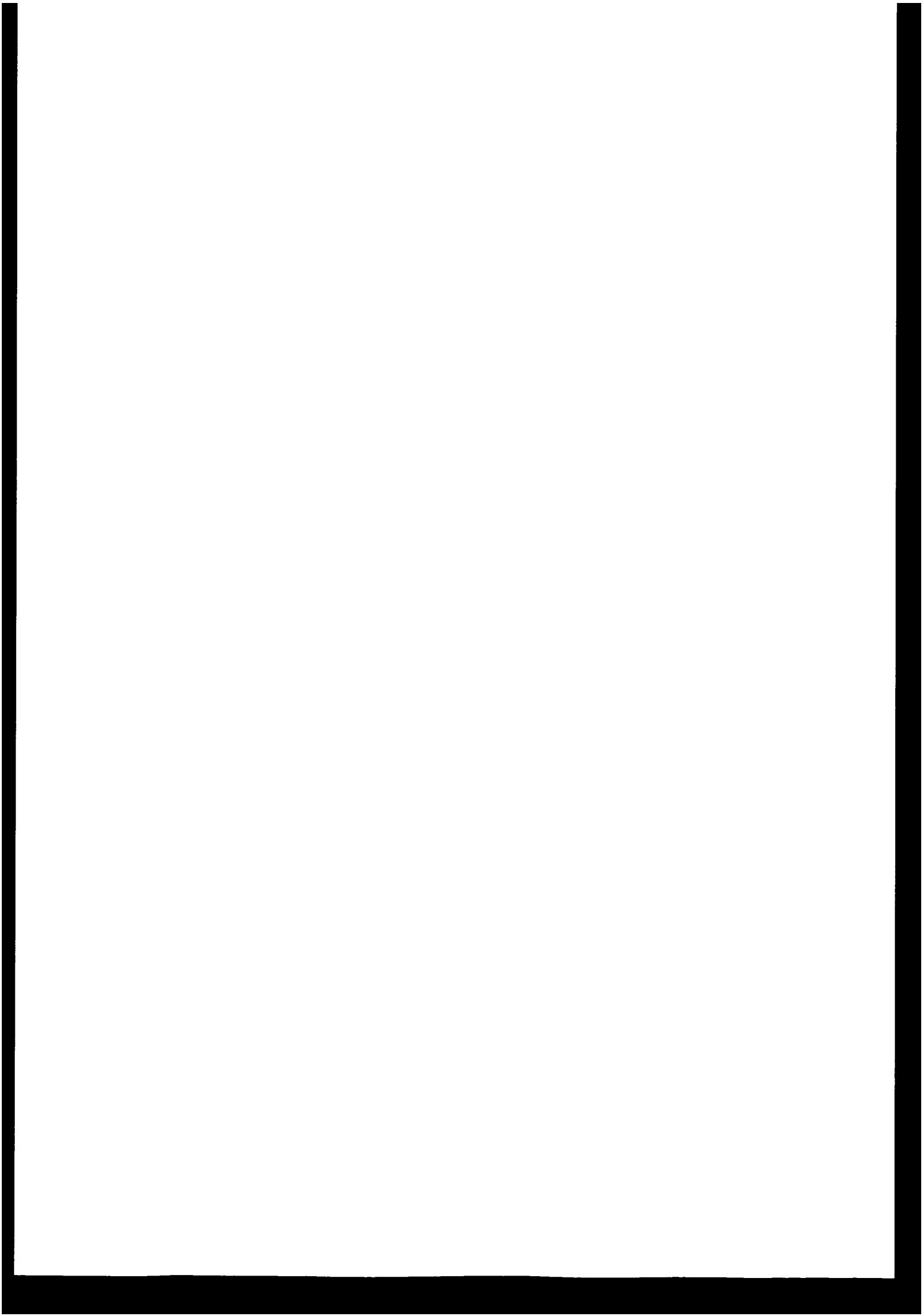
 ATAACCTTTGCAAGAAGTGAATAGGGTGTCCCAGGTTGTTACCAGTCTGGCTGATCCCTCT
 I T L Q E V N R V S Q V V T S L A D P S

 GCTAACATCATATTTGGTGCTGTTGTTGATGAGCGTTACAATGGTGAAATACCGTGACA
 A N I I F G A V V D E R Y N G E I H V T

 ATAATTGCAACTGGTTTCACCCAGTCGTTTCAGAAGACACTTCTATCTGACCCACGAGGA
 I I A T G F T Q S F Q K T L L S D P R G

 GCAAAGCTACTTGAGAAGGGCTCTGGAATCAAAGAAAGCATGGCATCACCTGTTACCCTG
 A K L L E K G S G I K E S M A S P V T L

 AGATCATCAAACCTCACCTTCAACAACCTCACGGACACCTACTCGAAGGCTGTTCTTTTAG
 R S S N S P S T T S R T P T R R L F F *
 CTCCTTCATATTGCTTTTTTACAGCTTCATTACTCTCCTTTTTAGTTTCTCCTTTGTA
 TTTAACATGTTTTGCTGAAGGGAAGTATTGGTGTGTCATGTGGCTGTAGAGATAGTGA
 TTATCTTTATCAGATGCATACTCAGCTGTGCTCTCTTGTGACAGCACGTTTTTACGCAT
 GTAAATATTGATACTTGTATTAG₃₁



Figuur 2. Sequentievergelijking van FtsZ uit *Arabidopsis* (AtFtsZ-1) en aardappel (StFtsZ-1).

```

AtFtsZ-1: 1  MAIPLAQLNELTISSSSSSFLTKSISSSHSLHSSCICASSRISQFRGGFSKRRSDSTRSK
              MAI+ L+ N  ++SS SS LT  SH LH+S I  +  F G  RR  R +
StFtsZ-1: 1  MAILGLS--NPaelassPSSSLT---FSHRLHTSFI---PKQCFFTG---VRRKSFCRPQ

AtFtsZ-1: 61  SMRLRCsfSPMESARIKVIgVGGGGNNAVNRMISsGLQSVDFYaintDSQALLQfSAENP
              +  SF+PM+SA+IKV+GVGGGGNNAVNRMi  SGLQ  VDFYaintD+QAL+Q  +AENP
StFtsZ-1: 50  RFSISSsFTPMDSAKIKVGVGGGGNNAVNRMIGSLQGVDfYaintDAQALVQSAAENP

AtFtsZ-1: 121 LQIGELLTRGLGTGGNPLLGEQAAEESKDAIANALKGSDLVFITAGMGGGTGSGAAPVVA
              LQIGELLTRGLGTGGNPLLGEQAAEESK+AIAN+LKGSD+VFITAGMGGGTGSGAAPVVA
StFtsZ-1: 110 LQIGELLTRGLGTGGNPLLGEQAAEESKEAIANS�KGSDMVFITAGMGGGTGSGAAPVVA

AtFtsZ-1: 181 QISKDAGYLTVGvVtYPFSfEGRRKRSLQALEAIEKLQKNVDTLIVIPNDRLLDIADEQTP
              QI+K+AGYLTVGvVtYPFSfEGRRKRS+QALEAIEKLQ+NVDTLIVIPNDRLLDIADEQTP
StFtsZ-1: 170 QIAKEAGYLTVGvVtYPFSfEGRRKRSVQALEAIEKLQRNVDTLIVIPNDRLLDIADEQTP

AtFtsZ-1: 241 LQDAFLLADDVLRQGVQGISDIITIPGLVNVDfADVKAvmKDSGTAMLGvGVSSSKNRAE
              LQDAFLLADDVLRQGVQGISDIITIPGLVNVDfADVKAvmKDSGTAMLGvGVSSSK+RAE
StFtsZ-1: 230 LQDAFLLADDVLRQGVQGISDIITIPGLVNVDfADVKAvmKDSGTAMLGvGVSSSKDRAE

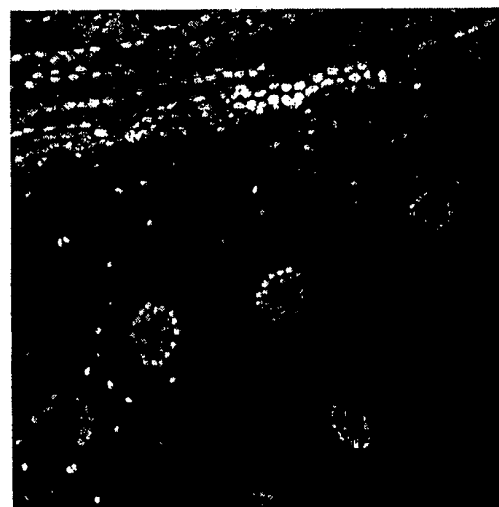
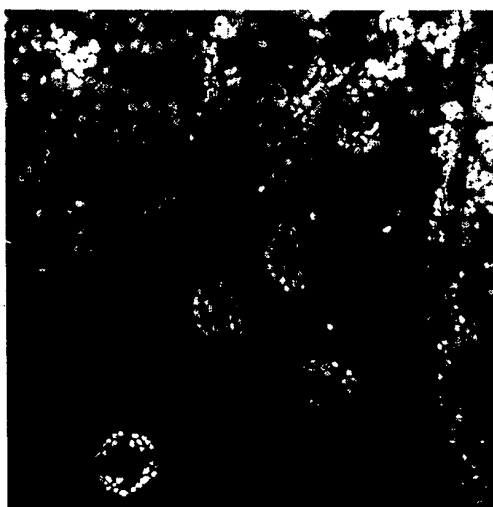
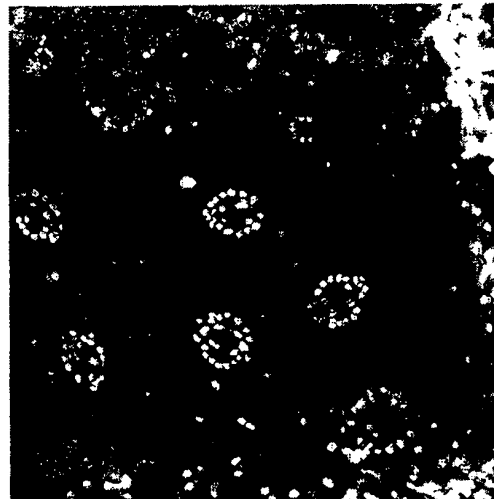
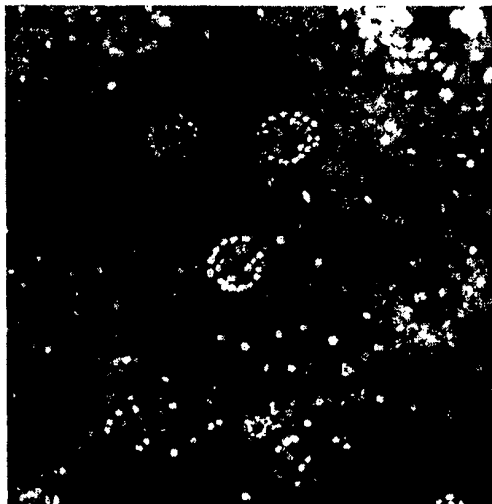
AtFtsZ-1: 301 EAAEQATLAPLIGSSIQSATGVVYNITGGKDITLQEVNRVSQVVTSLADPSANIIFGAVV
              EAAEQATLAPLIGSSIQSATGVVYNITGGKDITLQEVNRVSQVVTSLADPSANIIFGAVV
StFtsZ-1: 290 EAAEQATLAPLIGSSIQSATGVVYNITGGKDITLQEVNRVSQVVTSLADPSANIIFGAVV

AtFtsZ-1: 361 DDRYtGEIHVTIIATGFSQSFQKTLTDPRAAKLLDKMGSSGQENKGMSLPHQKQSPST
              D+RY GEIHVTIIATGF+QSfQKTLT+DPR AKLL+K  SG +E+  M+ P  +S ++
StFtsZ-1: 350 DERYNGEIHVTIIATGfTQSfQKTLSDPRGAKLLEK--GSGIKES--MASPVTLRSSNS

AtFtsZ-1: 421 ISTKSSSP-RRLFF 433
              ST S +P RRLFF
StFtsZ-1: 406 PSTTSRTPTRRLFF 419

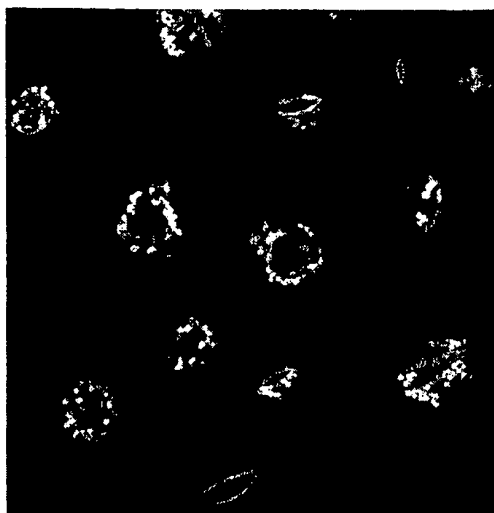
```

Figuur 3. Chloroplasten in stomata van wild type, sense en antisense FtsZ⁻ aardappelplanten.

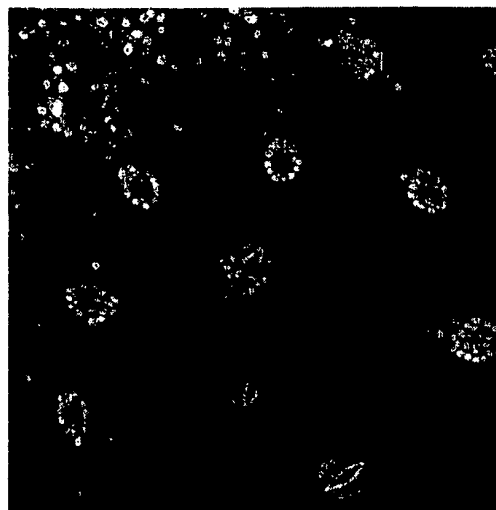


wild type

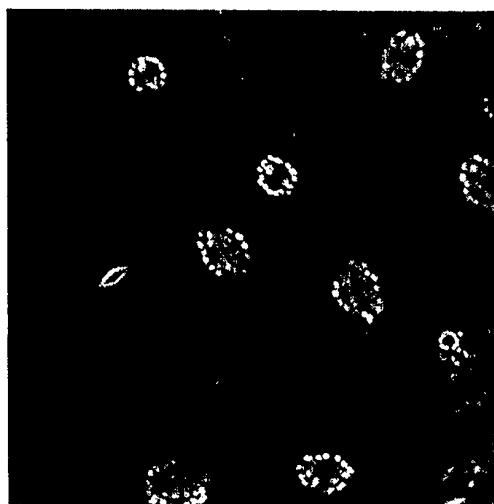
wild type



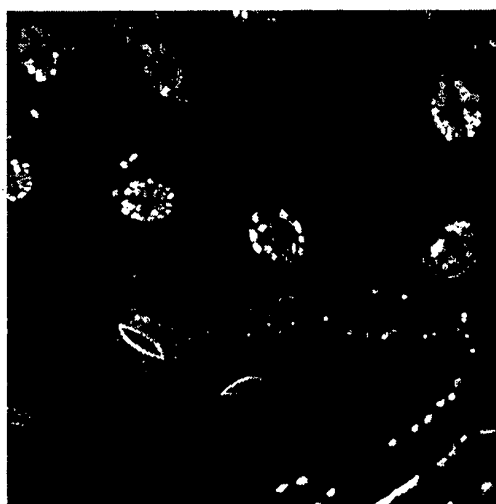
35S sense 1



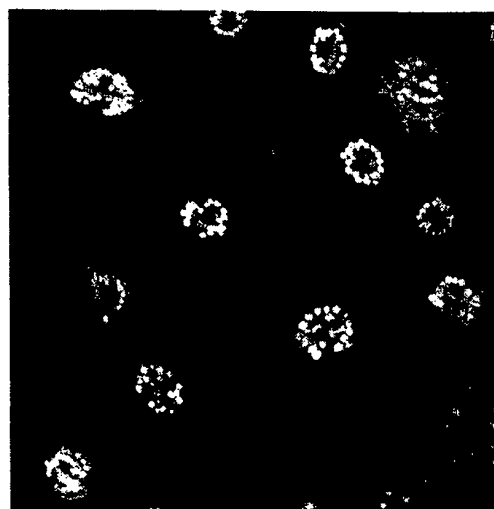
35S sense 2



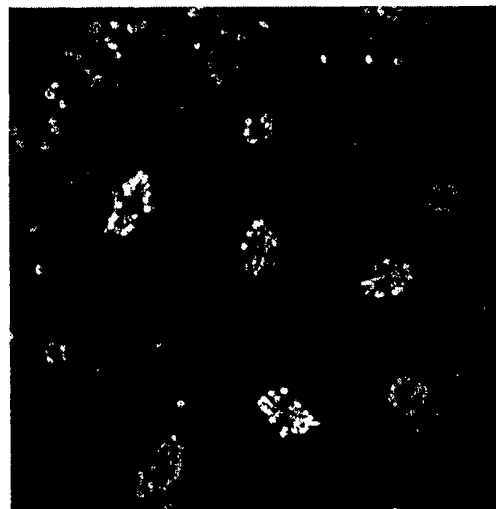
35S sense 3



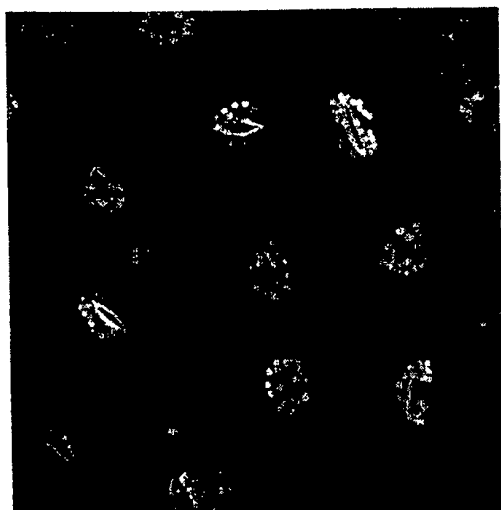
35S sense 4



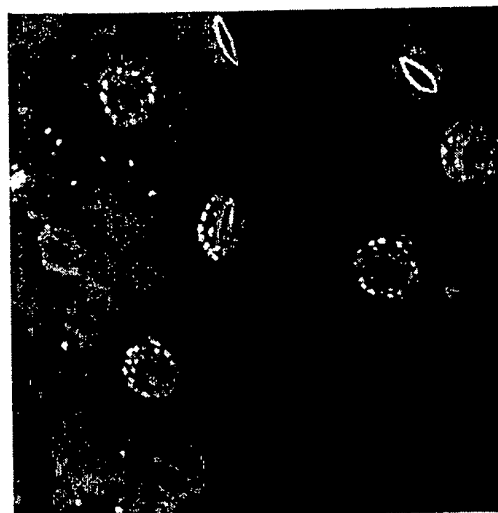
35S sense 5



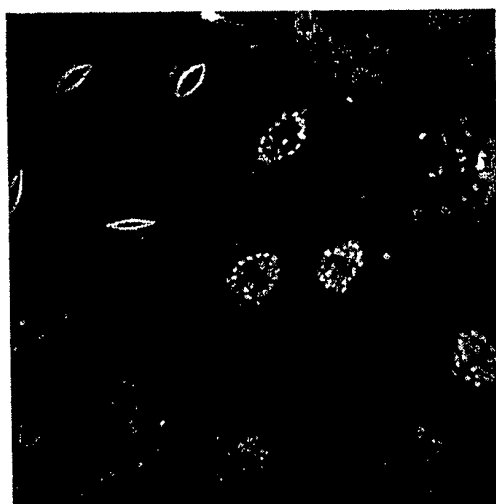
35S sense 6



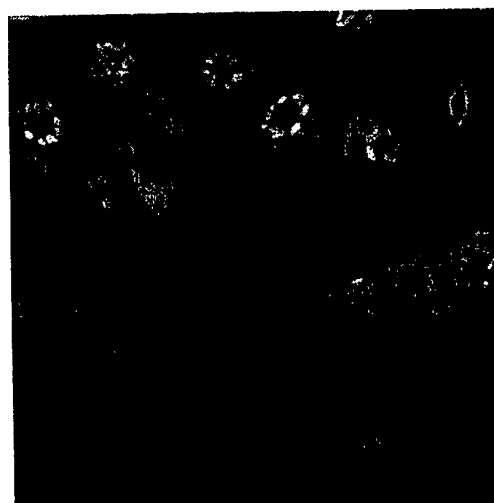
35S sense 7



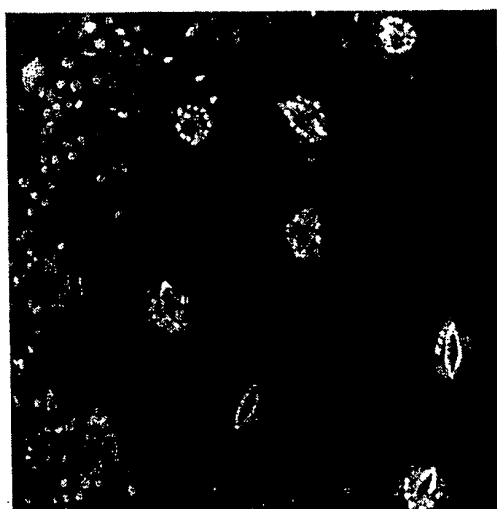
35S sense 8



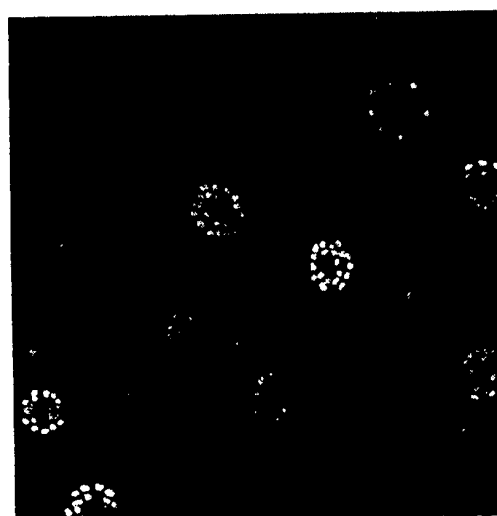
35S sense 9



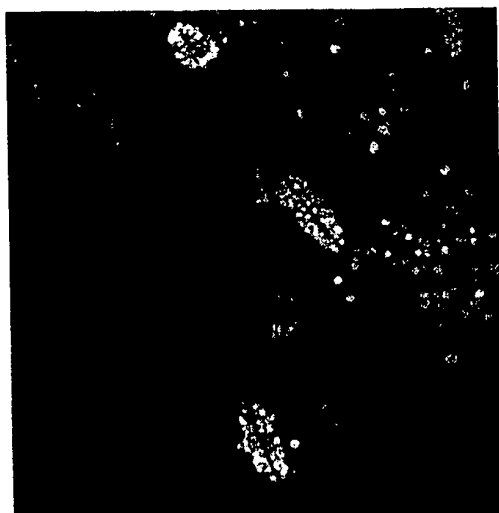
35S sense 10



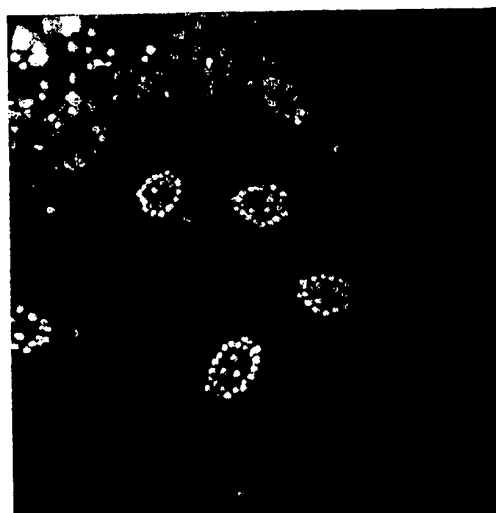
35S sense 11



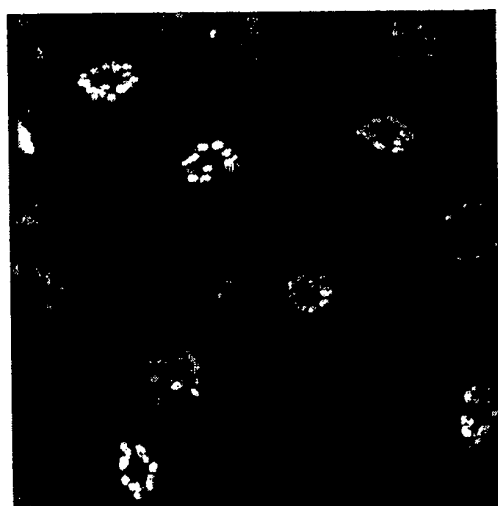
35S sense 12



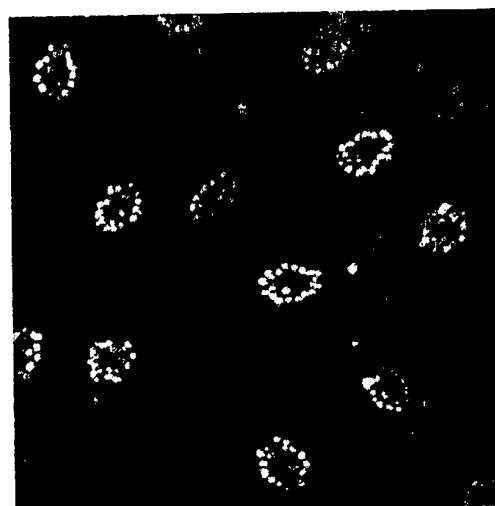
35S sense 15



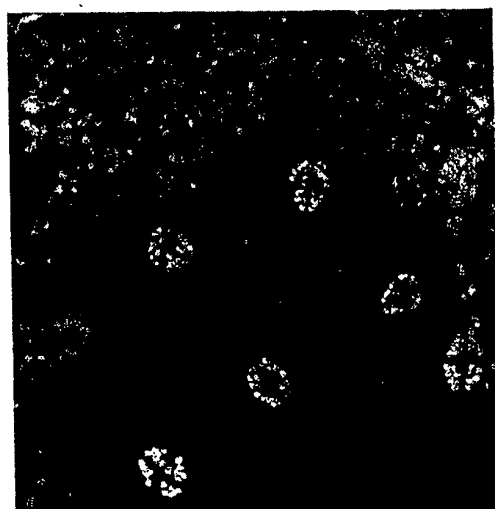
35S sense 16



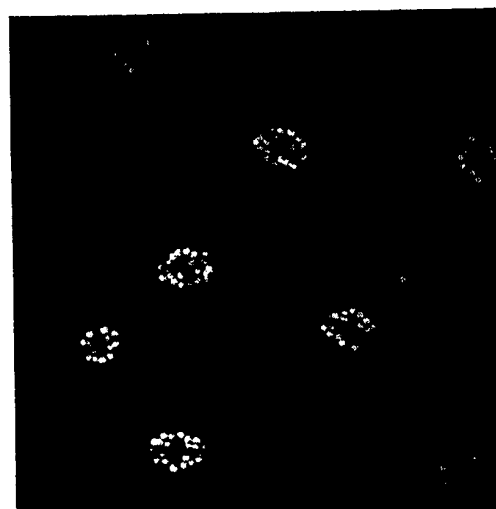
35S sense 23



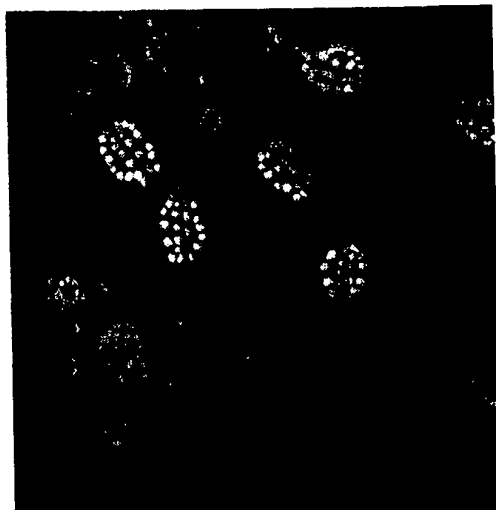
35S sense 24



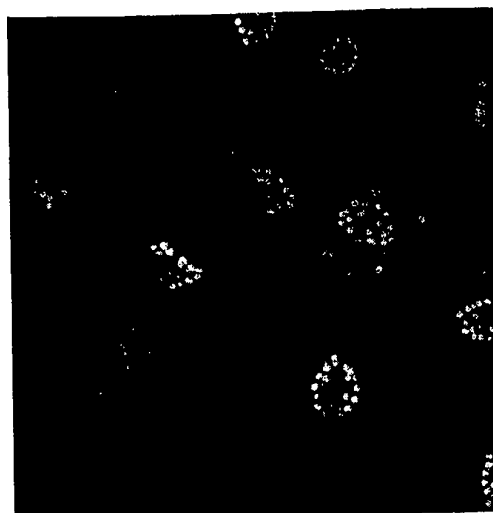
35S sense 25



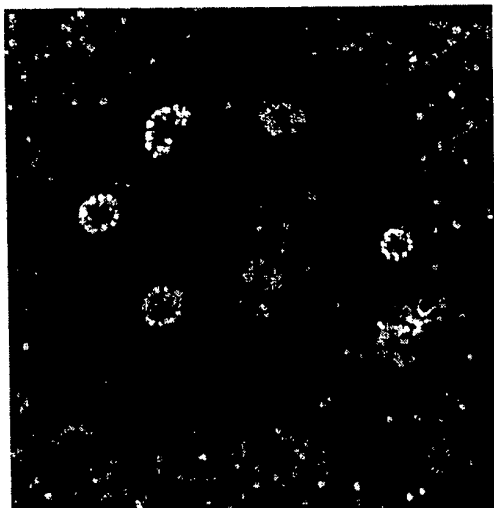
35S sense 26



35S sense 29



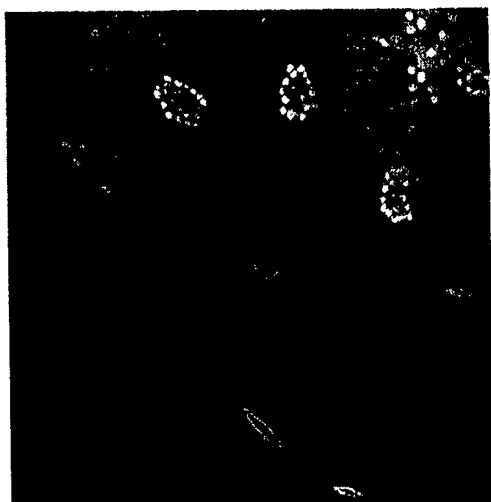
35S sense 30



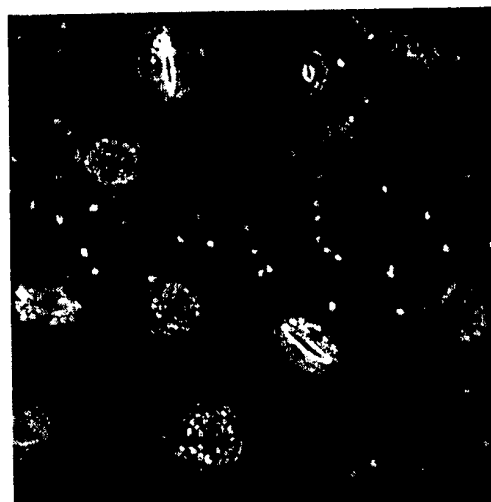
35S antisense 1



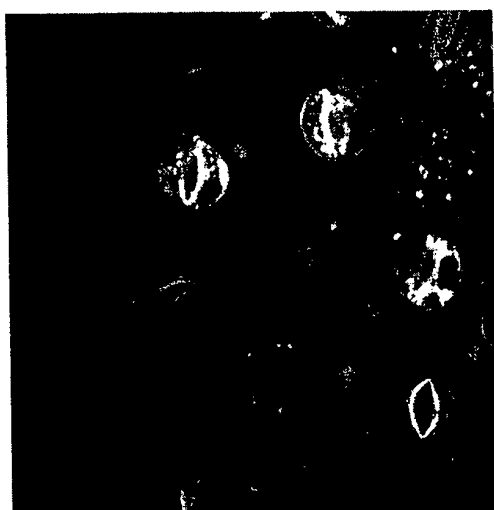
35S antisense 2



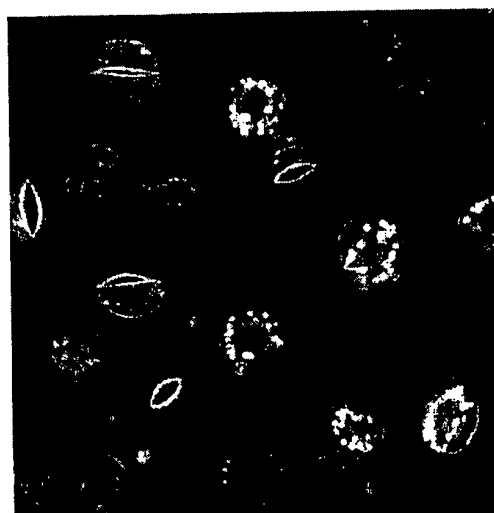
35S antisense 3



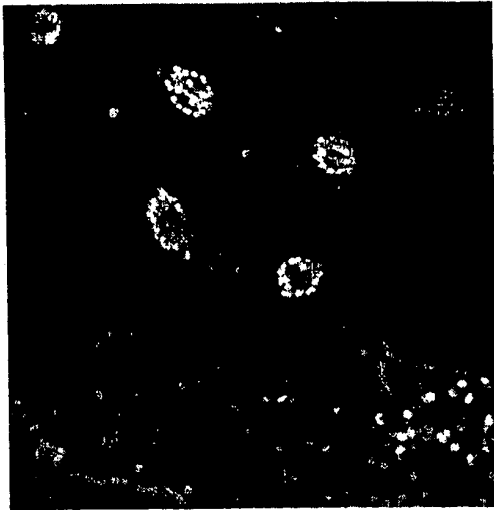
35S antisense 4



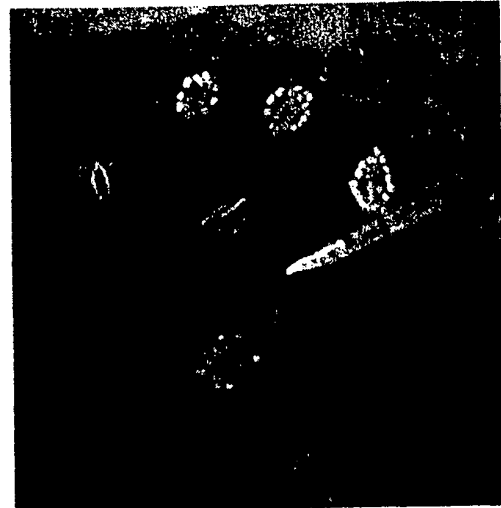
35S antisense 5



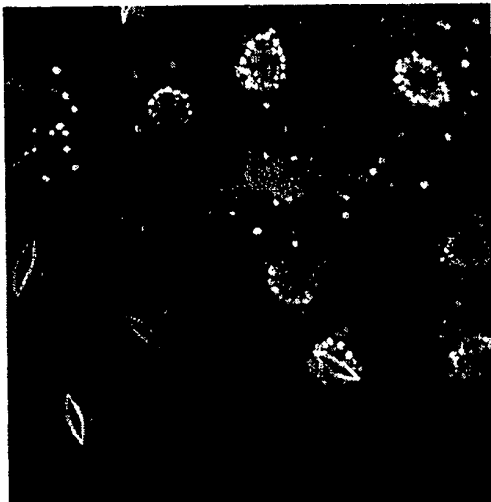
35S antisense 6



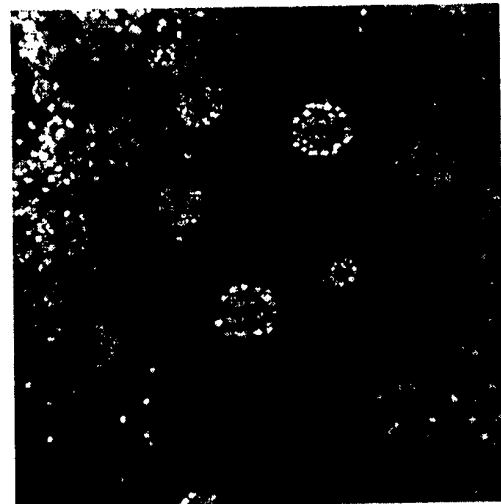
35S antisense 7



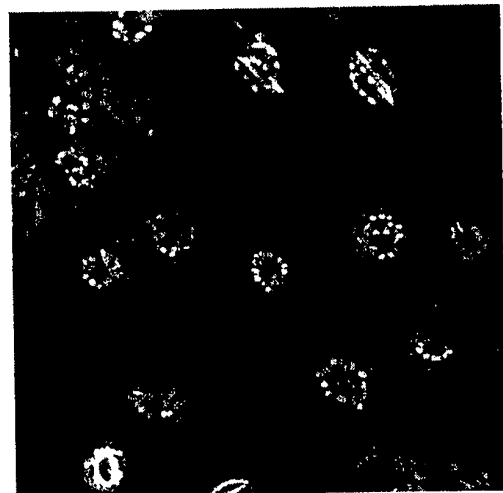
35S antisense 8



35S antisense 9

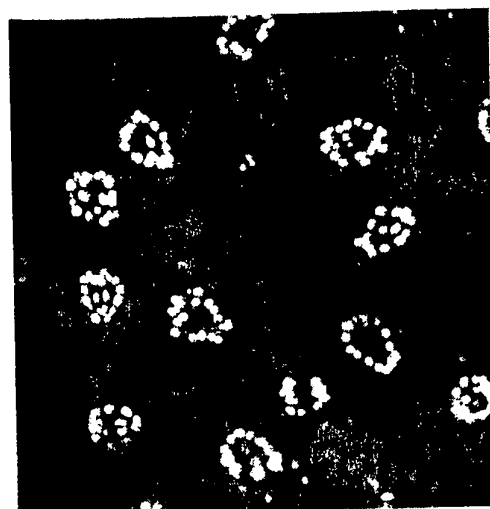


35S antisense 10

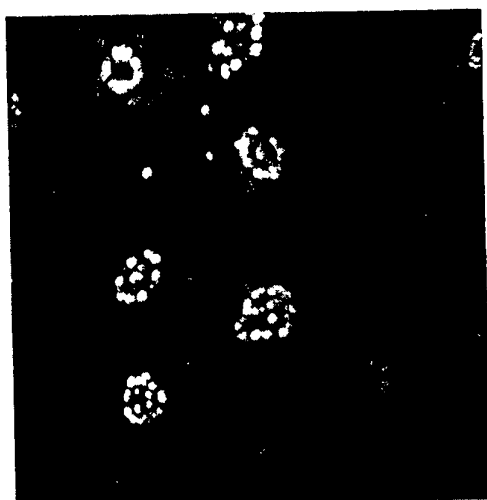




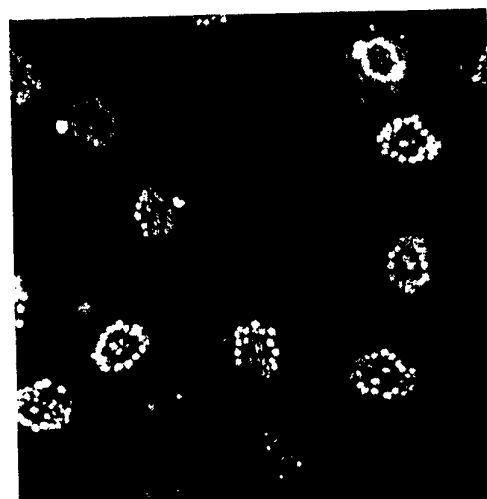
35S antisense 13



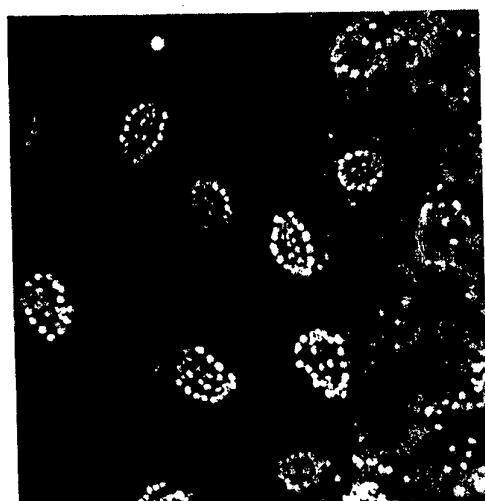
35S antisense 14



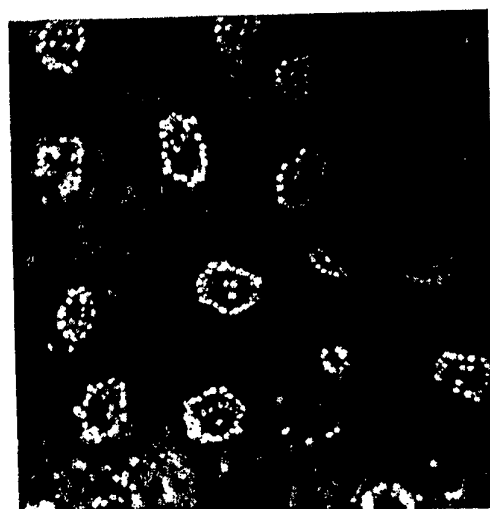
35S antisense 15



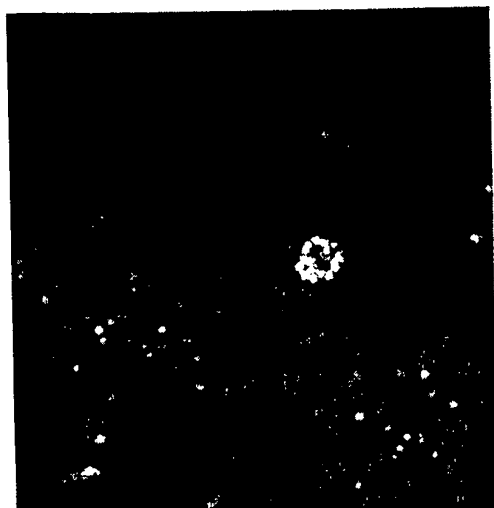
35S antisense 16



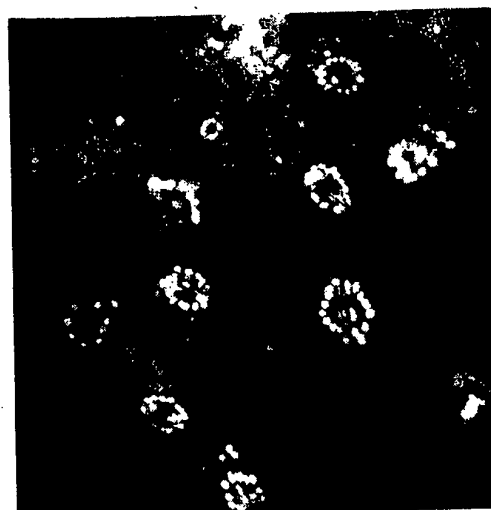
35S antisense 17



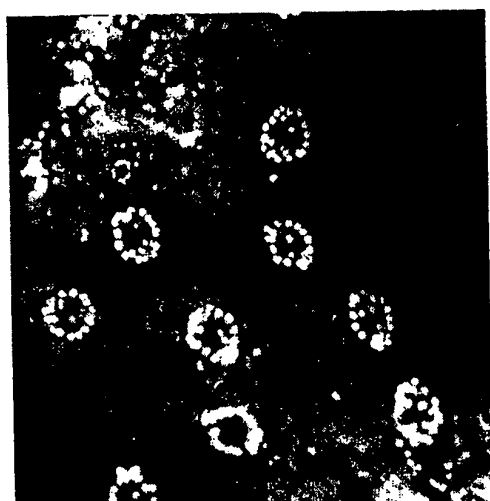
35S antisense 18



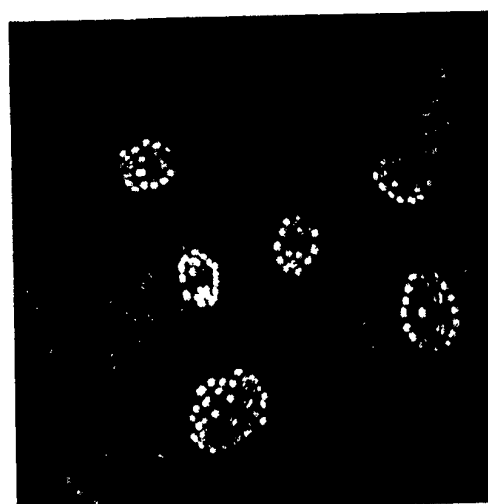
35S antisense 19



35S antisense 20



35S antisense 21



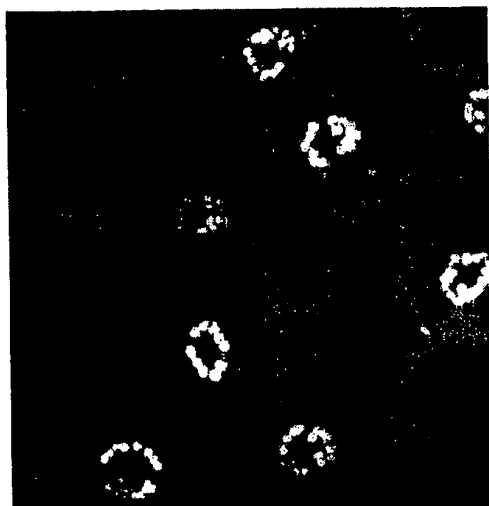
35S antisense 23



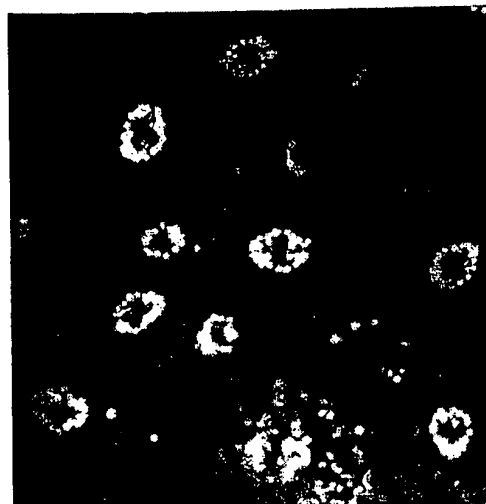
35S antisense 24



35S antisense 25



35S antisense 26



35S antisense 27

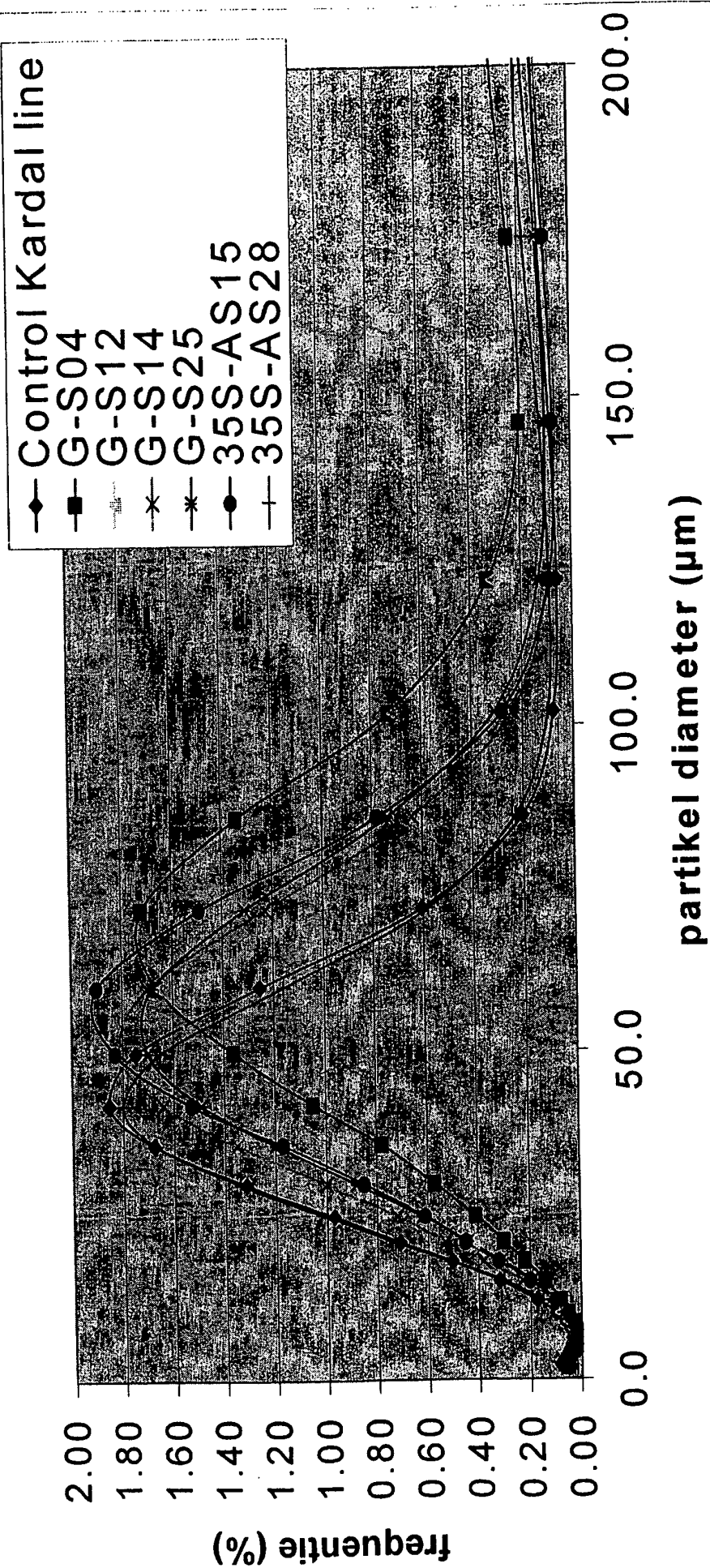


35S antisense 28



35S antisense 29

**Figuur 4. Differentiele volume partikel grootte
distributie**



SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)

RAPPORT BETREFFENDE NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFICATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE		KENMERK VAN DE AANVRAGER OF VAN DE GEMACHTIGDE P64493NL00	
Nederlands aanvraag nr. 1023309		Indieningsdatum 29 april 2003	
		Ingeroepen voorrangsdatum	
Aanvrager (Naam) TNO			
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 40867 NL	
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)			
Volgens de internationale classificatie (IPC) Int.Cl.7: C12N15/82 C07K14/415			
II. ONDERZOChte GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK			
Onderzochte minimum documentatie			
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen		
Int.Cl.7:	C12N C07K		
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 1023309

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
IPC 7 C12N15/82 C07K14/415

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)

IPC 7 C12N C07K

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)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie *	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
A	WO 98 00436 A (UNIV NEVADA) 8 Januari 1998 (1998-01-08) het gehele document	
A	WO 01 81601 A (UNIV AND COMMUNITY COLLEGE SYS) 1 November 2001 (2001-11-01) het gehele document	
E	WO 03 035874 A (GEMSTAR CAMBRIDGE LTD) 1 Mei 2003 (2003-05-01) SEQIDIDS 11 + 12 het gehele document	1-18

☐ 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

Z document dat deel uitmaakt van dezelfde octrooifamilie

Datum waarop het nieuwheidsonderzoek van internationaal type werd voltooid

9 September 2003

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

Holtorf, S

**VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE**

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1023309

In het rapport genoemd octrooigescrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
WO 9800436	A	08-01-1998	AU 740787 B2 15-11-2001
		AU 3644497 A 21-01-1998	
		BR 9710059 A 11-01-2000	
		CA 2259209 A1 08-01-1998	
		EP 0912596 A1 06-05-1999	
		JP 2000514291 T 31-10-2000	
		WO 9800436 A1 08-01-1998	
		US 5981836 A 09-11-1999	
WO 0181601	A	01-11-2001	AU 5167301 A 07-11-2001
		WO 0181601 A2 01-11-2001	
WO 03035874	A	01-05-2003	WO 03035874 A1 01-05-2003