

(12) BELGISCHER PATENTANTRAG

(41) Veröffentlichungsdatum : 23/07/2024

(21) Antragsnummer : BE2024/5009

(22) Anmeldetag : 09/01/2024

(62) Teilantrag des früheren Antrags :

(62) Anmeldetag des früheren Antrags :

(51) Internationale Klassifikation : G01N 33/00, G01N 23/046

(30) Prioritätsangaben :

17/01/2023 CN 202310077757.X

(71) Anmelder :

INSTITUTE OF BOTANY, THE CHINESE ACADEMY OF SCIENCES
öffentliche Einrichtung
100093 , BEIJING
China

(72) Erfinder :

XIUPING Xu
100093 BEIJING
China

(54) Verfahren zum Mikro-CT-Scan von Endospermzellen bei Gramineen-Samen mit hohem Stärkegehalt

(57)Die vorliegende Erfindung offenbart ein Verfahren zum Mikro-CT-Scan von Endospermzellen bei Gramineen-Samen mit hohem Stärkegehalt. Das Verfahren zum Mikro-CT-Scan von Endospermzellen bei Gramineen-Samen mit hohem Stärkegehalt umfasst die folgenden Schritte: 1) Lösen von Phosphorwolframsäure in einer FAA-Fixierungslösung, um eine Phosphorwolframsäurelösung zu erhalten; 2) Einweichen der zu prüfenden Samen mit hohem Stärkegehalt in die Phosphorwolframsäurelösung, Durchführen einer Schüttlerbehandlung und danach einer Fixierungs- und Färbebehandlung; 3) Dehydratisieren und dann Trocknen der Samen mit hohem Stärkegehalt bei einem kritischen Punkt von Kohlendioxid nach der Fixierungs- und Färbebehandlung in Schritt 2); 4) Mikro-CT-Scan der in Schritt 3) behandelten Samen mit hohem Stärkegehalt. Die Erfindung kombiniert die Schüttlervorbehandlung mit dem Behandlungsverfahren für Samen mit hohem Stärkegehalt durch Einweichen unter Verwendung einer Phosphorwolframsäurelösung und optimiert die Behandlungsbedingungen. Danach erfolgt eine Trocknung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid, was den Mikro-CT-Kontrast von Samen mit hohem Stärkegehalt stark verbessert.

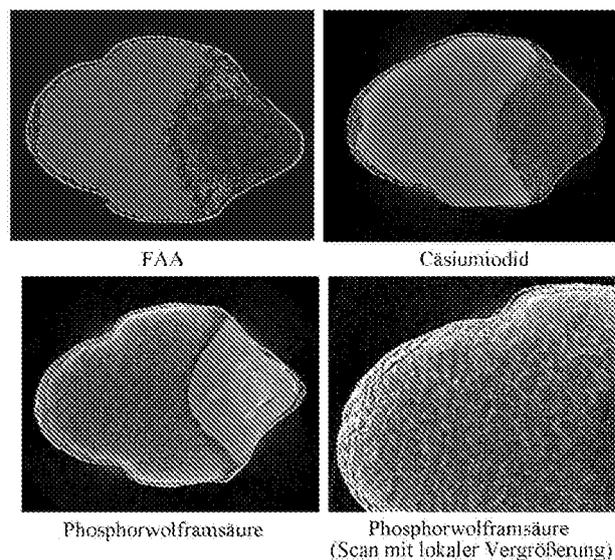


Fig. 1

Verfahren zum Mikro-CT-Scan von Endospermzellen bei Gramineen-Samen mit hohem Stärkegehalt

TECHNISCHES GEBIET

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Mikro-CT-Scan von Endospermzellen bei Gramineen-Samen mit hohem Stärkegehalt und gehört zum Gebiet der Biotechnologie.

Stand der Technik

Eine übliche Methode zur Untersuchung der Morphologie und Struktur von Stärke- oder Endospermzellen der Samen besteht darin, die Samen im Füllstadium in Scheiben zu schneiden und die freiliegenden Stärkekörner und Endospermzellstrukturen unter einem Lichtmikroskop zu beobachten. Reife Samen sind jedoch aufgrund ihrer großen Härte äußerst schwierig zu schneiden. Daher ist es eines der technischen Probleme, die bei der Erforschung der Morphologie und Struktur reifer Samen auftreten, wie der Anordnungszustand von Samenendospermzellen mit hohem Stärkegehalt direkt beobachtet werden kann, ohne die Struktur reifer Samen zu zerstören.

CN111398000A offenbart ein Verfahren zur Verbesserung des Mikro-CT-Kontrasts von Samen mit hohem Stärkegehalt, mit dem die morphologische Struktur von Samen direkt beobachtet werden kann, ohne die Struktur von reifen Samen zu zerstören, aber das Verfahren ist nur für Samen mit niedrigerem Stärkegehalt geeignet, wie Mungobohnensamen (mit Stärkegehalt von nicht mehr als 50%); Bei Samen mit hohem Stärkegehalt gibt es aufgrund der gleichmäßigen inneren Dichte der Samen keinen Unterschied in der Strahldurchlässigkeit, und der rekonstruierte Stärketeil des Bildes weist eine einheitliche Textur auf, und einzelne Strukturen können überhaupt nicht unterschieden werden. Daher ist ein Verfahren erforderlich, um den Mikro-CT-Kontrast von Samen mit hohem Stärkegehalt wirksam zu verbessern.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zum Mikro-CT-Scan von Endospermzellen bei Gramineen-Samen mit hohem Stärkegehalt bereitzustellen, bei dem die Schüttelvorbereitung mit dem Behandlungsverfahren für Samen mit hohem Stärkegehalt durch Einweichen unter Verwendung einer Phosphorwolframsäurelösung kombiniert wird und die Behandlungsbedingungen optimiert werden. Dann erfolgt eine Trocknung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid, was den Mikro-CT-Kontrast von Samen

mit hohem Stärkegehalt stark verbessert.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch die folgende technische Lösung:

Das Verfahren zum Mikro-CT-Scan von Endospermzellen bei Gramineen-Samen mit hohem Stärkegehalt nach der vorliegenden Erfindung umfasst die folgenden Schritte:

5 1) Lösen von Phosphorwolframsäure in einer FAA-Fixierlösung, um eine Phosphorwolframsäurelösung zu erhalten;

2) Einweichen der zu prüfenden Samen mit hohem Stärkegehalt in die Phosphorwolframsäurelösung, Durchführen einer Schüttlerbehandlung und danach einer Fixierungs- und Färbebehandlung;

10 3) Dehydratisieren und dann Trocknen der Samen mit hohem Stärkegehalt bei einem kritischen Punkt von Kohlendioxid nach der Fixierungs- und Färbebehandlung in Schritt 2);

4) Mikro-CT-Scan der in Schritt 3) behandelten Samen mit hohem Stärkegehalt;

wobei:

der Stärkegehalt der Samen mit hohem Stärkegehalt mehr als 60% beträgt;

15 in Schritt 2) die Bedingungen für die Fixierungs- und Färbebehandlung wie folgt sind:
die Temperatur beträgt 4°C;

die Zeit beträgt 30-60 Tage;

20 während der Fixierungs- und Färbebehandlung wird die Phosphorwolframsäurelösung gewechselt und einer Schüttlerbehandlung unterzogen, um dann die Fixierungs- und Färbebehandlung fortzusetzen; wobei die Phosphorwolframsäurelösung alle zwei Wochen ausgetauscht wird.

Die Samen mit hohem Stärkegehalt werden aus Reissamen (mit einem Stärkegehalt von ca. 70%), Lila-Reissamen (mit einem Stärkegehalt von 70%), Hirsesamen (mit einem Stärkegehalt von 70%), Hafersamen (mit einem Stärkegehalt von 60%), Klebreissamen (mit
25 einem Stärkegehalt von 75%), Sorghumsamen (mit einem Stärkegehalt von 70%) oder roten Reissamen (mit einem Stärkegehalt von 60%) ausgewählt.

In Schritt 1) beträgt die Massenkonzentration von Phosphorwolframsäure in der Phosphorwolframsäurelösung 1-10%, z.B. 1%, 5% oder 10%.

30 In Schritt 1) lautet die Zusammensetzung der FAA-Fixierlösung pro 100 ml wie folgt:
50% wässrige Ethanollösung 90 mL; Eisessigsäure 5 mL; Formaldehyd 5 mL.

In Schritt 2) sind die Bedingungen für die Schüttlerbehandlung wie folgt: die Temperatur beträgt 4°C; die Zeit beträgt 7,5-8,5 h, vorzugsweise 8 h; die Drehzahl beträgt 40-80 U/min, vorzugsweise 60 U/min.

In Schritt 2) werden für verschiedene Samen mit hohem Stärkegehalt unterschiedliche

Fixierungs- und Färbebehandlungszeiten ausgewählt, um einen besseren Kontrast zu erzielen, insbesondere wird die Zeit der Fixierungs- und Färbebehandlung wie folgt festgelegt:

wenn die Samen mit hohem Stärkegehalt Reissamen, Lila-Reissamen, Hafersamen, Klebreissamen oder rote Reissamen sind, beträgt die Zeit der Fixierungs- und Färbebehandlung
5 39-41 Tage;

wenn die Samen mit hohem Stärkegehalt Hirsesamen sind, beträgt die Zeit der Fixierungs- und Färbebehandlung 30-32 Tage;

wenn die Samen mit hohem Stärkegehalt Sorghumsamen sind, beträgt die Zeit der Fixierungs- und Färbebehandlung 58-60 Tage.

10 In Schritt 3) wird die Dehydratisierungsbehandlung unter Verwendung einer wässrigen Ethanollösung durchgeführt; wobei zur Dehydratisierungsbehandlung eine Gradientendehydratisierung der Reihe nach unter Verwendung einer wässrigen Ethanollösung mit einem Volumenanteil von 70%, 80%, 90% und 100% für jeweils 10-20 Minuten erfolgt.

In Schritt 4) sind die Bedingungen für den Mikro-CT-Scan wie folgt: die Auflösung
15 beträgt 0,56-1,15 μm ; die Abtastspannung beträgt 40-100 kV, vorzugsweise 100 kV; die Scan-Schrittgröße beträgt 0,2°; 2 Bilder werden in jedem Winkel abgebildet.

In Schritt 4) werden für verschiedene Samen mit hohem Stärkegehalt unterschiedliche Auflösungen und Abtastspannungen eingestellt, um einen besseren Kontrast zu erreichen; die Auflösung und Abtastspannung des Mikro-CT-Scans werden wie folgt festgelegt:

20 für Reissamen beträgt die Auflösung des Mikro-CT-Scans 0,88 μm und die Abtastspannung beträgt 100 kV;

für Lila-Reissamen beträgt die Auflösung des Mikro-CT-Scans 0,95 μm und die Abtastspannung beträgt 100 kV;

25 für Hirsesamen beträgt die Auflösung des Mikro-CT-Scans 0,68 μm und die Abtastspannung beträgt 41 kV;

für Hafersamen beträgt die Auflösung des Mikro-CT-Scans 0,88 μm und die Abtastspannung beträgt 100 kV;

für Klebreissamen beträgt die Auflösung des Mikro-CT-Scans 0,88 μm und die Abtastspannung beträgt 100 kV;

30 für Sorghumsamen beträgt die Auflösung des Mikro-CT-Scans 1,15 μm und die Abtastspannung beträgt 100 kV;

für rote Reissamen beträgt die Auflösung des Mikro-CT-Scans 0,74 μm und die Abtastspannung beträgt 100 kV.

Bei der vorliegenden Erfindung werden die Samenschalen der Samen mit hohem

Stärkegehalt vor der Durchführung des Schritts 1) aufgeschnitten.

Mit der vorliegenden Erfindung werden die folgenden vorteilhaften Auswirkungen erzielt:

1. Die Erfindung kombiniert das Schüttlerbehandlungsverfahren mit dem Einweichbehandlungsverfahren unter Verwendung einer Phosphorwolframsäurelösung, um die Fixierungs- und Färbewirkung von Samen mit hohem Stärkegehalt zu verbessern, und dann erfolgt eine Trocknung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid, was den Mikro-CT-Kontrast von Samen mit hohem Stärkegehalt stark verbessert.

2. Die vorliegende Erfindung bestimmt ferner die Betriebsbedingungen der Schüttlerbehandlung und der Fixierungs- und Färbebehandlung, um den Mikro-CT-Kontrast von Samen mit hohem Stärkegehalt zu verbessern.

DARSTELLUNG DER ERFINDUNG

Fig. 1 Querschnitte der beim kritischen Punkt getrockneten Proben der lokal vergrößerten Reissamen, die mit FAA-Fixierungslösung, 10% Cäsiumiodid, 10% Phosphorwolframsäure und 10% Phosphorwolframsäure behandelt wurden (von links nach rechts),

Fig. 2 Querschnitte der beim kritischen Punkt getrockneten Proben der lokal vergrößerten Lila-Reissamen, die mit FAA-Fixierungslösung, 10% Cäsiumiodid, Lugos-Lösung, 10% Phosphorwolframsäure und 10% Phosphorwolframsäure behandelt wurden (von links nach rechts),

Fig. 3 Querschnitte der beim kritischen Punkt getrockneten Proben der Hirsesamen, die mit FAA-Fixierungslösung, 10% Cäsiumiodid und 10% Phosphorwolframsäure behandelt wurden (von links nach rechts),

Fig. 4 Querschnitte der beim kritischen Punkt getrockneten Proben der Hafersamen, die mit FAA-Fixierungslösung und 10% Phosphorwolframsäure behandelt wurden (von links nach rechts),

Fig. 5 Querschnitte der beim kritischen Punkt getrockneten Proben der Klebreissamen, die mit FAA-Fixierungslösung, und 10% Phosphorwolframsäure behandelt wurden (von links nach rechts),

Fig. 6 Querschnitte der beim kritischen Punkt getrockneten Proben der Sorghumsamen, die mit FAA-Fixierungslösung und 10% Phosphorwolframsäure behandelt wurden (von links nach rechts),

Fig. 7 Querschnitte der beim kritischen Punkt getrockneten Proben roter Reissamen, die mit FAA-Fixierungslösung und 10% Phosphorwolframsäure behandelt wurden (von links nach

rechts),

Fig. 8 Querschnitte der beim kritischen Punkt getrockneten Proben der Mungobohnensamen, die mit FAA-Fixierungslösung, und 10% Phosphorwolframsäure behandelt wurden (von links nach rechts).

5 KONKRETE AUSFÜHRUNGSFORMEN

Eine weitere detaillierte Beschreibung der Erfindung wird nachstehend in Verbindung mit konkreten Ausführungsform angegeben, und die angegebenen Ausführungsformen dienen nur dazu, die Erfindung zu klären, anstatt den Umfang der Erfindung zu begrenzen.

Die Versuchsverfahren in den folgenden Ausführungsformen, wenn es keine spezielle Beschreibung gibt, sind herkömmliche Verfahren, die gemäß den in der Literatur auf diesem Gebiet beschriebenen Techniken oder Bedingungen oder gemäß der Produktspezifikation durchgeführt werden.

Die Materialien, Reagenzien usw., die in den folgenden Ausführungsformen verwendet werden, sind handelsüblich, wenn keine spezielle Beschreibung vorliegt.

15 In den nachfolgenden Ausführungsbeispielen:

die Zusammensetzung der FAA-Fixierlösung (100 ml) lautet wie folgt: 50% wässrige Ethanollösung 90 mL; Eisessigsäure 5 mL; Formaldehyd 5 mL.

Herstellung der Phosphorwolframsäurelösung: Lösen von Phosphorwolframsäure in einer FAA-Fixierungslösung, um eine Phosphorwolframsäurelösung mit einer Massenkonzentration von 10% zu erhalten;

Herstellung der Cäsiumiodidlösung: Lösen von Cäsiumiodid in einer FAA-Fixierungslösung, um eine Cäsiumiodidlösung mit einer Massenkonzentration von 10% zu erhalten;

Herstellung der Lugos-Lösung: 4 g Kaliumiodid und 2 g I₂ werden zu 50 ml FAA-Fixierungslösung gegeben, um eine Lugos-Lösung zu erhalten.

Trocknungsbehandlung beim kritischen Punkt von Kohlenstoffdioxid: die Behandlung erfolgt mit einem Kritisch-Punkt-Trockner (CPD300, Leica).

Mikro-CT-Scan: mit Skyscan 1172, Bruker.

Versuchsbeispiel 1: Behandlung zum Verbessern des Mikro-CT-Kontrasts für Reissamen

30 Die Reissamen werden in die FAA-Fixierungslösung, 10% Cäsiumiodidlösung bzw. 10% Phosphorwolframsäurelösung gegeben, und die Blasen werden durch wiederholtes Umdrehen der Behälter entfernt, bis die Proben in die Lösung einsinken. Schütteln für 8 Stunden lang bei

4°C auf einem Schüttler bei 60 U/min, und dann erfolgt ein Fixieren bei 4°C für 40 Tage; Die Lösung wird inzwischen alle zwei Wochen gewechselt. Nach jedem Wechsel muss die Lösung 8 Stunden lang bei 4°C und 60 U/min auf dem Schüttler geschüttelt werden, dann bei 4°C weiter fixiert; Dann wird die Gradientenethanoldehydratisierung mit 70%, 80%, 90% und
5 100% wässriger Ethanollösung durchgeführt, und bei jedem Gradient erfolgt jeweils eine Behandlung für 20 Minuten. Die dehydratisierten Proben werden einer Trocknungsbehandlung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid unterzogen.

Die getrockneten Proben werden einem Mikro-CT-Scan unterzogen. Die Auflösung für die Behandlung mit FAA-Fixierungslösung, 10% Cäsiumiodidlösung, 10%
10 Phosphorwolframsäurelösung beträgt 0,88 µm und die Abtastspannungen liegen bei 40 kV, 100 kV, 100 kV. Die lokale Vergrößerungsauflösung der mit 10% Phosphorwolframsäurelösung behandelten Probe beträgt 0,56 µm und die Abtastspannung liegt bei 100 kV; Die Scan-Schrittgröße beträgt 0,2° und 2 Bilder werden in jedem Winkel abgebildet.

15 Nach dem Scannen der Probe erfolgt ein Rekonstruieren mit der NRecon-Software, um ein Querschnittbild zu erhalten, wie in Fig. 1 gezeigt. Das obere linke Bild ist ein Querschnitt von Reissamen, die mit FAA-Fixierungslösung behandelt wurden, das obere rechte Bild ist ein Querschnitt von Reissamen, die mit 10% Cäsiumiodidlösung behandelt wurden, das untere linke Bild ist ein Querschnitt von Reissamen, die mit 10% Phosphorwolframsäure behandelt
20 wurden, und das untere rechte Bild ist ein teilweise vergrößerter Querschnitt von Reissamen, die mit 10% Phosphorwolframsäure behandelt wurden; Der Vergleich der vier Bilder zeigt, dass der Mikro-CT-Kontrast von Reissamen, die mit Phosphorwolframsäure behandelt und beim kritischen Punkt von Kohlendioxid getrocknet wurden, signifikant verbessert wird und die Morphologie der Endospermzellen deutlich sichtbar ist.

25 Versuchsbeispiel 2: Behandlung zum Verbessern des Mikro-CT-Kontrasts für Lila-Reissamen

Die Lila-Reissamen werden in die FAA-Fixierungslösung, 10% Cäsiumiodidlösung, Lugol-Lösung und 10% Phosphorwolframsäurelösung gegeben, und die Blasen werden durch wiederholtes Umdrehen der Behälter entfernt, bis die Proben in die Lösung einsinken.
30 Schütteln für 8 Stunden lang bei 4°C auf einem Schüttler bei 60 U/min, und dann erfolgt ein Fixieren bei 4°C für 40 Tage; Die Lösung wird inzwischen alle zwei Wochen gewechselt. Nach jedem Wechsel muss die Lösung 8 Stunden lang bei 4°C und 60 U/min auf dem Schüttler geschüttelt werden, dann bei 4°C weiter fixiert; Dann wird die Gradientenethanoldehydratisierung mit 70%, 80%, 90% und 100% wässriger Ethanollösung

durchgeführt, und bei jedem Gradient erfolgt jeweils eine Behandlung für 20 Minuten. Die dehydratisierten Proben werden einer Trocknungsbehandlung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid unterzogen.

Die getrockneten Proben werden einem Mikro-CT-Scan unterzogen. Die Auflösung für die Behandlung mit FAA-Fixierungslösung, 10% Cäsiumiodidlösung, Lugos-Lösung und 10% Phosphorwolframsäurelösung beträgt $0,95\ \mu\text{m}$ und die Abtastspannungen liegen bei 43kV, 100 kV, 100 kV und 100 kV. Die lokale Vergrößerungsauflösung der mit 10% Phosphorwolframsäurelösung behandelten Probe beträgt $0,56\ \mu\text{m}$ und die Abtastspannung liegt bei 100 kV; Die Scan-Schrittgröße beträgt $0,2^\circ$ und 2 Bilder werden in jedem Winkel abgebildet.

Nach dem Scannen der Probe erfolgt ein Rekonstruieren mit der NRecon-Software, um ein Querschnittbild zu erhalten, wie in Fig. 2 gezeigt. In der obere Reihe sind von links nach rechts jeweils Querschnitte der Lila-Reissamen, die mit FAA-Fixierungslösung, 10% Cäsiumiodid, Lugos-Lösung behandelt wurden, und in der unteren Reihe sind von links nach rechts lokal vergrößerte Querschnitte der Lila-Reissamen, die mit 10% Phosphorwolframsäurelösung und 10% Phosphorwolframsäurelösung behandelt wurden. Durch einen Vergleich ist ersichtlich, dass der Mikro-CT-Kontrast der Reissamen nach der Behandlung mit Phosphorwolframsäure und der Trocknung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid signifikant verbessert wird und die Morphologie der Endospermzellen deutlich sichtbar ist.

Versuchsbeispiel 3: Behandlung zum Verbessern des Mikro-CT-Kontrasts für Hirsesamen

Die Hirsesamen werden in die FAA-Fixierungslösung, 10% Cäsiumiodidlösung und 10% Phosphorwolframsäurelösung gegeben, und die Blasen werden durch wiederholtes Umdrehen der Behälter entfernt, bis die Proben in die Lösung einsinken. Schütteln für 8 Stunden lang bei 4°C auf einem Schüttler bei 60 U/min, und dann erfolgt ein Fixieren bei 4°C für 30 Tage; Die Lösung wird inzwischen alle zwei Wochen gewechselt. Nach jedem Wechsel muss die Lösung 8 Stunden lang bei 4°C und 60 U/min auf dem Schüttler geschüttelt werden, dann bei 4°C weiter fixiert; Dann wird die Gradientenethanoldehydratisierung mit 70%, 80%, 90% und 100% wässriger Ethanollösung durchgeführt, und bei jedem Gradient erfolgt jeweils eine Behandlung für 20 Minuten. Die dehydratisierten Proben werden einer Trocknungsbehandlung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid unterzogen.

Die getrockneten Proben werden einem Mikro-CT-Scan unterzogen. Die Abtastspannung jeder behandelten Probe liegt bei 41 kV, die Auflösung beträgt $0,68\ \mu\text{m}$ und die Scan-Schrittgröße beträgt $0,2^\circ$, und 2 Bilder werden in jedem Winkel abgebildet.

Nach dem Scannen der Probe erfolgt ein Rekonstruieren mit der NRecon-Software, um ein Querschnittbild zu erhalten, wie in Fig. 3 gezeigt. Dabei sind von links nach rechts jeweils Querschnitte der Hirsesamen, die mit FAA-Fixierungslösung, 10% Cäsiumiodid, 10% Phosphorwolframsäurelösung behandelt wurden. Durch einen Vergleich ist ersichtlich, dass der Mikro-CT-Kontrast der Hirsesamen nach der Behandlung mit Phosphorwolframsäure und der Trocknung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid signifikant verbessert wird und die Morphologie der Endospermzellen deutlich sichtbar ist. Da die Hirsekerne kleiner sind, ist auch die Färbezeit kürzer.

Versuchsbeispiel 4: Behandlung zum Verbessern des Mikro-CT-Kontrasts für Hafersamen

Die Hafersamen werden in die FAA-Fixierungslösung und 10% Phosphorwolframsäurelösung gegeben, und die Blasen werden durch wiederholtes Umdrehen der Behälter entfernt, bis die Proben in die Lösung einsinken. Schütteln für 8 Stunden lang bei 4°C auf einem Schüttler bei 60 U/min, und dann erfolgt ein Fixieren bei 4°C für 40 Tage; Die Lösung wird inzwischen alle zwei Wochen gewechselt. Nach jedem Wechsel muss die Lösung 8 Stunden lang bei 4°C und 60 U/min auf dem Schüttler geschüttelt werden, dann bei 4°C weiter fixiert; Dann wird die Gradientenethanoldehydratisierung mit 70%, 80%, 90% und 100% wässriger Ethanollösung durchgeführt, und bei jedem Gradient erfolgt jeweils eine Behandlung für 20 Minuten. Die dehydratisierten Proben werden einer Trocknungsbehandlung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid unterzogen.

Die getrockneten Proben werden einem Mikro-CT-Scan unterzogen. Die Abtastspannung der mit der FAA-Fixierungslösung behandelten Probe liegt bei 40 kV und die Abtastspannung der mit der 10% Phosphorwolframsäurelösung behandelten Probe liegt bei 100 kV, die Auflösung beträgt 0,88 µm und die Scan-Schrittgröße beträgt 0,2°, und 2 Bilder werden in jedem Winkel abgebildet.

Nach dem Scannen der Probe erfolgt ein Rekonstruieren mit der NRecon-Software, um ein Querschnittbild zu erhalten, wie in Fig. 4 gezeigt. Dabei sind von links nach rechts jeweils Querschnitte der Hafersamen, die mit FAA-Fixierungslösung und 10% Phosphorwolframsäurelösung behandelt wurden. Durch einen Vergleich ist ersichtlich, dass der Mikro-CT-Kontrast der Hafersamen nach der Behandlung mit Phosphorwolframsäure und der Trocknung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid signifikant verbessert wird und die Morphologie der Endospermzellen deutlich sichtbar ist.

Versuchsbeispiel 5: Behandlung zum Verbessern des Mikro-CT-Kontrasts für Klebreisamen

Die Klebreisamen werden in die FAA-Fixierungslösung und 10%

Phosphorwolframsäurelösung gegeben, und die Blasen werden durch wiederholtes Umdrehen der Behälter entfernt, bis die Proben in die Lösung einsinken. Schütteln für 8 Stunden lang bei 4°C auf einem Schüttler bei 60 U/min, und dann erfolgt ein Fixieren bei 4°C für 40 Tage; Die Lösung wird inzwischen alle zwei Wochen gewechselt. Nach jedem Wechsel muss die Lösung 8 Stunden lang bei 4°C und 60 U/min auf dem Schüttler geschüttelt werden, dann bei 4°C weiter fixiert; Dann wird die Gradientenethanoldehydratisierung mit 70%, 80%, 90% und 100% wässriger Ethanollösung durchgeführt, und bei jedem Gradient erfolgt jeweils eine Behandlung für 20 Minuten. Die dehydratisierten Proben werden einer Trocknungsbehandlung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid unterzogen.

Die getrockneten Proben werden einem Mikro-CT-Scan unterzogen. Die Abtastspannung der mit der FAA-Fixierungslösung behandelten Probe liegt bei 43 kV und die Abtastspannung der mit der 10% Phosphorwolframsäurelösung behandelten Probe liegt bei 100 kV, die Auflösung beträgt 0,88 µm und die Scan-Schrittgröße beträgt 0,2°, und 2 Bilder werden in jedem Winkel abgebildet.

Nach dem Scannen der Probe erfolgt ein Rekonstruieren mit der NRecon-Software, um ein Querschnittbild zu erhalten, wie in Fig. 5 gezeigt. Dabei sind von links nach rechts jeweils Querschnitte der Klebreissamen, die mit FAA-Fixierungslösung und 10% Phosphorwolframsäurelösung behandelt wurden. Durch einen Vergleich ist ersichtlich, dass der Mikro-CT-Kontrast der Klebreissamen nach der Behandlung mit Phosphorwolframsäure und der Trocknung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid signifikant verbessert wird und die Morphologie der Endospermzellen deutlich sichtbar ist.

Versuchsbeispiel 6: Behandlung zum Verbessern des Mikro-CT-Kontrasts für Sorghumsamen

Die Sorghumsamen (mit aufgeschnittenen Samenschalen) werden in die FAA-Fixierungslösung und 10% Phosphorwolframsäurelösung gegeben, und die Blasen werden durch wiederholtes Umdrehen der Behälter entfernt, bis die Proben in die Lösung einsinken. Schütteln für 8 Stunden lang bei 4°C auf einem Schüttler bei 60 U/min, und dann erfolgt ein Fixieren bei 4°C für 60 Tage; Die Lösung wird inzwischen alle zwei Wochen gewechselt. Nach jedem Wechsel muss die Lösung 8 Stunden lang bei 4°C und 60 U/min auf dem Schüttler geschüttelt werden, dann bei 4°C weiter fixiert; Dann wird die Gradientenethanoldehydratisierung mit 70%, 80%, 90% und 100% wässriger Ethanollösung durchgeführt, und bei jedem Gradient erfolgt jeweils eine Behandlung für 20 Minuten. Die dehydratisierten Proben werden einer Trocknungsbehandlung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid unterzogen.

Die getrockneten Proben werden einem Mikro-CT-Scan unterzogen. Die Abtastspannung der mit der FAA-Fixierungslösung behandelten Probe liegt bei 40 kV und die Abtastspannung der mit der 10% Phosphorwolframsäurelösung behandelten Probe liegt bei 100 kV, die Auflösung beträgt 1,15 μm und die Scan-Schrittgröße beträgt 0,2°, und 2 Bilder werden in jedem Winkel abgebildet.

Nach dem Scannen der Probe erfolgt ein Rekonstruieren mit der NRecon-Software, um ein Querschnittbild zu erhalten, wie in Fig. 6 gezeigt. Dabei sind von links nach rechts jeweils Querschnitte der Sorghumsamen, die mit FAA-Fixierungslösung und 10% Phosphorwolframsäurelösung behandelt wurden. Durch einen Vergleich ist ersichtlich, dass der Mikro-CT-Kontrast der Sorghumsamen nach der Behandlung mit Phosphorwolframsäure und der Trocknung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid signifikant verbessert wird und die Morphologie der Stärke- und Endospermzellen deutlich sichtbar ist.

Versuchsbeispiel 7: Behandlung zum Verbessern des Mikro-CT-Kontrasts für rote Reissamen

Die roten Reissamen werden in die FAA-Fixierungslösung und 10% Phosphorwolframsäurelösung gegeben, und die Blasen werden durch wiederholtes Umdrehen der Behälter entfernt, bis die Proben in die Lösung einsinken. Schütteln für 8 Stunden lang bei 4°C auf einem Schüttler bei 60 U/min, und dann erfolgt ein Fixieren bei 4°C für 40 Tage; Die Lösung wird inzwischen alle zwei Wochen gewechselt. Nach jedem Wechsel muss die Lösung 8 Stunden lang bei 4°C und 60 U/min auf dem Schüttler geschüttelt werden, dann bei 4°C weiter fixiert; Dann wird die Gradientenethanoldehydratisierung mit 70%, 80%, 90% und 100% wässriger Ethanollösung durchgeführt, und bei jedem Gradient erfolgt jeweils eine Behandlung für 20 Minuten. Die dehydratisierten Proben werden einer Trocknungsbehandlung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid unterzogen.

Die getrockneten Proben werden einem Mikro-CT-Scan unterzogen. Die Abtastspannung der mit der FAA-Fixierungslösung behandelten Probe liegt bei 40 kV und die Abtastspannung der mit der 10% Phosphorwolframsäurelösung behandelten Probe liegt bei 100 kV, die Auflösung beträgt 0,74 μm und die Scan-Schrittgröße beträgt 0,2°, und 2 Bilder werden in jedem Winkel abgebildet.

Nach dem Scannen der Probe erfolgt ein Rekonstruieren mit der NRecon-Software, um ein Querschnittbild zu erhalten, wie in Fig. 7 gezeigt. Dabei sind von links nach rechts jeweils Querschnitte der roten Reissamen, die mit FAA-Fixierungslösung und 10% Phosphorwolframsäurelösung behandelt wurden. Durch einen Vergleich ist ersichtlich, dass der Mikro-CT-Kontrast der roten Reissamen nach der Behandlung mit Phosphorwolframsäure

und der Trocknung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid signifikant verbessert wird und die Morphologie der Endospermzellen deutlich sichtbar ist.

Versuchsbeispiel 8: Behandlung zum Verbessern des Mikro-CT-Kontrasts für Mungobohnensamen

5 Die Mungobohnensamen werden in die FAA-Fixierungslösung und 10% Phosphorwolframsäurelösung gegeben, und die Blasen werden durch wiederholtes Umdrehen der Behälter entfernt, bis die Proben in die Lösung einsinken. Schütteln für 8 Stunden lang bei 4°C auf einem Schüttler bei 60 U/min, und dann erfolgt ein Fixieren bei 4°C für 60 Tage; Die Lösung wird inzwischen alle zwei Wochen gewechselt. Nach jedem Wechsel muss die Lösung
10 8 Stunden lang bei 4°C und 60 U/min auf dem Schüttler geschüttelt werden, dann bei 4°C weiter fixiert; Dann wird die Gradientenethanoldehydratisierung mit 70%, 80%, 90% und 100% wässriger Ethanollösung durchgeführt, und bei jedem Gradient erfolgt jeweils eine Behandlung für 20 Minuten. Die dehydratisierten Proben werden einer Trocknungsbehandlung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid unterzogen.

15 Die getrockneten Proben werden einem Mikro-CT-Scan unterzogen. Die Abtastspannung der mit der FAA-Fixierungslösung behandelten Probe liegt bei 40 kV und die Abtastspannung der mit der 10% Phosphorwolframsäurelösung behandelten Probe liegt bei 100 kV, die Auflösung beträgt 1,76 µm und 0,5 mm Aluminiumplättchen werden hinzugefügt. Die Scan-Schrittgröße beträgt 0,2°, und 2 Bilder werden in jedem Winkel abgebildet.

20 Nach dem Scannen der Probe erfolgt ein Rekonstruieren mit der NRecon-Software, um ein Querschnittsbild zu erhalten, wie in Fig. 8 gezeigt. Dabei sind von links nach rechts jeweils Querschnitte der Mungobohnensamen, die mit FAA-Fixierungslösung und 10% Phosphorwolframsäurelösung behandelt wurden. Durch einen Vergleich ist ersichtlich, dass der Mikro-CT-Kontrast der Mungobohnensamen nach der Behandlung mit
25 Phosphorwolframsäure und der Trocknung beim kritischen Punkt von Kohlendioxid signifikant verbessert wird. Dabei sind mehr Details ersichtlich, aber der Verbesserungseffekt ist schlechter als der bei Samen mit hohem Stärkegehalt. Dies zeigt, dass das Behandlungsverfahren der vorliegenden Erfindung den Mikro-CT-Kontrast von Samen mit
30 hohem Stärkegehalt signifikant verbessern kann.

Die Erfindung untersuchte auch die Wirkung verschiedener Betriebsbedingungen auf den Mikro-CT-Kontrastverstärkungseffekt von Samen mit hohem Stärkegehalt während des Forschungsprozesses. Die Ergebnisse zeigen, dass ein höherer Mikro-CT-Kontrast unter Verwendung der Betriebsbedingungen der obigen Schritte erhalten werden kann.

Trotz der bisherigen ausführlichen Erläuterung der vorliegenden Erfindung anhand der

allgemeinen Beschreibung und der konkreten Ausführungsmöglichkeiten sind auf der Grundlage der Erfindung Modifikationen oder Weiterbildungen möglich, die für Fachleute auf diesem Gebiet naheliegend sind. Daher gehören solche Modifikationen oder Weiterbildungen, die ohne Abweichung von dem Geist der Erfindung vorgenommen werden, zu dem beanspruchten Schutzzumfang der Erfindung.

ANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Mikro-CT-Scan von Endospermzellen bei Gramineen-Samen mit hohem Stärkegehalt, umfassend die folgenden Schritte:

5 1) Lösen von Phosphorwolframsäure in einer FAA-Fixierlösung, um eine Phosphorwolframsäurelösung zu erhalten;

2) Einweichen der zu prüfenden Samen mit hohem Stärkegehalt in die Phosphorwolframsäurelösung, Durchführen einer Schüttlerbehandlung und danach einer Fixierungs- und Färbebehandlung;

10 3) Dehydratisieren und dann Trocknen der Samen mit hohem Stärkegehalt bei einem kritischen Punkt von Kohlendioxid nach der Fixierungs- und Färbebehandlung in Schritt 2);

4) Mikro-CT-Scan der in Schritt 3) behandelten Samen mit hohem Stärkegehalt;

wobei:

der Stärkegehalt der Samen mit hohem Stärkegehalt mehr als 60% beträgt;

in Schritt 2) die Bedingungen für die Fixierungs- und Färbebehandlung wie folgt sind:

15 die Temperatur beträgt 4°C; die Zeit beträgt 30-60 Tage;

während der Fixierungs- und Färbebehandlung wird die Phosphorwolframsäurelösung gewechselt und einer Schüttlerbehandlung unterzogen, um dann die Fixierungs- und Färbebehandlung fortzusetzen; wobei die Phosphorwolframsäurelösung alle zwei Wochen ausgetauscht wird.

20 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Samen mit hohem Stärkegehalt aus Reissamen, Lila-Reissamen, Hirsesamen, Hafersamen, Klebreissamen, Sorghumsamen oder roten Reissamen ausgewählt werden.

25 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt 1) die Massenkonzentration von Phosphorwolframsäure in der Phosphorwolframsäurelösung 1-10% beträgt;

wobei die Zusammensetzung der FAA-Fixierlösung pro 100 ml wie folgt lautet:

50% wässrige Ethanollösung 90 mL;

Eisessigsäure 5 mL;

Formaldehyd 5 mL.

30 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt 2) die Bedingungen für die Schüttlerbehandlung wie folgt sind:

die Temperatur beträgt 4°C;

die Zeit beträgt 7,5-8,5 h;

die Drehzahl beträgt 40-80 U/min.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt 2) die Zeit der Fixierungs- und Färbebehandlung wie folgt lautet:

wenn die Samen mit hohem Stärkegehalt Reissamen, Lila-Reissamen, Hafersamen, Klebreissamen oder rote Reissamen sind, beträgt die Zeit der Fixierungs- und Färbebehandlung 39-41 Tage;

wenn die Samen mit hohem Stärkegehalt Hirsesamen sind, beträgt die Zeit der Fixierungs- und Färbebehandlung 30-32 Tage;

wenn die Samen mit hohem Stärkegehalt Sorghumsamen sind, beträgt die Zeit der Fixierungs- und Färbebehandlung 58-60 Tage.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt 3) die Dehydratisierungsbehandlung unter Verwendung einer wässrigen Ethanollösung durchgeführt wird;

wobei zur Dehydratisierungsbehandlung eine Gradientendehydratisierung der Reihe nach unter Verwendung einer wässrigen Ethanollösung mit einem Volumenanteil von 70%, 80%, 90% und 100% für jeweils 10-20 Minuten erfolgt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt 4) die Bedingungen für den Mikro-CT-Scan wie folgt sind:

die Auflösung beträgt 0,56-1,15 μm ;

die Abtastspannung beträgt 40-100 kV;

die Scan-Schrittgröße beträgt 0,2°;

2 Bilder werden in jedem Winkel abgebildet.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt 4) die Auflösung und die Abtastspannung des Mikro-CT-Scans wie folgt lauten:

für Reissamen beträgt die Auflösung des Mikro-CT-Scans 0,88 μm und die Abtastspannung beträgt 100 kV;

für Lila-Reissamen beträgt die Auflösung des Mikro-CT-Scans 0,95 μm und die Abtastspannung beträgt 100 kV;

für Hirsesamen beträgt die Auflösung des Mikro-CT-Scans 0,68 μm und die Abtastspannung beträgt 41 kV;

für Hafersamen beträgt die Auflösung des Mikro-CT-Scans 0,88 μm und die Abtastspannung beträgt 100 kV;

für Klebreissamen beträgt die Auflösung des Mikro-CT-Scans 0,88 μm und die Abtastspannung beträgt 100 kV;

für Sorghumsamen beträgt die Auflösung des Mikro-CT-Scans 1,15 μm und die Abtastspannung beträgt 100 kV;

für rote Reissamen beträgt die Auflösung des Mikro-CT-Scans 0,74 μm und die Abtastspannung beträgt 100 kV.

- 5 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass die Samenschalen der Samen mit hohem Stärkegehalt vor der Durchführung des Schritts 1) aufgeschnitten werden.

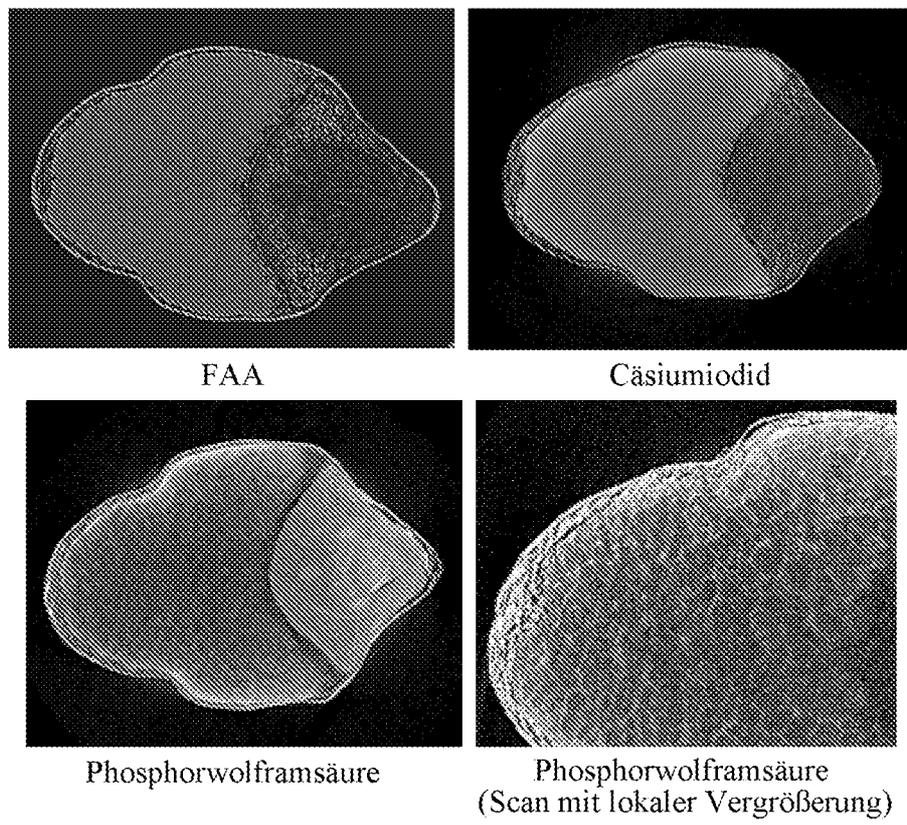


Fig. 1

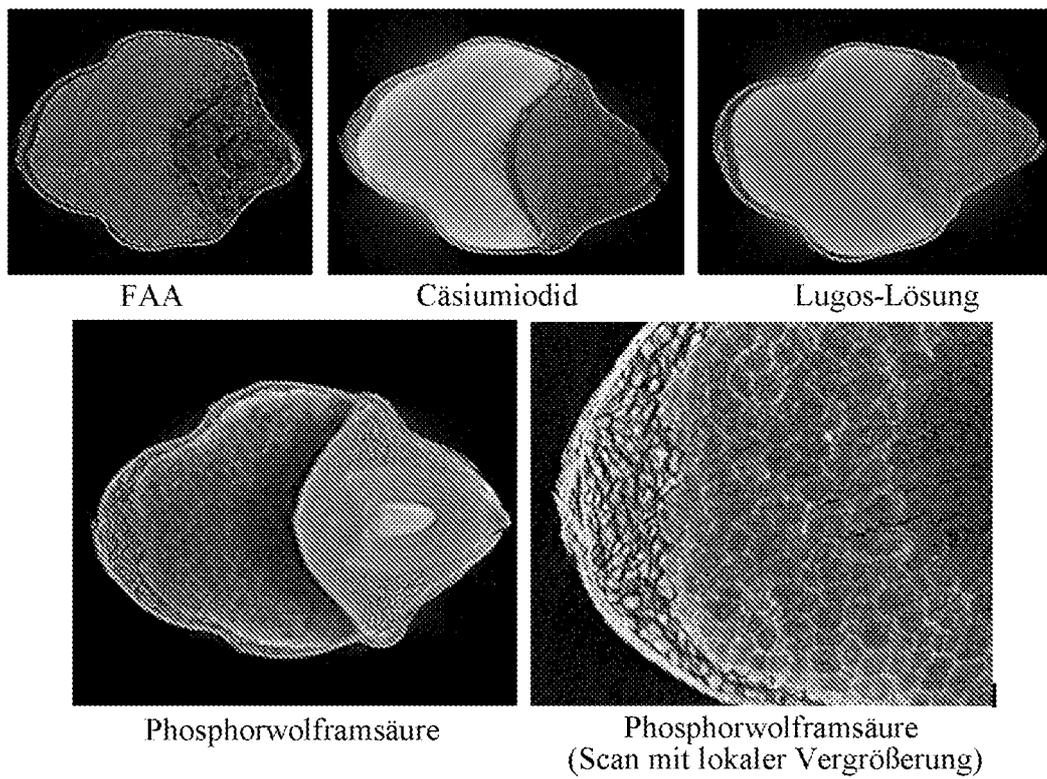
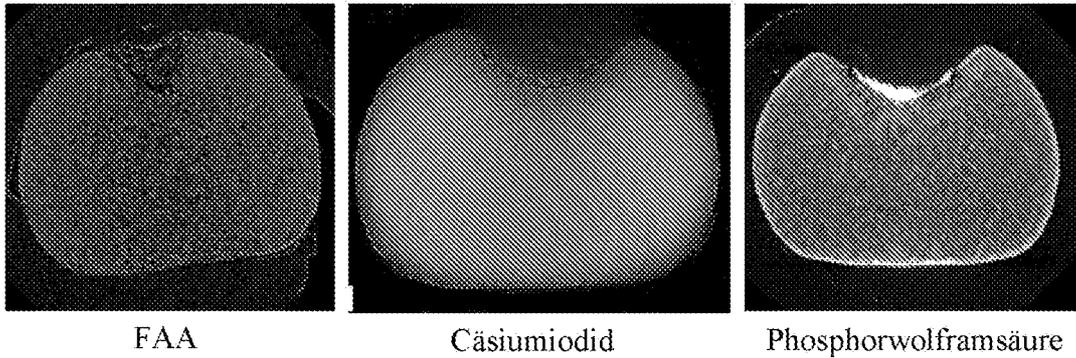


Fig. 2

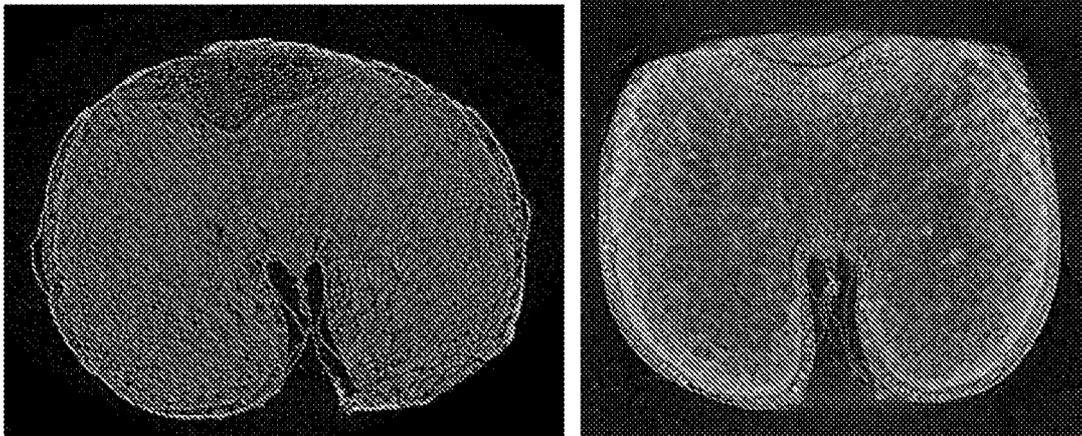


FAA

Cäsiumiodid

Phosphorwolframsäure

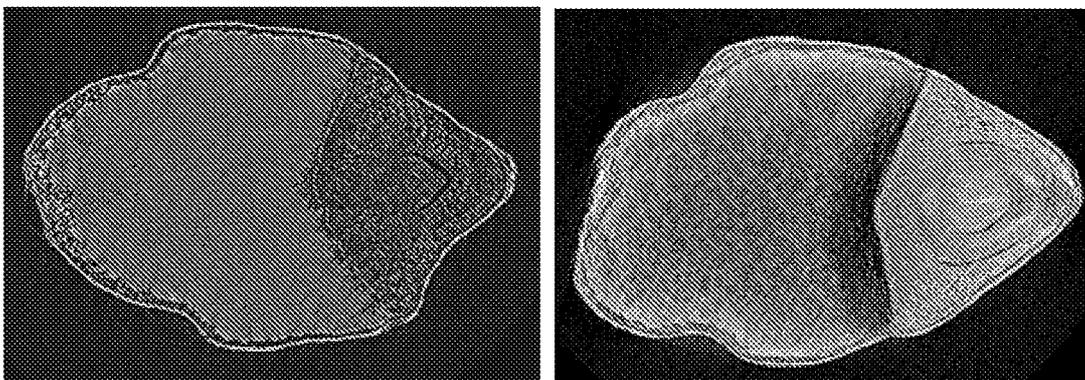
Fig. 3



FAA

Phosphorwolframsäure

Fig. 4



FAA

Phosphorwolframsäure

Fig. 5

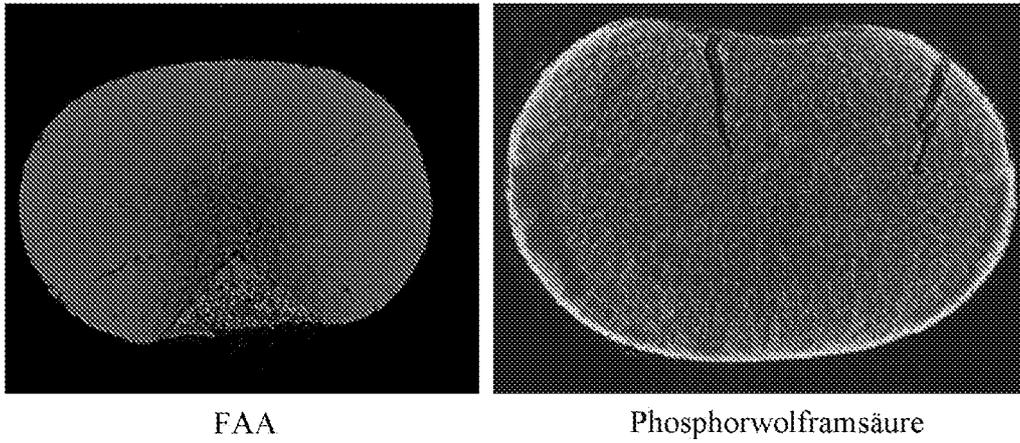


Fig. 6

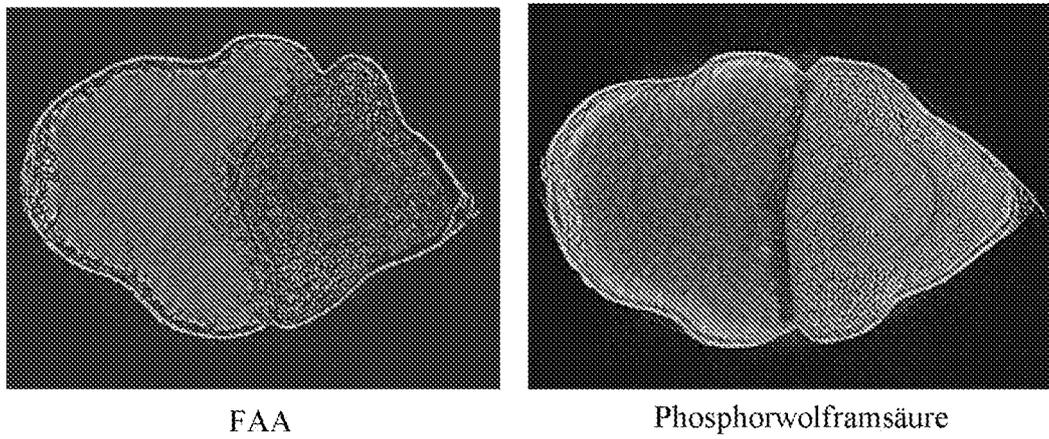


Fig. 7

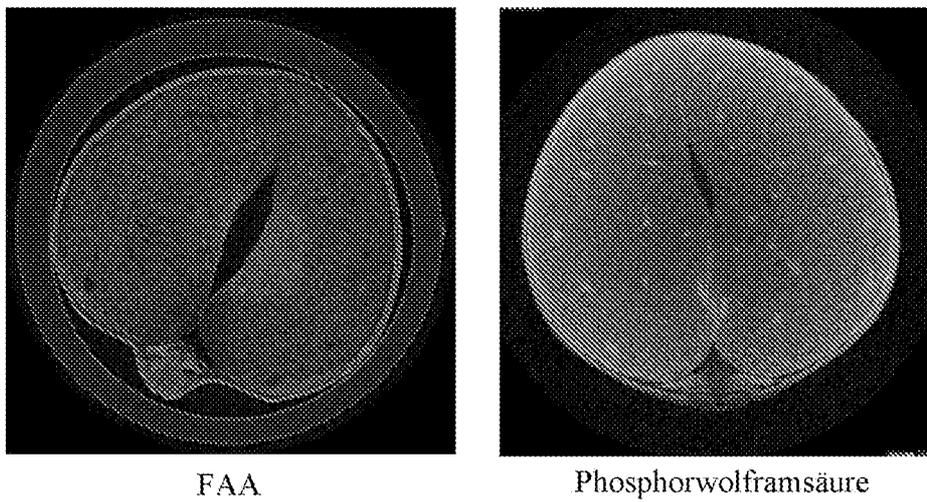


Fig. 8

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

RECHERCHENBERICHT INTERNATIONALER ART NACH ARTIKEL XI.23.,
§10 DES BELGISCHEN WIRTSCHAFTSGESETZBUCHES

KENNZEICHNUNG DER NATIONALEN ANMELDUNG	AKTENZEICHEN DES ANMELDERS ODER ANWALTS
	BPJEEK0001BE00
Nationales Aktenzeichen	Anmeldedatum
202405009	09-01-2024
Anmeldeland	Beanspruchtes Prioritätsdatum
	17-01-2023
Anmelder (Name)	
INSTITUTE OF BOTANY, THE CHINESE ACADEMY OF SCIENCES	
Datum des Antrags auf eine Recherche Internationaler Art	Nummer, die die internationale Recherchenbehörde dem Antrag auf eine Recherche internationaler Art zugeteilt hat
10-02-2024	SN85675
I. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (treffen mehrere Klassifikationssymbole zu, so sind alle anzugeben)	
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder sowohl nach der nationalen Klassifikation als auch nach der IPC	
Siehe Recherchenbericht	
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE	
Recherchierter Mindestprüfstoff	
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole
IPC	Siehe Recherchenbericht
Recherchierte, nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen	
III. <input type="checkbox"/> EINIGE ANSPRÜCHE HABEN SICH ALS NICHT RECHERCHIERBAR ERWIESEN (Bemerkungen auf Ergänzungsbogen)	
IV. <input type="checkbox"/> MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG (Bemerkungen auf Ergänzungsbogen)	

BERICHT ÜBER DIE RECHERCHE INTERNATIONALER ART

Nr. des Antrags auf Recherche

BE 202405009

<p>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G01N23/046 G01N33/00 ADD.</p>		
<p>Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK</p>		
<p>B. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</p>		
<p>Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N</p>		
<p>Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen</p>		
<p>Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal</p>		
<p>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE VERÖFFENTLICHUNGEN</p>		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>CN 111 397 999 A (INST BOTANY CAS) 10. Juli 2020 (2020-07-10) * Zusammenfassung *</p> <p align="center">-----</p>	1-9
A	<p>CN 104 792 804 A (UNIV JIANGSU) 22. Juli 2015 (2015-07-22) * Zusammenfassung *</p> <p align="center">-----</p>	1-9
A	<p>YANNICK M. STAEDLER ET AL: "Plant Tissues in 3D via X-Ray Tomography: Simple Contrasting Methods Allow High Resolution Imaging", PLOS ONE, Bd. 8, Nr. 9, 27. September 2013 (2013-09-27), Seite e75295, XP055749297, DOI: 10.1371/journal.pone.0075295 * das ganze Dokument *</p> <p align="center">-----</p>	1-9
	- / - -	
<p><input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen</p>		
<p><input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie</p>		
<p>° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll, oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p>		
<p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung;; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung;; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
<p>Datum des tatsächlichen Abschlusses der Recherche internationaler Art</p> <p align="center">28. Juni 2024</p>		<p>Absenddatum des Berichts über die Recherche internationaler Art</p>
<p>Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016</p>		<p>Bevollmächtigter Bediensteter</p> <p align="center">Baranski, Jörg</p>

C.(Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE VERÖFFENTLICHUNGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>NOGUEIRA FERNANDA M ET AL: "Heat transfer in the tank-inflorescence of Nidularium innocentii (Bromeliaceae): Experimental and finite element analysis based on X-ray microtomography", MICRON, PERGAMON, OXFORD, GB, Bd. 124, 10. Juli 2019 (2019-07-10), XP085749787, ISSN: 0968-4328, DOI: 10.1016/J.MICRON.2019.102714 [gefunden am 2019-07-10] * Seite 3, linke Spalte, Absatz 4 - rechte Spalte, Absatz 3 *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-9
A,D	<p>CN 111 398 000 A (INST BOTANY CAS) 10. Juli 2020 (2020-07-10) in der Anmeldung erwähnt * Zusammenfassung *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-9

BERICHT ÜBER DIE RECHERCHE INTERNATIONALER ART

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Nr. des Antrags auf Recherche

BE 202405009

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
CN 111397999	A	10-07-2020	KEINE

CN 104792804	A	22-07-2015	KEINE

CN 111398000	A	10-07-2020	KEINE



SCHRIFTLICHER BESCHEID

Dossier Nr. SN85675	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 09.01.2024	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 17.01.2023	Anmeldung Nr. BE202405009
Internationale Patentklassifikation (IPK) INV. G01N23/046 G01N33/00			
Anmelder INSTITUTE OF BOTANY, THE CHINESE ACADEMY OF SCIENCES			

Dieser Bescheid enthält Angaben und entsprechende Seiten zu folgenden Punkten:

- Feld Nr. I Grundlage des Bescheids
- Feld Nr. II Priorität
- Feld Nr. III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- Feld Nr. IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- Feld Nr. V Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- Feld Nr. VI Bestimmte angeführte Unterlagen
- Feld Nr. VII Bestimmte Mängel der Anmeldung
- Feld Nr. VIII Bestimmte Bemerkungen zur Anmeldung

Formblatt BE237A (Deckblatt) (Juli 2022)	Prüfer Baranski, Jörg
--	--------------------------

SCHRIFTLICHER BESCHEID

Feld Nr. I Grundlage des Bescheids

1. Dieser Bescheid wurde auf der Grundlage des vor dem Beginn der Recherche eingereichten Satzes von Ansprüchen erstellt.
2. Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz**, die in der Anmeldung offenbart wurde, ist dieser Bescheid auf der Grundlage eines Sequenzprotokolls erstellt worden, das
 - a. im Anmeldezeitpunkt Bestandteil der Anmeldung war.
 - b. nach dem Anmeldedatum für die Zwecke der Recherche eingereicht wurde
 - begleitet von einer Erklärung, wonach das Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht.
3. Hinsichtlich der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz, die in der Anmeldung offenbart wurde, ist dieser Bescheid insoweit erstellt worden, dass ein sinnvolles Gutachten ohne ein dem WIPO-Standard ST.26 entsprechendes Sequenzprotokoll erstellt werden konnte.
4. Zusätzliche Bemerkungen:

Feld Nr. V Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit	Ja: Ansprüche 1-9 Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit	Ja: Ansprüche 1-9 Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit	Ja: Ansprüche: 1-9 Nein: Ansprüche:

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

Zu Punkt V

- 1 Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:
- D1 CN 111 397 999 A (INST BOTANY CAS) 10. Juli 2020 (2020-07-10)
- D2 CN 104 792 804 A (UNIV JIANGSU) 22. Juli 2015 (2015-07-22)
- D3 YANNICK M. STAEDLER ET AL: "Plant Tissues in 3D via X-Ray Tomography: Simple Contrasting Methods Allow High Resolution Imaging",
PLOS ONE,
Bd. 8, Nr. 9, 27. September 2013 (2013-09-27), Seite e75295, XP055749297,
DOI: 10.1371/journal.pone.0075295
- D4 NOGUEIRA FERNANDA M ET AL: "Heat transfer in the tank-inflorescence of *Nidularium innocentii* (Bromeliaceae): Experimental and finite element analysis based on X-ray microtomography",
MICRON, PERGAMON, OXFORD, GB,
Bd. 124, 10. Juli 2019 (2019-07-10), XP085749787,
ISSN: 0968-4328, DOI: 10.1016/J.MICRON.2019.102714
[gefunden am 2019-07-10]
- D5 CN 111 398 000 A (INST BOTANY CAS) 10. Juli 2020 (2020-07-10) in der Anmeldung erwähnt
- 2 D5 wird als nächstliegender Stand der Technik gegenüber dem Gegenstand des Anspruchs 1 angesehen. Es offenbart ein Verfahren zum Mikro-CT-Scan von Mungbohnen-Samen, umfassend die folgenden Schritte:
- 1) Lösen von Phosphorwolframsäure in einer FAA-Fixierungslösung, um eine Phosphorwolframsäurelösung zu erhalten;
 - 2) Einweichen der zu prüfenden Samen in die Phosphorwolframsäurelösung, Durchführen einer Schüttlerbehandlung
 - 3) Dehydratisieren und dann Trocknen der Samen bei einem kritischen Punkt von Kohlendioxid nach der Fixierungs- und Färbbehandlung in Schritt 2);
 - 4) Mikro-CT-Scan der in Schritt 3) behandelten Samen;
- wobei in Schritt 2) die Bedingungen für die Fixierungs- und Färbbehandlung wie folgt sind: die Temperatur beträgt 4°C, die Zeit beträgt 8 Tage.

Der Gegenstand des Anspruchs 1 unterscheidet sich somit von dem bekannten Verfahren dadurch, dass es ein Verfahren zum Mikro-CT-Scan von Endospermzellen bei Gramineen-Samen mit hohem Stärkegehalt beinhaltet wobei der Stärkegehalt der Samen mit hohem Stärkegehalt mehr als 60% beträgt; und
in Schritt 2) die Bedingungen für die Fixierungs- und Färbebehandlung wie folgt sind:
die Temperatur beträgt 4°C; die Zeit beträgt 30-60 Tage;
während der Fixierungs- und Färbebehandlung wird die Phosphorwolframsäurelösung gewechselt und einer Schüttlerbehandlung unterzogen, um dann die Fixierungs- und Färbebehandlung fortzusetzen; wobei die Phosphorwolframsäurelösung alle zwei Wochen ausgetauscht wird, und ist daher neu.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann darin gesehen werden, die Qualität des Mikro-CT- Scans von Gramineen-Samen mit hohem Stärkegehalt zu verbessern

Keine Kombination von Dokumenten im Stand der Technik würde die Kombination der Merkmale im Anspruch 1 nahelegen.

Die in Anspruch 1 der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung wird im Stand der Technik weder offenbart noch vorgeschlagen beruht entsprechend auf einer erfinderischen Tätigkeit.

- 3 Die Ansprüche 2- 9 sind vom Anspruch 1 abhängig und erfüllen damit ebenfalls die Erfordernisse in Bezug auf Neuheit und erfinderische Tätigkeit.