

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.

Abogado
Luz Clemencia de Páez
cavellier@cavellier.com

ASUNTO

Radicación 09-106063
Trámite 011
Evento 378
Actuación 519
Oficio
Folios 009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-106063- -00005-0000

Fecha: 2012-09-26 09:47:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 519 TRASLADOINFORME Folios: 9

EE-17287

Patente de Invención ☒

Patente de Modelo de Utilidad ☐

Vía Nacional ☐

Vía PCT (fase nacional) ☒

Cap. I ☒

Cap. II ☐

No. Sel. Internacional
Pub. Internacional

PCT/JP2007/050746
WO 2008/120820

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

<u>Descripción:</u>	Folios: 60 a 104	28/09/2009
<u>Reivindicaciones:</u>	Folios: 105 a 109	28/09/2009
<u>Figuras:</u>	Folios: 111 a 113	28/09/2009
<u>Secuencias:</u>	Folios: 114 a 122	28/09/2009
<u>Prioridad:</u>	JP 2007-089259	29/03/2007
	JP 2007-202291	02/08/2007

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de Prioridad porque esta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de las prioridades reivindicadas.

3. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Método para producir una planta quimérica con una capa superficial transgénica".

El objeto de la presente solicitud es suministrar un método para producir una planta transgénica quimérica la cual tiene un gen introducido en parte de sus células.

Expediente 09-106063 1er Art.45

El problema planteado en esta solicitud es la necesidad de obtener plantas genéticamente modificadas que expresen el gen heterólogo específicamente en una capa de las células, de manera que se obtenga una planta quimérica periclinal.

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio suministra una planta floricultural que contiene un gen extraño únicamente en una capa de sus células pero que no está presente en las células de polen o células ovulares y específicamente en la capa L2.

El objeto de la solicitud definida anteriormente se clasificó en la IPC: A01H 1/00, 5/00; C12N 15/09.

4. Excepción a la patentabilidad (Artículo 20 D486 literal c)

El objeto de las reivindicaciones 1 a 28 es una planta floricultural o un producto vegetativo de ésta, sin embargo de acuerdo con el artículo 20 literal c), las plantas no se consideran patentables.

5. De la solicitud de Patente

Descripción (artículo 28 D486)

La descripción no presenta información suficiente para reproducir la invención en aspectos como:

- Elementos promotores empleados para obtener la expresión en la capa L1
- Aunque se ejemplifica la obtención de plantas transgénicas que expresan dos tipos de pigmentos (antocianina acil transferasa, flavonoide 3'5' hidroxilasa) que no son heredados en la siguiente generación de plantas, no es claro como se logra dicha transformación específica en los tejidos de la capa L1 y que no se expresan en la capa L2 (células germinales).

De esta manera la descripción incumple los artículos 28 de la D486 y 1 del Decreto 729 de 2012.

Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

El capítulo reivindicatorio presentado carece de concisión por cuanto:

- 1) El término planta floricultural no es claro.
- 2) Los métodos reclamados en las reivindicaciones 29 y 30 son caracterizados a partir del resultado a alcanzar con los mismos. Cada método debe ser definido a partir de sus etapas e indicar los elementos involucrados en cada una de ellas. Por ejemplo, se debe definir el gen y promotor empleado, el gen de selección, el método de transformación, el vector empleado, material de partida para la transformación, el momento de transformación dentro del desarrollo de la planta, etc. Todo lo anterior teniendo en cuenta la materia realmente sustentada en la descripción.

De esta manera, el capítulo reivindicatorio presentado no cumple con los requisitos establecidos en el art. 30 de la Decisión 486.

6. Determinación del Estado de la Técnica

Teniendo en cuenta la fecha indicada se realizó búsqueda en el estado de la técnica de documentos relacionados con la solicitud, encontrándose los siguientes documentos relevantes a la misma:

Nº	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	WO 2004/020637	"Flavanoid 3", 5"-Hydroxylase gene sequences and uses therefor"	11/03/2004
D2	WO 2005/017147	"Process for producing rose with modified color"	24/02/2005
D3	T. Schmillling, J. Schell. Plant Molecular Biology 21: 705-708.	"Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras"	1993

Resumen de los documentos citados:

D1: La invención divulga secuencias genéticas que codifican un polipéptido teniendo actividad flavonoide 3", 5"-hidroxilasa (F3"5"H) y el uso de la secuencia genética y su correspondiente polipéptido para manipular el color en las flores o partes de estas o en otros tejidos de la planta (resumen).

<http://patentscope.wipo.int/search/en/search.jsf> ingresar WO2004020637

D2: Divulga un proceso para producir una rosa, caracterizado en que la ruta metabólica intrínseca de la rosa es artificialmente suprimida y que el gen codificante del flavonoide 3'5'-hidroxilasa derivado del pensamiento es expresado (resumen).

<http://patentscope.wipo.int/search/en/search.jsf> ingresar WO2005/017147

D3: Se obtienen quimeras de plantas transgénicas de tabaco que expresan el gen *rolC* y que son regeneradas de disco de hoja. La expresión del gen *rolC* de *Agrobacterium rhizogenes* causa una reducción en contenidos de pigmento en diferentes capas de la hoja (resumen, folio 175).

7. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

Novedad (artículo 16 D486)

La reivindicación 29 reclama un método para producir la planta floricultural de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, que comprende una etapa de introducción de un gen extraño dentro de una planta mediado por *Agrobacterium* y la selección de una planta en la cual el gen extraño únicamente esta presente en una parte de sus células.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1
Método para producir la planta floricultural	Método para producir plantas de floración transgénicas (Pág. 10 líneas 9-11)
Introducción de un gen extraño dentro de una planta mediado por <i>Agrobacterium</i>	Introducción de un gen de F3'5'H en la planta (Pág 8-10, reivindicaciones, ejemplos) usando <i>Agrobacterium</i> (ejemplo 1)
Selección de una planta en la cual el gen extraño únicamente esta presente en una parte de sus células	El gen se puede expresar únicamente en partes de la planta tales como flores, tallos, hojas (Pág. 9 líneas 8-10).

El documento D1 divulga las secuencias nucleótidas y polinucleótidas del gen flavonoide 3'5' hidroxilasa, el cual codifica un pigmento tipo antocianina que produce coloración violeta o azul en las flores (resumen). El documento D1 divulga el método de transformación de plantas para producir flores con coloración producida por F3'5'H (Pág.10 líneas 9-11). Este método utiliza la transformación de las plantas con este gen F3'5'H usando *Agrobacterium*

(ejemplo 1; Pág. 8-10) y se divulga el uso de diversos promotores para lograr la expresión específica del gen en determinados tejidos de la planta (Pág. 13 líneas 8-10; tabla 4; ejemplo 6). Se divulga igualmente que la expresión se puede dirigir a determinados tejidos de la planta (Pág. 9 líneas 8-10).

De esta manera el documento D1 contiene todas las características esenciales del método reclamado en la reivindicación 29 por lo que afecta la novedad de este.

El documento D2 por su parte, también divulga la transformación de una planta floricultural, como es la rosa, transformándola con la inserción del gen F3'5'H derivado del pensamiento y usando *Agrobacterium* para la transformación. Este gen se expresa únicamente en la flor de la planta (resumen). El vector empleado para la transformación es el mismo empleado en la presente solicitud (Fig. 4).

De esta manera el documento D2 contiene todas las características esenciales del método reclamado en la reivindicación 29 por lo que afecta la novedad de este.

Nivel inventivo (Artículo 18 D486)

La reivindicación 30 reclama un método para prevenir la dispersión al mundo natural de un gen introducido mediante la producción de una planta floricultural que no tiene un gen extraño en sus células germinales de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 27.

Características esenciales	D1	D3
Método para prevenir la dispersión al mundo natural de un gen introducido	Método para producir plantas de floración transgénicas (Pág. 10 líneas 9-11)	Método para producir plantas tipo quimera periclinal (resumen)
Producción de una planta floricultural que no tiene un gen extraño en sus células germinales	Introducción de un gen de F3'5'H en la planta (Pág 8-10, reivindicaciones, ejemplos) usando <i>Agrobacterium</i> (ejemplo 1). El gen se puede expresar únicamente en partes de la planta tales como flores, tallos, hojas (Pág. 9 líneas 8-10).	Producción de plantas de tabaco que expresan el transgen <i>ro/C</i> en las capas L1 y L3 pero no en las L2 y sus semillas carecen del transgen (Pág.707)

El documento D3 divulga la actividad del gen *ro/C* que hace parte del T-DNA de *Agrobacterium rhizogenes* y el cual es responsable del cambio en la pigmentación de los bordes de las hojas en plantas de tabaco. Este gen se expresa en las hojas pero no en las semillas de las plantas, por lo que la descendencia carece del gen transfectado (Pág. 707).

La diferencia entre la materia reclamada y D3 es que la solicitud realiza la transformación en planta floricultural mientras que D3 la realiza en plantas de tabaco, que si bien es una planta angiosperma que produce flores no se considera una planta de interés en floricultura. Adicionalmente, aunque dicha información no es definida en la reivindicación, se entendería de la descripción que el gen introducido es diferente pues en la solicitud se utiliza F3'5'H y antocianina acyl-transferasa, mientras que en D3 se utiliza *ro/C*.

El efecto que produce esta diferencia es que las plantas de flores transgénicas tienen una variación en el color de sus flores.

El problema técnico objetivo a resolver por la solicitud es realizar la transformación de plantas usando la técnica del T-DNA de *Agrobacterium* introduciendo un gen que codifica pigmento en la planta floricultural.

Sin embargo, el uso de estos genes había sido divulgado en el documento D3, el cual divulga las secuencias nucleótidas y polinucleótidas del gen flavonoide 3'5'hidroxilasa, el

cual codifica un pigmento tipo antocianina que produce coloración violeta o azul en las flores (resumen). El documento D1 divulga el método de transformación de plantas para producir flores con coloración producida por F3'5'H (Pág.10 líneas 9-11). Este método utiliza la transformación de las plantas con este gen F3'5'H usando Agrobacterium (ejemplo 1; Pág. 8-10) y se divulga el uso de diversos promotores para lograr la expresión específica del gen en determinados tejidos de la planta (Pág. 13 líneas 8-10; tabla 4; ejemplo 6). Se divulga igualmente que la expresión se puede dirigir a determinados tejidos de la planta (Pág. 9 líneas 8-10).

Igualmente, a partir del documento D2 el cual divulga el método de transformación de la rosa con el mismo plásmido y gen usado en la presente solicitud (resumen; fig. 4), era posible que la persona del oficio normalmente versada en la materia obtuviera el desarrollo reclamado en la reivindicación 30.

De esta manera a partir de la divulgación D1 y D3 ó del documento D2 se podía llegar a la invención reclamada en la reivindicación 30 con expectativa de éxito de tener lograr el método de transformación.

8. Conclusión

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	WO 2004/020637	29 30	Novedad Nivel inventivo
D2	WO 2005/017147	29 30	Novedad Nivel inventivo
D3	T. Schmillig, J. Schell. Plant Molecular Biology 21: 705-708.	30	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de 60 días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante para dar respuesta a este requerimiento y presentarla por escrito

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


JOSE LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 02 OCT. 2012

Elaboró: N! Lamprea *NLB*
Revisó: Consuelo Leguizamón L. *CL*
Aprobó: Jose Luis Salazar

Update section

Short communication

Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras

T. Schmülling¹ and Jeff Schell²

¹ Universität Tübingen, Lehrstuhl für Allgemeine Genetik, Auf der Morgenstelle 28, D-7400 Tübingen, Germany; ² Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Carl-von-Linné-Weg 10, D-5000 Köln 30, Germany

Received 29 July 1992; accepted in revised form 3 November 1992

Key words: chimera, transgenic plant, *Agrobacterium rhizogenes*, *rolC* gene

Abstract

Amongst *rolC* transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks 6.5% are periclinal chimeras, i.e. plants with genetically different cell populations in different cell layers. The expression of the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* causes a reduction in pigment content in leaves. The chimeric composition of the regenerated plants becomes thus apparent as light green leaf tissue in the transgenic region, tissue flanked by dark green wild-type sectors. Southern and northern blot analysis confirmed the chimeric nature of such plants. Investigation of selfed progeny of chimeric plants on selective media indicates that layer invasion in reproductive tissues can occur in tobacco early during the formation of the flower buds. The results show (1) that tobacco plants regenerated from leaf disks and grown on selective media have not necessarily the same clonal origin and (2) that they can give rise to non-transgenic offspring. The chimeric plants provide insight on the effect of *rolC* gene expression on microsporogenesis.

The expression in transgenic tobacco of the *rolC* gene of the T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* causes a reduction of pigment content in leaf mesophyll cells [10]. This activity of the *rolC* gene product appears to be restricted to the cells that harbor an active *rolC* gene [12]. Therefore expression of the *rolC* gene provides a cell-specific marker in leaves of transgenic plants. In the course of experiments aimed at investigating the inhibitory effect of the *rolC* gene product on microsporogenesis, we have regenerated plants expressing the gene under the control of the *rbcS* 1 promoter of potato (referred to as *P_{rbcS}-rolC*

gene), which is transcribed preferentially in green tissues [11]. The T-DNA vector also carries a chimeric *nptII* gene, linked to the *P_{rbcS}-rolC* gene. For plant transformation and regeneration we used a modified protocol of Horsch *et al.* and Firoozabady [3, 4]. For shoot induction leaf disks of tobacco SR1 plants [6] were transferred after one week of growth on MS medium [7] containing 0.5 mg/l BAP (6-benzylaminopurine) and 0.1 mg/ml NAA (α -naphthaleneacetic acid) for one week to medium containing 7.5 mg/l 2iP (*N*-(2-isopentenyl)adenine) and 0.01 mg/ml *p*-chlorophenoxyacetic acid.

Among 22 independent $P_{rbcS-rolC}$ transgenic plants regenerated and rooted on medium containing 100 mg/l kanamycin, we obtained two independently transformed plants characterized by a light green central leaf blade surrounded by dark green margins (clones *rbcS-C XIII* and *rbcS-C XVII*; see Fig. 1). This phenotype is explained by a chimeric composition of the leaf tissue. In angiosperms, the cells of the shoot apical meristems are organized into layers. In plants with three layers, the outer or L1 layer of meristematic cells contributes mainly to leaf epidermis, whereas the inner L2 and L3 layers give rise to the mesophyll, cortical and vascular tissue (for reviews see [5, 8]). It is in fact known [14] that in tobacco the L2 layer contributes to all mesophyll tissue present at the leaf margin (see the section on Fig. 1B). The chimeric phenotype of the two abnormal plants should be due to an L2 layer originated from untransformed cells. In order to check the chimeric state of the transgenic plants, South-

ern blots with genomic DNA from light and dark green parts of leaves of clones *rbcS-C XIII* and *rbcS-C XVII* were hybridized with a *rolC*-specific probe. Hybridizations were carried out as described [11]. The fragment of 1.55 kb corresponding to an intact $P_{rbcS-rolC}$ gene is detected in light green leaf parts only (lanes 1 and 3 of Fig. 2A). Furthermore, digestion with *Eco* RI which cuts only once in the transferred DNA, reveals that clone *rbcS-C XVII* harbors a single T-DNA insert (lane 2, Fig. 2A) but not from dark green leaf tissue. Similarly, in northern blot analysis a single *rolC* transcript of ca. 850 bp is detected with poly(A)⁺ RNA from light green leaf tissues (Fig. 2B). These results demonstrate that plants *rbcS-C XIII* and *rbcS-C XVII* are periclinal chimeras (i.e. layer chimeras), where the untransformed L2 layer generates the leaf subepidermal layer and extends to the mesophyll at the margin of leaves. The L3 layer, forming the bulk of the light green core tissue of the leaves, stems from a

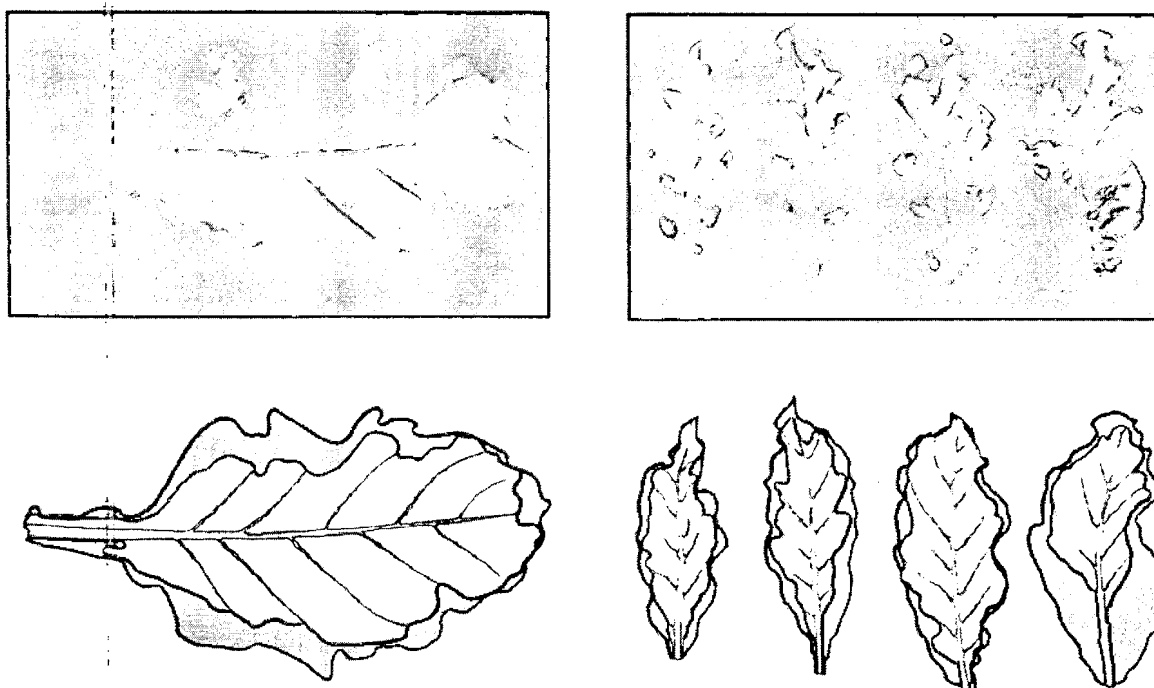


Fig. 1. Photographs and drawings of chimeric leaves. A (left). Leaf of the primary shoot of clone *rbcS-C XIII*. The darker tissue is derived from the non-transformed L2 layer. B (right). Leaves of a side shoot of clone *rbcS-C XVII*. The non-transformed darker green L2 layer derived area covers variable parts of the leaves.

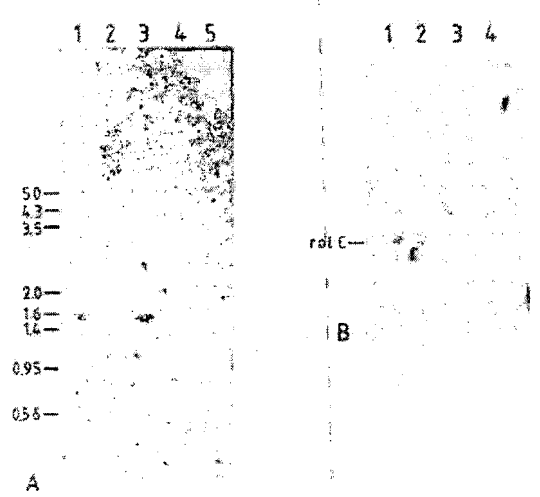


Fig. 2. A. Southern blot analysis of the chimeric clones rbcS-C XIII and rbcS-C XVII. Lane 1, light green part of leaves, clone rbcS-C XVII; lane 2, light green part of leaves, clone rbcS-C XVII; lane 3, light green part of leaves, clone rbcS-C XIII; lanes 4 and 5, dark green part of leaves, clones rbcS-C XVII and rbcS-C XIII, respectively. All restrictions were with *Eco* RI and *Hind* III, with the exception of lane 2, where only *Eco* RI was used. B. Northern blot analysis of leaves. Lane 1, clone rbcS-C XVII, light green part; lane 2, clone rbcS-C XIII, light green part; lane 3, clone rbcS-C XVII, dark green part; lane 4, rbcS-C XIII, dark green part. Approximately 2 μ g poly(A)⁺ RNA were loaded in each lane. Blots were hybridized with a ³²P-labelled *rolC*-specific probe.

transformed cell line, harboring and expressing the *P_{rbcS}-rolC* chimeric gene. Because epidermal cells do not contain chlorophyll and the L1 layer therefore does not contribute to the color of leaves, the phenotype of the leaves does not allow any conclusion about whether or not the L1 layer was derived from a *rolC* transgenic cell. Interestingly, chimeric leaves of the primary shoot of clone rbcS-C XIII were more round-shaped than lanceolate leaves of non chimeric *P_{rbcS}-rolC* transgenics (Fig. 1). This suggests a role for the non-transgenic L2 layer in determining the leaf shape of the chimeric plants.

In tobacco, the L2 layer also gives rise to male and female gametes [13]. Cells of the L3 layer however can invade the L2 layer leading to offspring with the genetic composition of L3 cells [2]. To test whether the kanamycin resistance marker gene cotransferred by the T-DNA, and

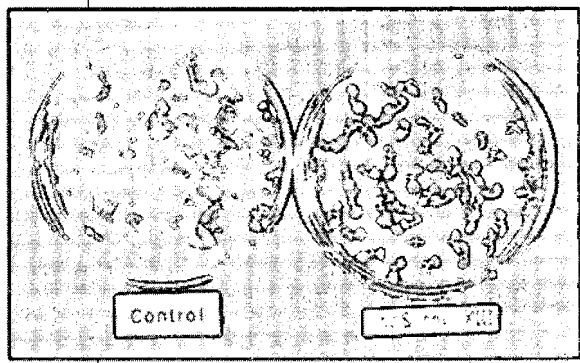


Fig. 3. Analysis of selfed progeny from transformed non-chimeric control plant (clone rbcS-C IV, left) and chimeric plant rbcS-C XIII (right) on medium containing 100 mg/l kanamycin. Selfed progeny of the chimeric plant does not give rise to kanamycin resistant progeny as the untransformed L2 layer forms the reproductive tissues.

therefore present in the L3 but not in the L2 layer, was transmitted to offspring, selfed progenies of the two clones were tested for kanamycin resistance (Fig. 3). In clone rbcS-C XIII, none of 92 tested seed capsules contained kanamycin-resistant seeds. In contrast, in clone rbcS-C XVII, seeds of three out of 50 tested seed capsules gave rise to kanamycin resistant plantlets. In seeds of two of these seed capsules kanamycin resistance segregated with a 1:1 ratio, in seeds of the other seed capsule a 3:1 segregation was obtained (data not shown). As clone rbcS-C XVII harbors one T-DNA only (Fig. 2A), this suggests that cell invasion of transgenic L3 cells into the untransformed L2 layer can have occurred. The finding of kanamycin-resistant offspring concentrated in three seed capsules only and their segregation ratios, indicates that layer invasion can occur in tobacco very early during the formation of the flowering bud. Kanamycin-resistant progeny had a uniform phenotype typical of rbcS-C transgenic plants.

In a similar experiment, 54 transgenic tobacco plants were produced that harbor the *rolC* gene under the transcriptional control of the 35S RNA promoter. From these, three plants were periclinal chimeras, phenotypically similar to those described above. However, all flowers of these plants were male sterile as is typical for *P_{35S}-rolC*

transgenic tobacco plants [10]. This observation implicates that the effects of the *rolC* gene product in anther tissues is not limited to transformed cells since reproductive tissues are in fact derived from the non-transgenic L2 cells, as indicated by the kanamycin sensitivity of the progeny. This is in contrast to the cell-specific influence of the *rolC* gene product in the reduction of leaf pigment content [12] and in root induction [9]. This has important implications when one aims to use the *rolC* gene to confer dominant male sterility in hybrid seed production. We have recently presented evidence that *rolC* induced male sterility in transgenic tobacco plants can be restored by antisense RNA [11]. However, seed setting is also reduced in P_{35S} -*rolC* transgenic plants and was only partially restored by antisense *rolC* expression. Targeted *rolC* gene expression requires knowledge about the precise cellular and molecular mechanism(s) that inhibit microsporogenesis since our results demonstrate that *rolC* gene activity in non germ line cells can inhibit microsporogenesis.

To our knowledge this is the first report on periclinal chimeric transgenic plants. Taken together, the results show that shoot organogenesis from tobacco leaf explants, which is preceded by the formation of undifferentiated tissue [1], does not necessarily lead to plants derived from a single cell. Furthermore these results implicate that the activity of the *rolC* gene product on microsporogenesis is not cell-specific.

Acknowledgements

We thank R. Walden and Professor F. Salamini for critical reading of the manuscript, S. Pilz for technical assistance, D. Bock for photographic work, and F. Furkert for drawings. T.S. is grate-

ful to H. Röhrig for advice and help with hybridizations.

References

1. Attfield EM, Evans PK: Developmental pattern of root and shoot organogenesis in altered leaf explants of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. *J Exp Bot* 42: 51–57 (1991).
2. Dawe RK, Freeling M: Clonal analysis of the cell lineages in the male flower of maize. *Devel Biol* 142: 233–245 (1990).
3. Firoozabady E: Rapid plant regeneration from *Nicotiana mesophyll* protoplasts. *Plant Science* 46: 127–131 (1986).
4. Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SD, Fraley RT: A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229–1231 (1985).
5. Irish VF: Cell lineage in plant development. *Curr Opin Genet Devel* 1: 169–173 (1991).
6. Maliga P, Sz.-Breznovitis A, Marton L: Streptomycin-resistant plants from callus culture from haploid tobacco. *Nature* 347: 737–741 (1973).
7. Murashige T, Skoog F: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473–496 (1962).
8. Poethig S: Genetic mosaics and cell lineage analysis in plants. *Trends Genet* 5: 273–277 (1989).
9. Schmülling T: Studien zum Einfluß der *rolA*, *B* und *C* Gene der TL-DNA von *Agrobacterium rhizogenes* auf die Pflanzenentwicklung. Dissertation, Universität zu Köln (1988).
10. Schmülling T, Schell J, Spena A: Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO J* 7: 2621–2629 (1988).
11. Schmülling T, Röhrig H, Pilz S, Walden R, Schell J: Restoration of fertility by antisense RNA in genetically engineered male sterile tobacco plants. *Mol Gen Genet*, in press.
12. Spena A, Aalen RB, Schulze S: Cell-autonomous behavior of the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* during leaf development: Visual assay for transposon excision in transgenic plants. *Plant Cell* 1: 1157–1164 (1989).
13. Stewart RN: Ontogeny of the primary body in chimeral forms of higher plants. In: Subtelny S, Sussex IM (eds) *The clonal basis of development*. Academic Press, New York, 131–160 (1978).
14. Tilney-Bassett RAE: *Plant chimeras*. Arnold, London (1986).