

404817

89年4月8日修正
補充

公告本

申請日期	86.06.11
案 號	86108056
類 別	A01H 1/02

A4
C4

(89年4月修正頁)

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	獲得細胞質雄性不育卷心菜(BRASSICA OLERACEA) 植物之方法
	英 文	"METHOD FOR OBTAINING CYTOPLASMIC MALE STERILE BRASSICA OLERACEA PLANT"
二、發明 人	姓 名	彼德 巴登
	國 籍	荷蘭
	住、居所	荷蘭諾德夏伍迪市法蘭史彼德街10號
三、申請人	姓 名 (名稱)	荷蘭商貝喬雷登公司
	國 籍	荷蘭
	住、居所 (事務所)	荷蘭華門休南市全邦區1號
	代 表 人 姓 名	傑拉德斯 柯尼里斯

404817

裝

訂

線

404817

89年4月8日修正
補充

公告本

申請日期	86.06.11
案 號	86108056
類 別	A01H 1/02

A4
C4

(89年4月修正頁)

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	獲得細胞質雄性不育卷心菜(BRASSICA OLERACEA) 植物之方法
	英 文	"METHOD FOR OBTAINING CYTOPLASMIC MALE STERILE BRASSICA OLERACEA PLANT"
二、發明 人	姓 名	彼德 巴登
	國 籍	荷蘭
	住、居所	荷蘭諾德夏伍迪市法蘭史彼德街10號
三、申請人	姓 名 (名稱)	荷蘭商貝喬雷登公司
	國 籍	荷蘭
	住、居所 (事務所)	荷蘭華門休南市全邦區1號
	代 表 人 姓 名	傑拉德斯 柯尼里斯

404817

裝

訂

線

404817

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利, 申請日期: 案號: , ☐有 ☐無主張優先權
荷蘭 1996.05.31 1003239

有關微生物已寄存於: , 寄存日期: , 寄存號碼:

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

本發明關於一種根據主要申請專利範圍之細胞質雄性不育卷心菜(Brassica oleracea)植物，亦即，關於發展此類植物之新親本品系。本發明進一步關於獲得該雄性不育植物的方法，以及關於得自該等新穎親本品系之雜交種子。

芥屬(Brassica)作物已栽植做為食用作物達數個世紀，而且其種子內含物可做為各種食物產品(蔬菜油、芥末等)之基本材料。

自從1970年起，各種芥屬(Brassica)蔬菜作物已呈雜交種子販售。此類種子給予成為兩種十分近親交配之親本品系產物，而組合彼等遺傳特性的雜種芥屬(Brassica)植物。若親本品系其中之一或二者為(部分)自體授粉，則必需採取預防自體授粉作用之措施，以獲得純的雜種芥屬(Brassica)植物。一項對抗自體授粉作用之措施，係使用兩親本品系其中一者所謂的自體不相容性。於此方法中，係防止有繁殖力之花粉可能在特定植物之雌蕊，包括自己本身產生花粉之芥屬(Brassica)植物的雌蕊中生長。此方法之一項缺點為，在某些個案中仍會發生自體授粉作用。結果種子產量將具有高的近交繁殖百分比。另一項防止兩親本品系其中一者自體授粉作用之措施，係以使用細胞質雄性不育性(CMS)為基礎。於蘿蔔(Raphanus sativus)中已發現一種誘發細胞質雄性不育性之細胞質，該細胞質亦已知稱為Ogura CMS細胞質。經由原生體融合，而將Ogura CMS細胞質之粒線體引導至卷心

五、發明說明(2)

菜(Brassica oleracea)植物中，藉此使該核係來自正常有繁殖力之卷心菜(B. oleracea)植物。以此方式，獲得CMS卷心菜(B. oleracea)植物。原先存在於Ogura CMS細胞質中的葉綠體，其包含負責具有此細胞質之植物冷感受性的DNA，以經由融合作用去除。

本發明之目的在於，獲得一種細胞質雄性不育卷心菜(B. oleracea)植物，其中已克服前述先前技藝之缺點，並因此對於Ogura CMS細胞質提供一種替代方法，且使用與包含(至少部分)源自瑞典蕪菁(B. napus)植物之DNA，且與細胞質雄性不育性(CMS)(之特質)結合，(換言之)負責卷心菜植物之細胞質雄性不育性的粒線體所進行之原生體融合，而達到提供此植物細胞質之目的。多方面之研究已令人驚訝地顯示，姑且不論瑞典蕪菁(B. napus)植物為正常有繁殖力之事實，原生體融合能藉由使用正確得自瑞典蕪菁(B. napus)植物之粒線體DNA，而有效率地誘發卷心菜(B. oleracea)植物的細胞質雄性不育性。前述之原生體融合作用較佳地係以一方面得自瑞典蕪菁(供者)之葉原生體，以及得自卷心菜(B. oleracea)植物(受者)之胚軸原生體而完成。

於一項根據本發明之較佳具體實施例中，進一步提供其具有對於此植物為正常之種-特異性核基因組的卷心菜(B. oleracea)植物。此造成100%純之產物。

於另一項根據本發明之具體實施例中，提供包含對於具種-特異性之粒線體的細胞。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (3)

於又一項根據本發明之具體實施例中，係將該種-特異性粒線體經由體雜交作用導入。於細胞融合作用中，編碼接受細胞質之植物遺傳組合物的核，仍保持未受改變（較佳地以其完整性）。因此，由於一次便能獲得具有所希望組合物之細胞質，故毋需反交策略。尤其顯著地，經原生體融合作用後而獲得之卷心菜 (B. oleracea) 植物，往往為四倍體或非整倍體。倍體階層可藉此增加至超過十倍C，其中C為單倍基因組。具有非二倍體基因組之植物，其特徵在於彼等之生長不同，且在於發生雄性及雌性不育性。使用流式細胞計量術可將所有不純之二倍體植物，從經由融合作用而獲得之卷心菜 (B. oleracea) 植物族群中去除。於此融合作用後，將二倍體植物進行分子分析；經由此項分析以決定出含有已知遺傳上與CMS密切關聯之粒線體DNA（或其片段）的植物。

於又一項根據本發明之具體實施例中，卷心菜 (B. oleracea) 植物係選自：

花椰菜 (B. oleracea L. convar. botrytis (L.) Alef. var. botrytis L.)，

硬花甘藍 (B. oleracea L. convar. botrytis (L.) Alef. var. cymosa Duch.)，

羅馬卷心菜 Romanesco (B. oleracea L. convar. botrytis (L.) Alef. var. botrytis L.)，

包子甘藍 (B. oleracea L. convar. oleracea var. gemnifera DC.)，

五、發明說明 (4)

白色卷心菜或點狀卷心菜 (B.oleracea L.convar. capitata (L.) Alef. var. alba DC.) ,

牛心白菜 (B.oleracea L.convar. capitata (L.) Alef. var. alba DC.) ,

紅色卷心菜 (B.oleracea L.convar. capitata (L.) Alef. var. rubra DC.) ,

皺葉甘藍 (B.oleracea L.convar. capitata (L.) Alef. var. sabauda DC.) ,

蕪菁甘藍 (B.oleracea L.convar. acephala (DC.) Alef. var. gongyloides) ,

卷縮無頭甘藍 (B.oleracea L.convar. acephala (DC.) Alef. var. sabellica L.) ,

葡萄牙甘藍 (B.oleracea var. tranchuda syn. costata) ,

本發明亦關於得自根據本發明之植物的種子或植物部分。

本發明又關於卷心菜 (B. oleracea)植物，其藉由與包含至少部分源自瑞典蕪菁 (B. napus)植物之DNA，且與細胞質雄性不育性(CMS)(之特質)結合(即，負責卷心菜植物之細胞質雄性不育性)的粒線體進行原生體融合而得之細胞質。雜種細胞包含做為細胞質雄性不育性(CMS)之載體的粒線體DNA。

本發明亦關於一種製造卷心菜 (B. oleracea)植物之方法，其包含經由原生體融合作用，將其細胞質與具有至少部分源自瑞典蕪菁 (B. napus)植物之DNA，且與細胞質

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(5)

雄性不育性(CMS)(之特質)結合(即,負責卷心菜植物之細胞質雄性不育性)的粒線體融合。

將得自(供者)以及得自卷心菜(*B. oleracea*)植物(受者)之種子滅菌消毒,並於MS30培養基或之類培養基上萌芽;對於供者,此步驟係於光照下完成,將植物經由插枝及將其置於新鮮生長培養基上而維持。得自受者之種子係於黑暗中萌芽;使用得自黃化小苗之胚軸。原生體係藉由於預先之質壁分離作用後,將葉及/或胚軸材料以細胞壁-溶解酵素如果膠酶與纖維素酶處理而分離得;此步驟係於質壁分離溶液中發生。待經過濾與離心後,將得自供者之原生體以加馬(γ)射線加馬照射。將得自受者之原生體以IOA處理,其後將該二組原生體融合。融合期間使用PEG以增進聚集作用;於融合期間需要高pH值。於融合期間使原生體保持不受攪動,以不會干擾到融合過程。於融合後,將PEG溶液清除,並替換以再生培養基。原生體之再生作用係於此培養基中發生,因此糖類如蔗糖與激素如2,4-D、BA與NAA等之存在,具有決定性之重要性。於再生期間再生培養基之滲透值,因分別添加入具有較低蔗糖濃度之培養基而逐步降低。將發展出之微癒傷組織轉移至固態再生培養基。每兩星期將該等癒傷組織轉移至新鮮之再生培養基。將新發展之幼枝置於生根培養基上,其中係以植物激素如IAA增進生根。將已生根之植物藉由採取葉片樣本,並以流式細胞計量器決定相對之核DNA含量,而進行倍體程度檢驗。保留

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(6)

下含有純二倍體基因組之植物，將其他植物棄去。將剩餘之植物進一步以分子技術之方法進行分析。使用分離自葉片樣本之DNA以及特異於粒線體DNA之探針，研究於該等植物中是否存在正確之粒線體。將包含得自受者之細胞質的植物（稱之為重回野生型者）摧毀。將剩餘之植物藉由雜交再造，並於溫室及田間條件下研究其可利用性。特別注意到諸如具生育能力、種子形成及植物品質等特徵。

本發明將藉由引述下列實施例而進一步說明，其皆為本發明之較佳具體實施例。

實施例1.種子之表面消毒

將得自卷心菜(*B. oleracea*)之種子包裝於濾紙中，並浸潤於含有70%乙醇/30%水之混合物中10秒；隨後再浸潤於55°C之無菌水中5分鐘。於此處理後再另以0.3%(w/v) NaOCl+吐溫80處理20分鐘；此處理係於無菌操作室中進行。

經此處理後，將種子包裝以無菌水洗3次，分別為5、5及10分鐘。

實施例2.用於胚軸原生體親代(起始)材料之播種

於種子包裝之最後清洗步驟後，將種子包裝打開並置於存在容器內之1/2 MS15培養基上。將容器保持於50°C之溫度下黑暗中。經約7天後，胚軸即可用於原生體分離。

實施例3.用於葉原生體親代(起始)材料之播種

將已滅菌之種子根據實施例2所述播種。將容器置於25

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(7)

℃下光照中。經14-28天後，植物葉片即可用於原生體分離；將植物之幼枝頂端置於新鮮BB上；將容器保存於25℃下光照中。使用完全擴展之葉片用於原生體分離。

實施例4.原生體分離

將葉片與胚軸材料切成小碎片，並置於含有一薄層(12毫升)質壁分離溶液之玻璃培養皿(Ø11公分)或PC-材質之培養皿(Ø9公分)中。於該切碎程序後，將另12毫升質壁分離溶液加入。

將培養皿以鋁箔紙包覆，並儲存於無菌操作室中至少一小時。

於該一小時後，將質壁分離溶液替換以大約24毫升新鮮酵素溶液。

將全部儲存於鋁箔紙中於25℃下過夜；將用以獲得胚軸原生體之酵素混合物置於搖晃器上，但用以獲得胚軸原生體之酵素混合物則否。將搖晃器設定於30 rpm，具有振幅為15毫米。

於培育後，將懸浮液通過含有兩層分別為110微米與53微米耐綸濾紙之特夫綸濾器支持物過濾。將濾器以1/3體積之CPW16(±8毫升)再洗滌。

將懸浮液於110×g下離心5分鐘。

將所形成之條帶(其含有原生體)以無菌巴氏吸管吸起，並轉移至新的離心管中。待小心地加入9毫升W5後，將原生體懸浮液於75×g下離心5分鐘。

將葉原生體另行處理如下：將各離心管之上清液倒出，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

頁

五、發明說明(8)

並將丸粒小心地懸浮於1-2毫升W5中。將各不同離心管中之內容物組合，並將W5加入使總體積達10毫升。

將含有原生體(供者)之離心管以石蠟膜密封，以鋁箔紙包覆，並置於冰上直到以50千拉德(kRad)進行照射為止。

將胚軸原生體處理如下：將各離心管之上清液倒出，並將丸粒小心地懸浮於1-2毫升W5 + 2 mM IOA (4°C)中。將各不同離心管中之內容物組合，並補充W5 + 2 mM IOA以使總體積達10毫升，且接著置於冷凍機中於4°C下培育10分鐘。

於此步驟後將懸浮液於75 × g下離心5分鐘 於是，於IOA中之總培育時間為15分鐘)。

將丸粒再次懸浮於1-2毫升W5中，並將懸浮液補充W5以使總體積達10毫升，其後將全部轉移至無菌之50毫升燒瓶中。將此包覆於鋁箔紙中之燒瓶於搖晃器(大約30 rpm，振幅15毫米)上於25°C下培育，於此期間使原生體不受光照。經此時期後，將燒瓶之內容物轉移至離心管中。

將兩支兼具有葉與胚軸之離心管於75 × g下離心5分鐘，其後將丸粒再次懸浮於1-3毫升W5中。

原生體懸浮液之密度，係以血細胞計數器決定。

實施例5.原生體融合

將二種懸浮液中之原生體係結合至最終為 9.10^5 原生體/毫升之密度混合以進行融合。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(9)

以微升滴管將40微升小滴轉移至培養皿中：

11滴40微升小滴置於Ø6公分培養皿中，或25滴40微升小滴置於Ø9公分培養皿中。

將蓋子置於培養皿上，其後將燈光熄滅並將無菌操作室關閉15分鐘，以使原生體能附著至培養皿的底部。

將無菌操作室再度開啓，並將60微升PEG溶液加至每滴原生體中。

經3-5分鐘後，將下列量之SV I加至培養皿中：

4毫升加至Ø6公分培養皿中，

9毫升加至Ø9公分培養皿中。

經3-5分鐘後將溶液吸出，並將SV II加入：

4毫升加至Ø6公分培養皿中，

9毫升加至Ø9公分培養皿中。

經3-5分鐘後將溶液吸出，並將8p小心地加入：

4毫升加至Ø6公分培養皿中，

9毫升加至Ø9公分培養皿中。

小心地添加8p培養基係十分重要，以防止原生體過早從培養皿的底部釋放出。

經3-5分鐘後將8p培養基吸出，並將新的8p培養基加入。此時原生體可從培養皿的底部釋放出：

4毫升置於Ø6公分培養皿中，

9毫升置於Ø9公分培養皿中。

將培養皿以石蠟膜密封，並儲存於大約500 lux之光照中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(10)

實施例6.再生作用

於融合後第8天，將量至多為三倍原始體積之8pA加至培養皿中：

8毫升加至Ø6公分培養皿中，

18毫升加至Ø9公分培養皿中。

將培養皿置於光照中。

於融合後第15天，將已在培養皿底部發育出之微癒傷組織小心地以無菌竹片挖下。將培養皿中之內容物以10毫升滴管平分於四支離心管中，並於75×g下離心5分鐘。同時將6毫升K₃PPS-V培養基以滴管吸取加入四個新培養皿中。經離心後，將上清液倒出，並將6毫升K₃PPS-V培養基加至該丸粒。該丸粒係由分裂細胞與微癒傷組織組成，且可容易地再懸浮於K₃PPS-V培養基中。將培養基與丸粒以10毫升滴管吸出，並滴入培養基中。自融合後第21天開始，將已發育出之微癒傷組織從K₃PPS-V培養基培育至K₃PPS-R培養基。每2個星期，將生長中之(微)癒傷組織轉移至新鮮K₃PPS-R培養基中。

一旦癒傷組織呈現出幼枝發育，則將其轉移至含有K₃PPS-R培養基之容器中。一旦幼枝已長至夠大後，即將其採收並置於生根培養基(BB培養基)中。

實施例7.流式細胞計量器之測定

採收欲受分析植物具有±1平方公分之葉樣本，並將其置於2毫升DAPI溶液中。將樣本以銳利剃刀刀身切成小碎片，並通過15微米濾器過濾。將樣本以Partec CA-II細胞

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(11)

分析儀，根據迪拉特(De Laat)等人之方法進行測量。植物之相對DNA含量係藉由，比較融合植物與二倍體質物之高峰位置而決定得。

實施例8.分子測定

以DNA探針區分出經由體離交作用獲得，具有細胞質雄性不育性之卷心菜植物，以及具有不同細胞質之卷心菜植物(不同的卷心菜品種，包括該等具有ogura、anand或polima細胞質者)。此探針係由分離自表型上不育(CMS)之植物，且經EcoRI消化作用後選殖於大腸桿菌中的粒線體DNA片段組成。該細帶之特徵在於其可以EcoRI切自大腸桿菌質體DNA，並以具特徵之方式與得自卷心菜之粒線體DNA雜交(參見圖式)。

將200毫克得自欲受分析植物之葉樣本收集於反應管中，並以液態氮冷凍。將750微升萃取緩衝液加至該等管中，並以Potterstick均質化。將樣本於13000×g下離心10分鐘，並將包括綠色物質之上清液小心地倒出。將125微升萃取緩衝液加至九粒，待以135微升溶胞緩衝液再懸浮後，將60微升月桂基肌胺酸溶液加入。略為混合之後，將混合物加熱至65°C 20分鐘。將350微升氯仿/異戊醇加入，並將反應管搖晃至少40次。於13000×g下離心10分鐘，將上層部分轉移至新的反應容器中，並若需要再重複一次CHCl₃/IAA步驟。最後，將500微升異丙醇加入，並將反應管搖晃數次。於13000×g下離心5分鐘。將九粒再次懸浮於500微升TE緩衝液中。

五、發明說明 (12)

DNA以限制酶之消化作用係如下完成：

需要大約4微克DNA用於RFLP分析。於其中發生限制作用之最終溶液係由0.1體積一般之類切割-緩衝液One-Phor-All Buffer PLUS (泛美視, Pharmacia)、4微克DNA、4 mM亞精胺與2單位限制酶組成。於37°C下進行培育至少3小時。

藉由將EDTA濃度從儲存溶液更換至10 mM而終止該反應。添加0.1體積3 M NaAc及2.5體積-20°C之乙醇使DNA沈澱。將混合物保持於-20°C下2小時；於10000 × g下離心10分鐘後，將丸粒以冰凍之70%乙醇/水洗滌，乾燥並溶解於TE緩衝液中。

用以分離DNA片段之瓊脂糖凝膠電泳術，係如下完成：稱重2克之瓊脂糖，並於250毫升TE緩衝液中煮沸。待冷卻至微溫之溫度後，將溴化乙錠加入成終濃度為0.5毫克/升。將凝膠倒出並冷卻至其凝固。將樣本加樣至加樣緩衝液終，並使DNA片段分離。當前進標記BPB已到達距離凝膠頂端約1公分處時，將電泳停止。

於預備點漬法時，將凝膠以如下處理：

於0.25 M HCl (1×)中5分鐘，

於0.5 M NaOH/1.5 M NaCl (2×)中15分鐘，

於1 M NH₄Ac/20 M NaOH (2×)中10分鐘。

將Hybond膜(艾默遜, Amersham)剪裁成與凝膠相同之大小，並藉由浸漬於2×SSC中數秒，及其後浸漬於1 M NH₄Ac/20 M NaOH中而溼潤。將三張懷特曼(Whatman)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (13)

3MM濾紙剪裁成此一大小。架設一種其中使DNA經由液體傳送4小時，而從凝膠轉移至膜之裝置。該轉移係於1 M NH_4Ac /20 M NaOH 中發生。待使膜乾燥後，藉由以紫外光照射1分鐘，而將DNA交叉連結至膜之兩側。

將所需之DNA探針以如下標定：將已轉移之DNA於95℃下加熱10分鐘，且快速置於冰上冷卻而變性。將下列於反應容器中混合：

10毫微克-3微克DNA

2微升六核苷酸混合物

2微升dNTP's (含洋地黃毒苷-dUTP)

1微升克列諾(Klenow)聚合酶

將其於在37℃下混合培育過夜後。藉由添加2微升3 M NaAc 及44微升乙醇(96%)使DNA沈澱。將混合物置於-20℃下30分鐘。於10000×g下離心15分鐘後，將丸粒以存於水之70%乙醇(v/v)洗滌，並將已乾燥之丸粒溶解於50微升TE中。

將經標定之片段與膜雜交：

將膜置於2×SSC中數秒。然後將該膜密封於含有20毫升預雜交混合物之袋中。將該膜於60-65℃下培育至少一小時。將預雜交混合物去除，並置換以4毫升雜交混合物且培育過夜。經培育後，將該膜洗滌：4次於清洗溶液1中1或2分鐘；4次於清洗溶液2中2分鐘，及2次於清洗溶液3中(於60-65℃下)15分鐘。

於室溫下進行經標定條帶之偵測，將點漬物於洗滌緩衝

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (14)

液1中洗滌，然後與每100平方公分10毫升之洗滌緩衝液2一起密封。於搖晃器上培育30分鐘後，將洗滌緩衝液2以每100平方公分15毫升之抗-dig溶液替換。於搖晃器上培育30分鐘後，將該膜洗滌：2至3次於清洗溶液2中10分鐘；3至4次於清洗溶液1中10分鐘，及1次於清洗溶液3中。將該膜與每100平方公分10毫升之AMPPD溶液培育20分鐘。將該膜置於含有位於頂端之Polaroid軟片的卡匣中；經足夠曝光後，將軟片取出並沖洗。

實施例9.描述一種具有得自瑞典蕪菁(B. napus)之粒線體的細胞質雄性不育卷心菜(B. oleracea)之花表型

花序：花串之主軸延伸向頂端，有時變短或發育成扁平束狀，往往分歧。很少出現苞葉，有時扭轉或捲曲。花柄有時變短或發育成扁平束狀。

花芽：往往閉合，有時張開，萼片兩側不互相接觸且摺起。表面光滑至凸出，頂端大多向內捲曲，有時尖銳。雌蕊通常向外生長向頂端。

花：萼片寬1-4毫米，長4-12毫米，直立，側面有時向內彎曲，頂端向內彎曲。存在有蜜腺。花瓣4，有時成倍增加至40；寬4-7毫米，長11-19毫米。多數之4中，內部之花瓣通常較短。扁平而似乎可能發育成管束。平面狀大多不向後彎曲，往往向側面捲曲，有時強力扭轉。上部顏色為白色或黃色 RHS 2A-3A-2C-3C-4A-5A-5B-6A，底部為白色或黃色 RHS 2A-2B-2C-3A-3C -4B-4C-4A，側面頂端通常光滑，有時為V字形彎曲。雄蕊6至12，且有

五、發明說明 (15)

時兩兩成束，長度多達雌蕊的一半，有時與雌蕊長度相同。花藥，小且呈三角形，無花粉存在。一個柱頭，有時多達三個，其中一者較其他略長，大多直立，無受粉往往生長至長度約為30毫米。嘴狀物與雌蕊有時彎曲，有時稍微腫大。子房通常扭轉或捲曲。

位於花束頂端之花有時幾乎沒有萼片、花瓣與雄蕊，且具有十分扭轉或捲曲的子房，或似乎兩兩成束；裂口沿著成束之接合處裂開，位於苞葉上之擬葉具有平行葉脈。

用於細胞融合所需要之溶液：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (16)

	CIN ₁₆	W5	預製型分瓶	實型分瓶	KJPPSI	KJPPSV	KJPPSR	SP	SPA	WATIS	MSC	BB
KNO ₃ (mM)	10	—	—	—	24.73	24.73	24.73	18.80	18.80	9.40	18.79	18.79
NI ₂ NO ₃ (mM)	—	—	—	—	3.13	3.13	3.13	7.49	7.49	10.3	20.61	20.61
FeNaEDTA (mM)	—	—	—	—	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
MgSO ₄ ·7H ₂ O (mM)	1.0	—	—	—	1.01	1.01	1.01	1.22	1.22	0.75	1.50	1.50
CaCl ₂ (mM)	10	125	50	50	2.00	2.00	2.00	4.08	4.08	1.50	2.99	2.99
KCl (mM)	—	10.7	—	—	—	—	—	4	4	—	—	—
NaCl (mM)	—	154	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
KH ₂ PO ₄ (mM)	0.2	—	—	—	—	—	—	1.25	1.25	0.63	1.25	1.25
NaH ₂ PO ₄ (mM)	—	—	—	—	1.09	1.09	1.09	—	—	—	—	—
(NH ₄) ₂ SO ₄ (mM)	—	—	—	—	1.01	1.01	1.01	—	—	—	—	—
H ₂ BO ₃ (μM)	—	—	—	—	48.52	48.52	48.52	48.52	48.52	0.10	0.10	0.10
CuSO ₄ ·5H ₂ O (μM)	0.10	—	—	—	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
MnSO ₄ ·H ₂ O (μM)	—	—	—	—	59.16	59.16	59.16	59.16	59.16	0.10	0.10	0.10
KJ (μM)	0.97	—	—	—	6.00	6.00	6.00	4.52	4.52	5.00	5.00	5.00
Na ₂ MnO ₄ ·2H ₂ O (μM)	—	—	—	—	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (μM)	—	—	—	—	6.96	6.96	6.96	6.96	6.96	29.91	29.91	29.91
CoCl ₂ ·6H ₂ O (μM)	—	—	—	—	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
甘肅酸 (μM)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	26.64	26.64	26.64
肌-肌醇 (μM)	—	—	—	—	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56
吡多醇-HCl (μM)	—	—	—	—	4.86	4.86	4.86	4.86	4.86	2.43	2.43	2.43
硫胺素-HCl (μM)	—	—	—	—	29.65	29.65	29.65	29.65	29.65	0.30	0.30	0.30
菸酸 (μM)	—	—	—	—	8.12	8.12	8.12	8.12	8.12	4.06	4.06	4.06
丙酮酸-Na (μM)	—	—	—	—	—	—	—	181	181	—	—	—
檸檬酸 (μM)	—	—	—	—	—	—	—	208	208	—	—	—

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (17)

	CPW16	WS	預質型分母	質型分母	K3PPS-I	K3PPS-V	K3PPS-R	SP	SPA	1/4MS15	MS10	BD
蘋果酸 (μM)	-	-	-	-	-	-	-	298	298	-	-	-
反丁烯二酸 (μM)	-	-	-	-	-	-	-	344	344	-	-	-
抗壞血酸 (μM)	-	-	-	-	-	-	-	5.7	5.7	-	-	-
葡萄糖 (mM)	-	5.55	-	-	-	-	-	379	379	-	-	-
果糖 (mM)	-	-	-	-	-	-	-	1.39	1.39	-	-	-
蔗糖 (mM)	-	-	-	-	-	-	-	1.67	1.67	-	-	-
甘露糖 (mM)	-	-	-	-	-	-	-	1.39	1.39	-	-	-
鼠李糖 (mM)	-	-	-	-	-	-	-	1.52	1.52	-	-	-
纖維二糖 (mM)	-	-	-	-	-	-	-	0.73	0.73	-	-	-
山梨醇 (mM)	-	-	50	300	-	-	-	1.37	1.37	-	-	-
甘露糖醇 (mM)	-	-	-	-	-	-	-	1.37	1.37	-	-	-
酪蛋白水解產物 (mg/l)	-	-	-	-	-	-	-	250	250	-	-	-
蔗糖 (mM)	467	-	-	-	400	100	30	0.73	0.73	43.82	43.82	43.82
木糖 (mM)	-	-	-	-	1.67	1.67	1.67	1.67	1.67	-	-	-
椰子奶 (ml/l)	-	-	-	-	-	-	-	20	20	-	-	-
2,4-D (μM)	-	-	-	-	0.45	0.45	-	4.5	-	-	-	-
BA (μM)	-	-	-	-	4.4	4.4	2.2	2.2	-	-	-	-
NAA (μM)	-	-	-	-	0.13	0.13	-	0.49	-	-	-	-
LAA (μM)	-	-	-	-	-	-	0.57	-	-	-	-	5.71
玉米黃質 (μM)	-	-	-	-	-	-	2.28	-	-	-	-	-
瓊脂糖 (% (w/v))	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-
瓊脂 (% (w/v))	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	0.7	0.7	0.7
pH (temp.comp)	包圍	5.6	7.0	6.4	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.8	5.8	6.0

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (18)

用於細胞生物學之其他溶液

酵素溶液：

1% (w/v) 纖維素酶 R-10 存於 K₃PPS-I

0.1% (w/v) 果膠酶 存於 K₃PPS-I

pH = 5.6

PEG 溶液：

PEG1500 266.7 mM

葡萄糖 300 mM

CaCl₂·2H₂O 50 mM

pH = 7.0

SVI：

50 毫升 PEG 溶液 + 100 毫升 預-質壁分離溶液

SVII：

20 毫升 PEG 溶液 + 100 毫升 預-質壁分離溶液

IOA (碘乙醯胺)

2 mM IOA 存於 W₅；pH = 5.6

1% 存於 MilliQ 超純水之瓊脂糖溶液。

用於分子生物學之溶液：

萃取緩衝液：

350 mM 山梨醇

100 mM Tris-鹼

5 mM EDTA

新鮮添加：20 mM 亞硫酸氫鈉

溶胞作用緩衝液：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (19)

20 mM Tris-鹼

5 mM EDTA

2 M NaCl

2% (w/v) CTAB

N-月桂基肌胺酸，Na鹽：10% (w/v)

氯仿/異戊醇：24:1 (v:v)

異丙醇

TE：10 mM Tris-HCl；pH 8.0

1 mM EDTA

4 mM 亞精胺

EDTA 儲存溶液：1 M

3 M NaAc

乙醇 96%

70% 乙醇/水 v/v

溴化乙錠溶液：10 毫克/毫升 H₂O

TAE 緩衝液：

4.84 克 Tris-鹼/升

1.14 毫升 醋酸

10 mM EDTA；pH 8.0

加樣緩衝液：

24% Ficoll 400

0.1% SDS

0.1% 二甲苯腈藍

0.1% 溴酚藍

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (20)

0.25 M HCl

0.5 M NaOH/1.5 M NaCl

1 M NH₄Ac/20 M NaOH

2 × SSC :

30 mM 檸檬酸 -Na₂H₂O ; pH 7.2

300 mM NaCl

0.2 × SSC ; 10 × 稀釋之 2 × SSC

0.1 × SSC ; 20 × 稀釋之 2 × SSC

六核苷酸混合物 : 10 × 濃縮之得自百靈佳英格
(Boehringer Mannheim)的六核苷酸混合物

dNTP :

0.1 mM dATP

0.1 mM dCTP

0.1 mM dGTP

0.1 mM dTTP

0.35 mM 洋地黃毒苷-dUTP (百靈佳)

阻斷試劑 : 百靈佳英格(Boehringer Mannheim); 貨品編
號 1175041

預雜交混合物 :

75 mM 檸檬酸 -Na

750 mM NaCl

0.5% 阻斷試劑

0.1% N-月桂基肌胺酸(w/v)

0.2% SDS

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

泉

五、發明說明 (21)

雜交混合物：

75 mM檸檬酸-Na

750 mM NaCl

0.5%阻斷試劑

0.1% N-月桂基肌胺酸(w/v)

0.2% SDS

40-50毫微克洋地黄毒苷-dUTP經標定探針/毫升

清洗溶液1：2×SSC+0.1% (w/v) SDS

清洗溶液2：0.2×SSC+0.1% (w/v) SDS

清洗溶液3：0.1×SSC+0.1% (w/v) SDS

洗滌緩衝液1：

100 mM Tris-HCl pH7.5

150 mM NaCl

洗滌緩衝液2：

洗滌緩衝液1

0.5%阻斷試劑(新鮮製造)

洗滌緩衝液3：

洗滌緩衝液1

50 mM MgCl₂

抗-dig-AP共軛物：百靈佳英格(Boehringer Mannheim)：

貨品編號1175041

AMPPD溶液：10微升AMPPD每毫升洗滌緩衝液3
(0.26μM)

所使用之縮語：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (22)

2,4-D:	2,4-二氯苯氧基乙酸
AMPPD:	3-(4-甲氧基螺{1,2-二環氧丙烷-3,2'-三環-[3.3.1.1 ^{3,7}]癸烷}-4-基)苯基磷酸二鈉
AP:	酸性磷酸酶
BA:	6-苄胺基嘌呤
BPB:	溴酚藍
CMS:	細胞質雄性不育性
DIG:	洋地黃毒苷
dATP:	脫氧腺苷三磷酸
dCTP:	脫氧胞苷三磷酸
dGTP:	脫氧鳥苷三磷酸
dNTP:	脫氧核糖核苷三磷酸
dTTP:	脫氧胸苷三磷酸
DUTP:	脫氧尿苷三磷酸
EDTA:	乙二胺四乙酸
g:	重力加速度(9.8米·秒 ⁻²)
IOA:	碘乙醯胺
kRad:	1000拉德(Rad)，游離輻射之單位
μg:	微克
μl:	微升
mM:	毫莫耳濃度
μM:	微莫耳濃度
M:	莫耳濃度
MS:	穆拉吉與史庫格(Murashige&Skoog)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

頁

五、發明說明 (23)

NAA:	萘乙酸
PEG:	聚乙二醇
pH:	酸度之測量值
rpm:	每分鐘旋轉數
SSC:	食鹽檸檬酸鈉
SDS:	十二烷基硫酸鈉
TC:	組織培養
UV:	紫外光
v/v:	體積/體積
w/v:	重量/體積

對於大多數處理，其可指定於限制必須保持之pH值、濃度等之範圍，以及指定於必須實施以完成實驗之程度範圍內。三項對於此等溶液/處理之程度列示於下：

組織培養培養基：

1/2 MS15、MS30與BB：

糖類如蔗糖：濃度0.5-600 mM，正常為200-400 mM。

pH 5-10，正常為5.5-6.0。

栽培溫度：22-27°C，正常為25°C。

光照：0-60 kRad，正常為50 kRad。

融合作用溫度：20-25°C，正常為22°C。

植物激素之濃度：0-10 μ M，正常為0-3 μ M。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

泉

四、中文發明摘要 (發明之名稱：獲得細胞質雄性不育卷心菜(*BRASSICA OLERACEA*)植物之方法)

一種獲得卷心菜(*B. oleracea*)植物之方法，其包含經由原生體融合及體細胞雜交而提供細胞原生體之步驟，該細胞原生體包括得自可育性瑞典蕪菁(*Brassica napus*)植物之粒線體 DNA 之細胞原生體，該 DNA 結合在卷心菜(*Brassica oleracea*)植物導致細胞質雄性不育性之卷心菜(*Brassica oleracea*)一專一性細胞核 DNA。

英文發明摘要 (發明之名稱： "METHOD FOR OBTAINING CYTOPLASMIC MALE STERILE *BRASSICA OLERACEA* PLANT")

A process for producing a *Brassica oleracea* plant comprising the step of providing, via protoplast fusion and somatic hybridization, cellular cytoplasm comprising mitochondrial DNA from a fertile *Brassica napus* plant, said DNA in combination with *Brassica oleracea*-specific nuclear DNA causing cytoplasmic male sterility in the *Brassica oleracea* plant.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

1. 一種獲得卷心菜(B. oleracea)植物之方法，其包含經由原生體融合及體細胞雜交而提供細胞原生體之步驟，該細胞原生體包括得自可育性瑞典蕪菁(Brassica napus)植物之粒線體DNA之細胞原生體，該DNA結合在卷心菜(Brassica oleracea)植物導致細胞質雄性不育性之卷心菜(Brassica oleracea)-專一性細胞核DNA。

2. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該卷心菜(B. oleracea)植物係選自：

花椰菜(B. oleracea L.convar. botrytis (L.) Alef. var. botrytis L.)，

硬花甘藍(B. oleracea L.convar. botrytis (L.) Alef. var. cymosa Duch.)，

羅馬卷心菜 Romanesco(B. oleracea L.convar. botrytis (L.) Alef. var. botrytis L.)，

包子甘藍(B. oleracea L.convar. oleracea var. gemnifera DC.)，

白色卷心菜或點狀卷心菜(B. oleracea L.convar. capitata (L.) Alef. var. alba DC.)，

牛心白菜(B. oleracea L.convar. capitata (L.) Alef. var. alba DC.)，

紅色卷心菜(B. oleracea L.convar. capitata (L.) Alef. var. rubra DC.)，

皺葉甘藍(B. oleracea L.convar. capitata (L.) Alef. var. sabauda DC.)，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

1. 一種獲得卷心菜(B. oleracea)植物之方法，其包含經由原生體融合及體細胞雜交而提供細胞原生體之步驟，該細胞原生體包括得自可育性瑞典蕪菁(Brassica napus)植物之粒線體DNA之細胞原生體，該DNA結合在卷心菜(Brassica oleracea)植物導致細胞質雄性不育性之卷心菜(Brassica oleracea)-專一性細胞核DNA。

2. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該卷心菜(B. oleracea)植物係選自：

花椰菜(B. oleracea L.convar. botrytis (L.) Alef. var. botrytis L.)，

硬花甘藍(B. oleracea L.convar. botrytis (L.) Alef. var. cymosa Duch.)，

羅馬卷心菜 Romanesco(B. oleracea L.convar. botrytis (L.) Alef. var. botrytis L.)，

包子甘藍(B. oleracea L.convar. oleracea var. gemnifera DC.)，

白色卷心菜或點狀卷心菜(B. oleracea L.convar. capitata (L.) Alef. var. alba DC.)，

牛心白菜(B. oleracea L.convar. capitata (L.) Alef. var. alba DC.)，

紅色卷心菜(B. oleracea L.convar. capitata (L.) Alef. var. rubra DC.)，

皺葉甘藍(B. oleracea L.convar. capitata (L.) Alef. var. sabauda DC.)，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

var. sabauda DC.) ,

蕪菁甘藍 (B.oleracea L.convar. acephala (DC.) Alef.
var. gongyloides) ,

卷縮無頭甘藍 (B.oleracea L.convar. acephala (DC.)
Alef. var. sabellica L) ,

葡萄牙甘藍 (B.oleracea var. tronchuda syn.
costata) 。

3. 一種獲得種子或植物部分之方法，其中該種子或植物部分係得自藉由根據申請專利範圍第1或2項之方法所獲得之卷心菜 (B. oleracea) 植物。
4. 一種獲得卷心菜 (B. oleracea) 植物之細胞的方法，其包含經由原生體融合及體細胞雜交而提供細胞原生體之步驟，該細胞原生體包括得自可育性瑞典蕪菁 (Brassica napus) 植物之粒線體DNA之細胞原生體，該DNA結合在卷心菜 (Brassica oleracea) 植物導致細胞質雄性不育性之卷心菜 (Brassica oleracea) 一專一性細胞核DNA。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂