



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I659689 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 05 月 21 日

(21)申請案號：102134778

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 09 月 26 日

(51)Int. Cl. : A01H5/00 (2018.01)

A01H1/02 (2006.01)

A01H4/00 (2006.01)

(30)優先權：2012/09/27 日本

2012-213296

(71)申請人：日商莎卡達種子股份有限公司 (日本) SAKATA SEED CORPORATION (JP)
日本(72)發明人：森一俊 MORI, KAZUTOSHI (JP)；泉田敦 IZUMIDA, ATSUSHI (JP)；堀內慎吾
HORIUCHI, SHINGO (JP)；鈴木隆夫 SUZUKI, TAKAO (JP)

(74)代理人：林志剛

(83)生物材料寄存：

食品工業發展研究所 BCRC 960473 2013 年 11 月 12 日

(56)參考文獻：

張元聰等人，"亞熱帶地區洋桔梗品種之選育"，<http://ir.tari.gov.tw:8080/bitstream/345210000/4575/2/no154-10.pdf>，2012 年 04 月 20 日。

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：3 共 36 頁

(54)名稱

細胞質雄性不孕洋桔梗 (E u s t o m a) 及其製造方法

(57)摘要

本發明係有關具有細胞質雄性不孕性之新穎的洋桔梗(Eustoma)，以及其育種方法。進而詳細係有關由於雄蕊或花粉之形成不充分，特徵為缺失實質上的授粉功能，具有新穎的細胞質雄性不孕性之洋桔梗及其育種方法。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

細胞質雄性不孕洋桔梗 (Eustoma) 及其製造方法

【技術領域】

本發明係有關具有細胞質雄性不孕性之新穎的洋桔梗 (Eustoma) 以及其育種方法。進而詳細係有關由於雄蕊或花粉之形成不充分，特徵為缺失實質上的授粉功能，具有新穎的細胞質雄性不孕性之洋桔梗及其育種方法。

【先前技術】

洋桔梗係原生於北美國南部至中美國北部之龍膽科洋桔梗 (Eustoma) 屬自交受孕種子繁殖植物，目前存在 (1) Eustoma grandiflorum (英文名為 Prairie gentian, 舊學名係 E. russellianum (Hook) G. Don ex Sweet, Lisianth(i)us russellianus Hook.)，以及 (2) Eustoma exaltatum (英文名為 Seaside gentian, Catchfly gentian, 舊學名係 E. selenifolium Salisb.) 2 個品種。別名為土耳其桔梗，或麗鉢花 (Lisianthus) 較為人熟知。1835 年蘇格蘭發表為原生種，並命名為 Lisianthus russellianus Hook.。1930 年代導入日本後，盛行主要作為切花用、鉢物用的品種改良。品種改良主要係使用土耳其桔梗 (Eustoma grandiflorum)。

已知洋桔梗係具有高觀賞價值及市場價值之花卉植物，特別目前在切花用品種的領域中已製造出具有各式各樣性質之品種，可算是切花的主要品項之一（參照非專利文件 1）。

一般而言，主要園藝作物係使用經利用雜種強勢，雙親代均具有優異性質之雜種第一代交配（F1）植物。

於切花需求高的洋桔梗栽培品種，由於具有耐病性與高品質性，以雜種第一代交配品種為主流。

另外，於生產方面為使播種作業效率化，育成者目前正尋求高純度種子之供給。

雜種第一代交配品種之採種，首先係以人工為種子親去雄後，以花粉親之花粉，為去雄後之種子親的柱頭授粉而進行。

一般而言，種子親可進行去雄之期間被限定於即將開花期，且由於容易受天候左右，去雄作業存在難以預測可進行去雄之期間此一作業性之問題。另外，因該作業需藉由人工進行，未完全去雄而殘留的花粉，造成產生了未預期的自花授粉種子之情況，因混入自花授粉種子而使種子品質降低成為一大問題。

自上述理由，洋桔梗相關領域目前正期望無需藉由人工為種子親進行去雄，利用雄性不孕性之採種方法之開發。

目前已知利用農桿根群菌（*Agrobacterium rhizogenes*），導入 *rolC* 基因，經轉形之矮性土耳其桔梗（非專利

文件 2)，但報告指出其花朵呈現小型化，亦同時引起喪失花粉孕性與頂芽優勢消失（rol 症候群）。

目前揭示有應用非專利文件 2 之技術，藉由利用不定芽再生維持雄性不孕之土耳其桔梗製造 F1 品種之方法（專利文件 1）。然而由於遵循該方法製造出之 F1 品種伴隨有非目標之性質，該方法存在無法利用於具有商品性要求植株態勢與植株高度之切花品種之育種此一問題。

屬於雄性不孕性之一之細胞質雄性不孕性，因屬細胞質遺傳，使細胞質雄性不孕系與雄性可孕系進行交配時，由於後代植物具有雄性不孕性，可提供純度高之種子。另外，細胞質雄性不孕系係藉由使該系，與細胞核基因體相同之細胞質正常之維持系進行交配，可容易維持及增殖細胞質雄性不孕系。因此，利用細胞質雄性不孕性之雜種第一代交配品種之採種方法，實用性極高，被利用於許多主要園藝作物上。然而，洋桔梗的範疇中，儘管先前持續期望開發利用雄性不孕性之採種方法，但尚未出現細胞質雄性不孕洋桔梗之製造方法之報告。因此，生產洋桔梗 F1 品種之種子時，由於先前不存在實用之利用雄性不孕系之採種體系，而採用需要去雄作業之採種。

另一方面，目前正尋求藉由延遲花瓣的老化，延長花朵的觀賞期間之延長花朵壽命。花瓣老化原因可舉出授粉，或因雌蕊的柱頭及花柱受到傷害而生成乙烯等（非專利文件 3）。

洋桔梗的領域中，可維持花朵壽命的優良品種，已知

有藉由使柱頭的部分維持閉合，妨礙授粉而延遲花朵老化之具有變形雌蕊之洋桔梗（專利文件 2）。

爲使花朵壽命延長，必須利用育成雄蕊的花絲短之系，或利用具有如前述之變形雌蕊，以物理性的方式使柱頭無法授粉之經改變植物器官構造之系。

進而，市場價值高之花卉植物的條件之一，係被要求需防止花粉飛散。然而，現今的洋桔梗品種，由於任一種品種雄蕊都具有花粉，而有因花粉飛散而使花瓣或衣服污損等課題。

藉由利用雄性不孕性，可不使有用性質產生變化，且解決花朵壽命性等課題，但目前尚未製造出實用的具有雄性不孕性之洋桔梗。

[先前技術文件]

[專利文件]

[專利文件 1] 特開平 9-107829 號公報

[專利文件 2] 專利 4133011 號公報

[非專利文件]

[非專利文件 1] 農業技術體系花卉編 8 卷追錄 6 號
387-395 2004 年 社團法人農山漁村文化協會發行

[非專利文件 2] 組織培養 Vol. 19 No. 2 p50-55 1993
年 新科學社

[非專利文件 3] 實踐花卉園藝技術土耳其桔梗栽培管理與開花調節 2003 年 股份有限公司誠文堂新光社發行

[非專利文件 4] E. S. Mousavi, M. Behbahani, E.

Hadavi, S. M. Miri (2012) CALLUS INDUCTION AND PLANT REGENERATION IN LISIANTHUS (EUSTOMA GRANDIFLORIUM), ANNIVERSARY EDITION TRAKIA JOURNAL OF SCIENCES Vol. 10, No. 1, pp-22-25

[非專利文件 5] J. Duminil, M. - H. PEMONGE and R. J. PETIT (2002) Molecular Ecology Notes vol. 2 p428-430 "A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA"

【發明內容】

[發明欲解決之課題]

本發明有鑑於如上述之先前之洋桔梗品種 F1 種子生產時繁雜的去雄作業等問題點，種子品質降低之問題點，進而花朵壽命性與花粉飛散之課題，本發明係提供具有細胞質雄性不孕性之新穎的洋桔梗，以及其製作方法。

[解決課題之手段]

本發明團隊為解決上述課題進行專心檢討後，製出具有細胞質雄性不孕性之新穎的洋桔梗個體，育成具有該細胞質雄性不孕性之洋桔梗品種，完成了使用該細胞質雄性不孕性洋桔梗，獲得雜種第一代交配品種之育成方法。

亦即，本發明係有關具有細胞質雄性不孕性之新穎的洋桔梗，以及其育種方法，進而詳細係有關由於雄蕊或花粉之形成不充分，特徵為缺失實質上的授粉功能，具有新

類的細胞質雄性不孕性之洋桔梗及其育種方法。

亦即，本發明係提供下述之（1）～（34）。

（1）一種洋桔梗（*Eustoma*）屬植物或其後代，其係具有細胞質雄性不孕性。

（2）如（1）之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物或其後代，其特徵係具有序列編號 1 或序列編號 2 記載之鹼基序列。

（3）如（1）或（2）項之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物或其後代，其特徵係前述洋桔梗（*Eustoma*）屬植物或其後代係，具有序列編號 1 或序列編號 2 記載之鹼基序列之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物作為種子親，以任意之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物作為花粉親之雜交後代所製作之細胞質雄性不孕植物。

（4）如（1）～（3）項中任一項之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物或其後代，其特徵係前述洋桔梗（*Eustoma*）屬植物或其後代係，具有序列編號 1 或序列編號 2 記載之鹼基序列之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物作為種子親，以土耳其桔梗（*E. grandiflorum*）作為花粉親之雜交後代所製作之細胞質雄性不孕植物。

（5）一種洋桔梗（*Eustoma*）屬植物或其後代之植物體之一部份，其係如（1）～（4）項中任一項所述。

（6）一種洋桔梗（*Eustoma*）屬植物或其後代之種子，其係如請求項（1）～（4）項中任一項所述。

（7）一種癒傷組織（*callus*），其係含有如（1）～

(4) 項中任一項之洋桔梗 (Eustoma) 屬植物或其後代之細胞。

(8) 一種洋桔梗 (Eustoma) 屬植物或其後代，其係自如 (7) 之癒傷組織，利用誘導、組織培養進行無性繁殖者。

(9) 一種洋桔梗 (Eustoma) 屬植物或其後代之植物體之一部分，其係如 (8) 所述。

(10) 一種洋桔梗 (Eustoma) 屬植物之製作方法，其係自如 (7) 之癒傷組織，利用誘導、組織培養進行無性繁殖者。

(11) 一種細胞質，其係含於如 (1) ~ (4) 項或 (8) 項中任一項之洋桔梗 (Eustoma) 屬植物或其後代、(5) 或 (9) 項之植物體之一部份、(6) 之種子、或 (7) 之癒傷組織中。

(12) 一種粒線體，其係含於如 (1) ~ (4) 項或 (8) 項中任一項之洋桔梗 (Eustoma) 屬植物或其後代、(5) 或 (9) 項之植物體之一部份、(6) 之種子、或 (7) 之癒傷組織中。

(13) 一種洋桔梗 (Eustoma) 屬植物或其後代，其寄存號碼係特定為 FERM BP-11506，其係具有細胞質雄性不孕性。

(14) 一種洋桔梗 (Eustoma) 屬植物或其後代之植物體之一部份，其係如 (13) 所述。

(15) 一種洋桔梗 (Eustoma) 屬植物或其後代之種

子，其係如（13）所述。

（16）一種細胞質，其係含於如（13）之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物或其後代、（14）之植物體之一部份、或（15）之種子中。

（17）一種粒線體，其係含於如（13）之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物或其後代、（14）之植物體之一部份、或（15）之種子中。

（18）一種癒傷組織（callus），其寄存號碼係特定為 FERM BP-11507，其係具有細胞質雄性不孕性之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物。

（19）一種洋桔梗（*Eustoma*）屬植物或其後代，其係自如（18）之癒傷組織，利用誘導、組織培養進行無性繁殖者。

（20）一種洋桔梗（*Eustoma*）屬植物或其後代植物體之一部份，其係如（19）所述。

（21）一種洋桔梗（*Eustoma*）屬植物之製作方法，其係自如（18）之癒傷組織，利用誘導、組織培養進行無性繁殖者。

（22）一種細胞質，其係含於如（18）之癒傷組織、（19）之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物或其後代、或（20）之植物體之一部份中。

（23）一種粒線體，其係含於如（18）之癒傷組織、（19）之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物或其後代、或（20）之植物體之一部份中。

(24) 一種雜種第一代種子之製作方法，其係包含以 (1) ~ (4) 項或 (8) 項中任一項之洋桔梗 (*Eustoma*) 屬植物或其後代作為種子親，且以可與該植物交配之洋桔梗 (*Eustoma*) 屬植物作為花粉親進行交配，自交配後之種子親採種雜種第一代種子。

(25) 一種雜種第一代種子之製作方法，其係包含以 (13) 之洋桔梗 (*Eustoma*) 屬植物或其後代作為種子親，且以可與該植物交配之洋桔梗 (*Eustoma*) 屬植物作為花粉親進行交配，自交配後之種子親採種雜種第一代種子。

(26) 一種雜種第一代種子之製作方法，其係包含以利用 (18) 之癒傷組織經使其再生之洋桔梗 (*Eustoma*) 屬植物或其後代作為種子親，且以可與該植物交配之洋桔梗 (*Eustoma*) 屬植物作為花粉親進行交配，自交配後之種子親採種雜種第一代種子。

(27) 一種雜種第一代種子，其係利用如 (24) ~ (26) 項中任一項之方法製作。

(28) 一種雜種第一代植物，其係由如 (27) 之雜種第一代種子生長而成。

(29) 一種洋桔梗 (*Eustoma*) 屬植物之製作方法，其係將細胞質中含有序列編號 1 或序列編號 2 記載之鹼基序列之洋桔梗 (*Eustoma*) 屬植物，與具有有用性質之洋桔梗 (*Eustoma*) 屬植物，藉由回交育種，使其具有前述之有用性質，且使其表現細胞質雄性不孕性。

(30) 一種洋桔梗 (Eustoma) 屬植物之製作方法，其係將寄存號碼特定為 FERM BP-11506，且具有細胞質雄性不孕性之洋桔梗 (Eustoma) 屬植物或其後代，與具有有用性質之洋桔梗 (Eustoma) 屬植物，藉由回交育種，使其具有前述之有用性質，且使其表現細胞質雄性不孕性。

(31) 一種洋桔梗 (Eustoma) 屬植物之製作方法，其係將自寄存號碼特定為 FERM BP-11507，且具有細胞質雄性不孕性之洋桔梗 (Eustoma) 屬植物之癒傷組織，利用誘導、組織培養進行無性繁殖之洋桔梗 (Eustoma) 屬植物或其後代，與具有有用性質之洋桔梗 (Eustoma) 屬植物，藉由回交育種，使其具有前述之有用性質，且使其表現細胞質雄性不孕性。

(32) 如 (29) ~ (31) 項中任一項之製作方法，其中具有有用性質之洋桔梗 (Eustoma) 屬植物係來自土耳其桔梗 (*E. grandiflorum*)。

(33) 一種洋桔梗 (Eustoma) 屬植物或其後代，其係利用如 (29) ~ (32) 項中任一項之方法製作。

(34) 一種洋桔梗 (Eustoma) 屬植物或其後代之植物體之一部份，其係如 (33) 所述。

[發明的效果]

藉由利用本發明提供之具有新穎的細胞質雄性不孕性之洋桔梗，可育成具有優異的採種性、花朵壽命性、以及

／或鑑賞性之洋桔梗與其 F1 品種，且可進行其高品質種子之採種。

【圖式簡單說明】

[圖 1] 圖 1 係本發明之細胞質雄性不孕洋桔梗，與雄性可孕洋桔梗之照片（（A）係雄性可孕系，（B）及（C）係雄蕊發育不完全之細胞質雄性不孕系，（D）係雄蕊完全不存在之細胞質雄性不孕系）。

[圖 2] 圖 2 係使用細胞質雄性不孕洋桔梗系（SSE-CMS 細胞質：位置（lane）1）、股份有限公司坂田種子保有之洋桔梗屬野生種（位置（lane）2-8）、以及股份有限公司坂田種子育成之洋桔梗屬栽培種（位置（lane）9-15）之全部 DNA（total DNA）作為模板（template）進行 PCR，並進行電泳後之結果。M 係分子量標準品。（A）Marker 1：SSE-CMS 洋桔梗系具特異性之標誌，（B）Marker 2：SSE-CMS 洋桔梗系具特異性之標誌，（C）nad5／4-5：全部洋桔梗屬植物共通之標誌。

[圖 3] 圖 3 係表示 Marker 1 以及 Marker 2 之鹼基序列。

【實施方式】

以下，針對本發明詳細說明。

1. 細胞質雄性不孕洋桔梗

本發明之具有雄性不孕性洋桔梗之育成方法，特徵係自洋桔梗屬植物之雜種，選拔具有細胞質雄性不孕性之洋桔梗。

本發明中「洋桔梗屬植物」或「洋桔梗」係指龍膽科洋桔梗（*Eustoma*）屬植物，在日本一般民眾較熟悉土耳其桔梗此名稱之園藝作物。

以洋桔梗為首，一般花朵具有萼片與花瓣，其內側有雄蕊（小蕊）與雌蕊（雌蕊）。典型的雄蕊由含有花粉的花藥與花絲構成。與本發明相關之「雄性不孕」係表示因雄蕊的發育不完全，未能充分產出花粉之狀態。並非有所限制，例如雄蕊完全不存在的狀態，與雄蕊的發育不完全的狀態之洋桔梗，顯示雄性不孕性（參照圖 1）。另外，「細胞質雄性不孕」係指藉由來自細胞質之器官之基因，母系遺傳之雄性不孕性質。

本發明中「具有細胞質雄性不孕性之洋桔梗屬植物後代」係指以具有細胞質雄性不孕性之洋桔梗屬植物作為雌親（種子親），藉由與可與該植物交配之洋桔梗屬植物作為雄親（花粉親）進行交配可得，利用母系遺傳使雄性不孕性繼續存在於下一個世代以及下一個世代之後之洋桔梗屬植物。另外本發明中，「植物體之一部分」係指包含該植物體之 1 個以上的細胞或自 1 個以上的細胞之細胞質，具體而言係意指花、葉、莖、根等器官，或組織，或者來自該等器官或組織之細胞（包含自細胞調製之原生質體）或細胞質，或前述細胞或細胞質之集合體。

本說明書中「寄存號碼特定為 FERM BP-11506 之洋桔梗屬植物」，係具有細胞質雄性不孕性之性質，且該植物與實際上等價的植物亦包含於該範圍內。亦即，只要是維持有細胞質雄性不孕性，例如，寄存號碼特定為 FERM BP-11506 之洋桔梗屬植物之突變體與基因轉殖物等亦包含於其範圍內。

本說明書中「寄存號碼特定為 FERM BP-11507 之洋桔梗屬植物之癒傷組織（callus）」，係自該癒傷組織再生之植物，具有細胞質雄性不孕性之性質，且該癒傷組織與實際上等價的癒傷組織亦包含於該範圍內。亦即，經再生之植物只要是維持有細胞質雄性不孕性，例如，來自寄存號碼特定為 FERM BP-11507 之洋桔梗屬植物之癒傷組織之突變體與基因轉殖物，以及維持有細胞質雄性不孕性，來自寄存號碼特定為 FERM BP-11506 之洋桔梗屬植物之突變體與基因轉殖物等之癒傷組織，亦包含於其範圍內。

與本發明相關之細胞質雄性不孕性洋桔梗具有下述特徵。

（1）由於製造雜種第一代交配品種時無需對種子親進行去雄，無需費工，可經濟地進行採種。

（2）與雄性可孕系進行交配時，由於後代具有雄性不孕性，可供給純度高之種子。

（3）藉由使該系與細胞核基因體相同之細胞質正常之維持系進行交配，可容易維持及增殖細胞質雄性不孕

系。

(4) 由於不會自交授粉，可抑制因授粉而造成的花朵老化，其結果可使花朵壽命延長。

(5) 由於不具有花粉，不會因花粉飛散而污損花瓣及衣服。

2. 細胞質雄性不孕洋桔梗之製造方法

與本發明有關之雄性不孕洋桔梗之製作方法，係使作為雌親之 *Eustoma* 屬植物之野生種，與作為雄親之 *Eustoma grandiflorum* (土耳其桔梗) 進行交配，再自該等雜交後代中選拔顯示有雄性不孕性之個體進行育成。顯示有雄性不孕性之個體，係選拔完全不存在雄蕊，或雄蕊的發育呈現不完全狀態之個體。進而，由於確認雄性不孕性係細胞質遺傳性質，使雄性可孕性之洋桔梗進行回交育種，確認後代植物顯示具有雄性不孕性。

3. 雜種第一代種子之製造方法

藉由使利用本發明所製造之細胞質雄性不孕洋桔梗，與具有優良性質之洋桔梗屬植物進行回交育種，其後代係可獲得具有細胞質雄性不孕性之優良系。該具有細胞質雄性不孕性之優良系，可使用為為了獲得雜種第一代種子 (F1 種子) 之種子親。

4. 花朵壽命試驗

與本發明相關之細胞質雄性不孕洋桔梗之花朵壽命之評價，可如下所述而實施。且本說明書中，「花朵壽命」係意指「已開花之花朵之維持」，因此，「花朵壽命長」係意指「自開花開始至開花終止的開花期間相對地為長」。洋桔梗的開花期間是否相對為長，係可針對一般的雄性可孕性洋桔梗，與細胞質雄性不孕性洋桔梗，藉由在相同環境條件下栽培複數個個體，進行比較評價而可判斷。

有關花朵壽命試驗之一例，針對評價切花後之花朵壽命之方法進行說明。該方法中，首先試驗材料係於經以相同條件栽培之洋桔梗中，分別準備適當數量之一的雄性可孕個體，與雄性不可孕個體。各洋桔梗於開花當日（可發現花瓣張開之日）幾乎同時間，以連接花梗之狀態進行採花，並調整花梗部分為一定的長度（例如 4~6cm）。其次，經調整之試驗材料，使莖部的斷面浸入水中狀態，並靜置於一定溫度（較佳係 18~22℃），一定濕度（較佳係 55~65%）且以 12 小時週期交替明暗之恆溫室內，觀察花朵的外觀。

「開花開始」係定義為花瓣張開時，另外，「開花終止」係由花瓣的外觀（花瓣的皺紋與枯萎）來判斷、決定，測定花朵的開花期間（自開花開始至開花終止的期間）。分別針對一般的雄性可孕個體與雄性不可孕個體，求得測得之開花期間的平均值並進行比較，可評價本發明之雄性不孕洋桔梗之花朵壽命。

5. 藉由分子標誌製作標識因子

比較利用本發明製造之細胞質雄性不孕洋桔梗系，與先前已知之洋桔梗屬植物之間之粒線體基因體之序列，藉由鑑定細胞質雄性不孕洋桔梗系具特異性之區域，可製作作為標識因子的分子標誌。分子標誌的檢測可遵循 PCR 法等，相關業者周知之方法進行。藉由使用分子標誌，利用本發明之細胞質雄性不孕洋桔梗系，不僅是型態上的特徵，亦可藉由分子生物學上的特徵，證明與先前已知之洋桔梗屬植物明確地為相異之系。

用作為了識別本發明之細胞質雄性不孕洋桔梗系之分子標誌，係可使用序列編號 1 以及序列編號 2 所示之鹼基序列。另外，對於序列編號 1 或序列編號 2 記載之鹼基序列中，具有 1 或數個鹼基經缺失、取代或附加之鹼基序列之洋桔梗系，只要是該鹼基序列可與序列編號 1 或序列編號 2 之鹼基序列同樣地被增幅、被檢出，可判定係與本發明之細胞質雄性不孕洋桔梗系為實際上相同之系。例如，用作為了識別細胞質雄性不孕洋桔梗系之分子標誌，可使用與序列編號 1 或序列編號 2 記載之鹼基序列，具有 80%，更佳為 90% 以上，最佳為 95% 以上之相同性之鹼基序列。

6. 細胞質雄性不孕性洋桔梗系之癒傷組織之誘導、增殖以及再分化

利用本發明製造之細胞質雄性不孕洋桔梗系，可藉由組織培養法進行無性繁殖。例如，藉由非專利文件 4 所揭示之對癒傷組織進行誘導、再分化之方法，可進行無性繁殖。

具體而言，藉由對經於溫室內育成之細胞質雄性不孕性洋桔梗系之葉片，進行表面殺菌，並置床於癒傷組織誘導培養基上進行培養，可誘導癒傷組織。之後，藉由將形成之癒傷組織移至再分化培養基進行培養，可誘導根組織。接著，將形成之根組織移往發根培養基，可誘導發根並使植物體再生。爲了進行癒傷組織之誘導、增殖以及再分化之培養條件，若爲相關業者，可遵循周知之技術適當地設定。

本說明書中所明示引用之全部的專利以及參考文獻之內容，係全部作爲參照而包含於本說明書中。另外，本申請案具有主張優先權之基礎之申請案，即日本專利申請 2012-213296 號（於 2012 年 9 月 27 日提出申請）之說明書以及圖面所記載之內容，係全部作爲參照而包含於本說明書中。

[實施例]

藉由下述實施例具體說明本發明，但本發明未因該等實施例而有任何限制。

實施例 1 製作具有新穎的雄性不孕性之洋桔梗個體

本發明之具有雄性不孕性之洋桔梗，係自美利堅合眾國導入之未特定種名之野生的 *Eustoma* 屬植物，與土耳其桔梗（*Eustoma grandiflorum*）之雜種進行選拔，於股份有限公司坂田種子之三鄉試驗場中進行製作。

本發明之洋桔梗個體之育成過程

先前，股份有限公司坂田種子使保有之未特定種名之野生的 *Eustoma* 屬植物之 10 數個系，與同樣是股份有限公司坂田種子保有之來自相異親系（*E. grandiflorum*）之間，製作了合計約 60 組之雜種並獲得 F1 種子。播種該等 F1 種子，確認表現型後，自 F1 群體選拔適當的 2、3 個個體，獲得該等進行群體交配後產生之後代（以下稱作「F2 世代」）種子。

播種該 F2 世代種子，栽培約 50 至 100 個個體，確認 F2 群體所含有的表現性質。其結果，可自幾乎全部的 F2 群體發現花徑的大小、花色與花型、早晚性之分離，但其中，來自將股份有限公司坂田種子保有之未特定種名之野生的 *Eustoma* 屬植物之內 E-1 作為雌親，與以親系之內 G-1（*E. grandiflorum*）作為雄親進行交配後之 F1 種子（以下記作組 A）之 F2 群體中，未預期地，出現了數個顯示至今 *Eustoma* 屬植物所未知之雄性不孕性質之個體。自其中選拔 1 個個體，與以股份有限公司坂田種子保有之親系 4 系之 G-2、G-3、G-4、G-5 作為花粉親進行交配後獲得後代種子（F2BC1 世代，記作組 B、C、D、E）。且針對世代之表記，為了避免混亂，以 *E. grandiflorum* 與

CMS 系進行回交育種之次數為標準，而記作 BC1、BC2、．．．．。

播種該等之後代種子（F2BC1），確認各系 12 個體之性質後，所有的系以及個體中，均顯示未存在雄蕊，或呈現雄蕊的發育為不完全的狀態之雄性不孕性質。選拔來自組 C 之 F2BC1 世代之 4 個體（以下記作 ms-1）、組 D 之 F2BC1 世代之 2 個體（以下記作 ms-2）、組 E 之 F2BC1 世代之 3 個體（以下記作 ms-3）、以及 4 個體（以下記作 ms-4），並使 ms-1 與親系 G-3 以及親系 G-6 作為花粉親、ms-2 與親系 G-4 以及親系 G-7 作為花粉親、ms-3 與親系 G-5 以及親系 G-8 作為花粉親、ms-4 與親系 G-5 以及親系 G-9 作為花粉親進行交配，獲得個別的後代種子（F2BC2 世代）。

播種後代種子（F2BC2 世代），確認後代的表現性質後，發現 ms-1 與 G-3 以及 G-6 交配後之系之後代群體中有一部分，雄蕊的發育為不完全的狀態之雄性不孕個體，其以外之組合顯示完全沒有雄蕊之雄性不孕性質。使該等雄性不孕個體，與約 100 系之親系進行交配，獲得後代種子（F2BC3 世代）。

播種後代種子（F2BC3 世代），調查後代之表現性質後，可確認雄性不孕性質。自該結果，由於可證實已成功製作出顯示有安定的母系遺傳之細胞質雄性不孕系，將該細胞質命名為 SSE-CMS 細胞質。且，顯示有安定的細胞質雄性不孕之上述 F2BC1 種子，於 2012 年 7 月 20 日寄

存於獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利生物寄存中心（茨城縣筑波市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）進行國際寄存（為識別寄存者之標示為 08P-81S，寄存編號為 FERM BP-11506）。

實施例 2 確認雄性不孕性之再現性

為了確認雄性不孕性質可安定地出現，以前述之 *Eustoma* 屬植物 E-1 作為雌親，親系 G-10（*E. grandiflorum*）作為雄親進行交配，並採種 F1 種子（以下記作組 F）。播種前述之組 A 以及組 F，分別選拔 6 個個體，進行群體交配後，獲得來自組 A 個體之 56 莢為 0.22g，來自組 F 個體之 59 莢為 0.47g 收量之 F2 世代種子。分別播種該 F2 世代種子，調查雄性不孕性個體之出現率後，發現來自組 A 之 F2 世代 92 個體中有 19 個個體，來自組 F 之 F2 世代 88 個體中有 14 個個體，顯示具有雄性不孕性質。

自以上結果，顯示雄性不孕性質可安定地出現。

實施例 3 具有雄性不孕性洋桔梗品種之花朵壽命試驗

實施雄性不孕系與可孕系之花朵壽命試驗。

（1）試驗材料

用作實驗材料之洋桔梗，係使用一般之雄性可孕洋桔梗之 F1 個體與細胞質雄性不孕洋桔梗之 F1 個體此 2 種

類。針對前述 2 種洋桔梗，自洋桔梗栽培園圃對認為是當日已開花之洋桔梗花朵，以連接花梗之狀態進行採花，並調整花梗部分的長度為 4 cm。預測雄性可孕洋桔梗可運送花粉，將花粉強制授粉於柱頭。另外，將對細胞質雄性不孕洋桔梗，以雄性可孕系之花粉強制授粉後之個體，與未使其授粉之個體分別供於試驗所用。

（2）試驗方法

花朵壽命試驗係將試驗材料插入裝滿自來水的試驗管中，以溫度 20℃，濕度 60%（±5%），以及一般的螢光燈（晝白色快速點燈式 40W），以開啓、關閉為 12 小時週期交替之恆溫室內進行試驗。且因於試驗中，並未特別發現水有污染等，而未進行水的更換。

（3）評價、判定

「開花開始」係定義為花瓣張開時，另外，「開花終止」係由花瓣的外觀由育種之技術者觀察花瓣的皺紋與枯萎進行判斷、決定。

（4）試驗結果

將對細胞質雄性不孕洋桔梗以可孕系之花粉強制授粉後，與雄性可孕之洋桔梗進行比較，發現花朵壽命幾乎無差異。因此，證明了所使用系之遺傳背景不會對花朵壽命造成影響。另外，由於細胞質雄性不孕之洋桔梗不會產出

花粉，亦判明花朵壽命性較雄性可孕系平均多出 7 天（表 1）。

[表 1]

表 1 花朵壽命試驗

材料	處理法	開花終了個體數							
		4 日後	5 日後	6 日後	7 日後	8 日後	9 日後	10 日後	11 日後
雄性可孕系	強制授粉	12	17	15	9	5	2	1	
雄性不孕系	以來自可孕系 花粉強制授粉	3	11	14	10	11	8	3	
雄性不孕系	自然狀態				3	3	4	6	7

材料	處理法	開花終了個體數							調查總 個體數	平均開 花終止 日數
		12 日後	13 日後	14 日後	15 日後	16 日後	17 日後	18 日後		
雄性可孕系	強制授粉								61	5.8
雄性不孕系	以來自可孕系 花粉強制授粉								60	6.9
雄性不孕系	自然狀態	6	8	5	5	2	4	7	60	12.8

實施例 4 製作爲了識別 SSE-CMS 洋桔梗系之標誌（marker）

利用本發明所製造之 SSE-CMS 洋桔梗系，顯示具有先前之栽培種與野生種所不存在之表現型特性。另一方面，爲了自分子生物學上之側面觀點，證明其係與先前已知之洋桔梗屬植物爲相異之系，決定製作爲了識別 SSE-CMS 洋桔梗系之分子標誌（marker）。

使用記載於非專利文件 5 之粒線體之共通引子，以

SSE-CMS 洋桔梗系與既存之洋桔梗系為模板，實施 PCR 分析後，發現了經增幅之 DNA 片段大小相異之標誌（marker）。自該顯示多型之標誌中，選擇 nad4L/orf25 以及 nad7/4-5 此 2 種，解析增幅片段之鹼基序列後，鑑定出 SSE-CMS 洋桔梗系具特異性之區域。由於以該等區域作為標識因子，設計如表 2 所述之引子，實施 PCR 分析（熱變性反應 94℃，1 分鐘；緩冷配對反應 65℃，1 分鐘；延長反應 72℃，1 分鐘，重複 30 個循環）後，成功製作出僅使 SSE-CMS 洋桔梗系之 DNA 片段增幅之 2 種分子標誌（marker），“Marker 1”以及“Marker 2”。Marker 1 使用引子 orf25-F 以及 orf25-R，係使序列編號 1 記載之 323bp 之 DNA 片段增幅之標誌（marker）（圖 3）。Marker 2 使用引子 nad7-F 以及 nad7-R，係使序列編號 2 記載之 492bp 之 DNA 片段增幅之標誌（marker）（圖 3）。

使用利用上述方法製作之標誌（marker），以股份有限公司坂田種子所育成之既存的洋桔梗系（*E. grandiflorum*）190 系，以及股份有限公司坂田種子保有之洋桔梗屬野生種 34 系作為模板，實施 PCR 試驗後，保有該等 2 種鹼基序列之系，確認不存在於 SSE-CMS 洋桔梗系以外。該試驗結果之一部分示於圖 2。圖 2（A）～（C）係以下述條件進行實驗。

（A）Marker 1：SSE-CMS 洋桔梗系具特異性之標誌

(marker)

使用引子 orf25-F 以及 orf25-R，進行 PCR 反應（熱變性反應 94℃，1 分鐘；緩冷配對反應 65℃，1 分鐘；延長反應 72℃，1 分鐘，重複 30 個循環），使序列編號 1 所示之鹼基序列（323bp）增幅。

(B) Marker 2：SSE-CMS 洋桔梗系具特異性之標誌
(marker)

使用引子 nad7-F 以及 nad7-R，進行 PCR 反應（熱變性反應 94℃，1 分鐘；緩冷配對反應 65℃，1 分鐘；延長反應 72℃，1 分鐘，重複 30 個循環），使序列編號 2 所示之鹼基序列（492bp）增幅。

(C) nad5 / 4-5：全部洋桔梗屬植物共通之標誌
(marker)

使用引子 nad5 / 4 以及 nad5 / 5，進行 PCR 反應（熱變性反應 94℃，1 分鐘；緩冷配對反應 60℃，1 分鐘；延長反應 72℃，1 分鐘，重複 30 個循環），使來自全部系之約 1.5kb 之 DNA 片段增幅。

亦即，可明確得知利用本發明所製造之 SSE-CMS 洋桔梗系，與先前已知之洋桔梗屬植物為相異之系。

[表 2]

表 2 本發明所使用之引子及其鹼基序列

標記名稱	引子名稱	鹼基序列 (5'→3')
nad4L/orf25	orf25 (序列編號 7)	CTGTYTTTTTCGCACTTAGGC
	nad4L (序列編號 8)	GTCCGRGGTACTATTGCTGT
nad7/4-5	nad7/4 (序列編號 9)	TGTCCTCCATCACGATVTCG
	nad7/5 (序列編號 10)	CCAAATTCTCCTTTAGGTGC
Marker1 (序列編號 1)	orf25-F (序列編號 3)	CTACTGAATCCAAGCGAGTGG
	orf25-R (序列編號 4)	TAGGTAGAGCTGGGCGAGAA
Marker2 (序列編號 2)	nad7-F (序列編號 5)	AACCACTAACACCTTCCTCGT
	nad7-R (序列編號 6)	GCTCTATCTACGTATCTTGAAGTTTC
nad5/4-5	nad5/4 (序列編號 11)	CCAATTTTTGGGCCAATTCC
	nad5/5 (序列編號 12)	CATTGCAAAGGCATAATGAT

實施例 5 SSE-CMS 洋桔梗系之癒傷組織之誘導、增殖以及再分化

爲了使利用本發明製造之 SSE-CMS 洋桔梗系，藉由組織培養法進行無性繁殖，採取經於溫室內育成之 SSE-CMS 洋桔梗系之葉片。以 1% 次氯酸鈉溶液對葉片進行 10 分鐘之表面殺菌，再以滅菌水進行洗滌。將經滅菌之葉片置床於經添加 1.5mg/l NAA 之 MS 培養基上誘導癒傷組織。將癒傷組織移至經添加 0.5mg/l GA3、1.5mg/l BA 之 B5 培養基，誘導根組織。將形成之根組織移往未含有植物荷爾蒙之 B5 培養基，使其發根，使植物體再生，確認具有雄性不孕。

依據上述方法製作之癒傷組織，於 2012 年 7 月 26 日寄存於獨立行政法人製品評價技術基盤機構專利生物寄存中心（茨城縣筑波市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）進行國際寄存（爲識別寄存者之標示爲 12S-134C，寄存編號爲

FERM BP-11507) 。

[產業上之可利用性]

藉由利用本發明提供之具有新穎的細胞質雄性不孕性洋桔梗，可育成具有優異的採種性、花朵壽命性、鑑賞性之洋桔梗與其 F1 品種，可進行其高品質種子之採種。

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

1. 食品工業發展研究所 2013/11/12 ; BCRC 960473

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

1. 日本 ；獨立行政法人製品評價技術基盤機構特許生物寄託中心 ；2012/07/26 ; FERM BP-11507

序列表

<110> 莎卡達種子股份有限公司
<120> 細胞質雄性不孕洋桔梗(Eus toma)及製造方法

<130> PS38-9001W0

<150> JP2012-213296
<151> 2012-09-27

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 323
<212> DNA
<213> Unknown

<220>
<223> 標記 1

<400> 1	
ctactgaatc caagcgagtg gaatacttgg agcgagcgag gagcgagtgga aatacttggga	60
gcgagcgagg agcgagtggga atacttggag cgagcgagga gcgagtggaa tacttggagc	120
gagcgaggag cgagtgggaat gaacgaaaaa cctaagaaaa tcaacttcaa tcagttagct	180
agatgagaaa ggagactgaa gaaactgaaa gagtagtagg aggatgaaaa aggaagcaag	240
tggagtagga gcgaacgtgg gagtaggaaa cccgcttcct ttcttaccct aaacccactt	300
ccitttctcgc ccagctctac cta	323

<210> 2
<211> 492
<212> DNA
<213> Unknown

<220>
<223> 標記 2

<400> 2	
aaccactaac accttctcgc ttgggggtcc gtgcactggg aaaacgctaa cgcgacgttt	60
ttaactagag ttacaaagct ccaataaggt atcgagaggg ctatcatcga gaggaagcga	120
gttccatact tgaaacgagc atgggagcga gcggagtact ttcagcgagc ctaaaaagcg	180
agttccatac tcccatgttc gctccaggtg ttccgctcac ttggaacgaa aaacctaaaga	240
aaatcaactt caatcagtga gctagatgag aaaggagact gaatcaacat caagagtagt	300
aggtttgaga ggatgagaag gtaaccgaag aaaagaaaaa aaatcagtga gctagatgag	360
aattagggaaa agagacttga tcttattcaa tcagttagatgaa gaaaggagca agtgagaaat	420
caacataaat cgaagtagag tgagctagat gagaaaggag actgaagaaa cttcaagata	480
cgtagataga gc	492

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 引子

<400> 3

ctactgaatc caagcgagtg g	21
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 引子	
<400> 4	
taggtagagc tgggcgagaa	20
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 引子	
<400> 5	
aaccactaac accttcctcg t	21
<210> 6	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 引子	
<400> 6	
gctctatcta cgtatcttga agtttc	26
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 引子	
<400> 7	
ctgtyttttc gcacttaggc	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 引子	
<400> 8	
gtccgrggta ctattgctgt	20
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 引子	
<400> 9	
tgctctccat cacgatvtcg	20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 引子

<400> 10
ccaaattctc ctttaggtgc 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 引子

<400> 11
ccaatttttg ggccaattcc 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 引子

<400> 12
cattgcaaag gcataatgat 20

I659689

發明摘要

※申請案號：102134778

※申請日：102 年 09 月 26 日

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

細胞質雄性不孕洋桔梗 (Eustoma) 及其製造方法

【中文】

本發明係有關具有細胞質雄性不孕性之新穎的洋桔梗 (Eustoma)，以及其育種方法。進而詳細係有關由於雄蕊或花粉之形成不充分，特徵為缺失實質上的授粉功能，具有新穎的細胞質雄性不孕性之洋桔梗及其育種方法。

【英文】

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

申請專利範圍

1. 一種洋桔梗（*Eustoma*）屬植物之製作方法，其係將細胞質中含有序列編號 1 或序列編號 2 記載之鹼基序列之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物，與具有有用性質之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物，藉由反復回交育種（*Continuously backcrossed*），使其具有前述之有用性質且使其表現細胞質雄性不孕性。

2. 一種洋桔梗（*Eustoma*）屬植物之製作方法，其係將自寄存號碼特定為 BCRC 960473，且具有細胞質雄性不孕性之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物之癒傷組織，利用誘導、組織培養進行無性繁殖之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物或其後代，與具有有用性質之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物，藉由反復回交育種，使其具有前述之有用性質且使其表現細胞質雄性不孕性。

3. 如請求項 1 或 2 之製作方法，其中具有有用性質之洋桔梗（*Eustoma*）屬植物係來自土耳其桔梗（*E. grandiflorum*）。

4. 一種使用 *Eustoma* 屬植物或其後代於製造具有有用性質且表現細胞質雄性不孕性的 *Eustoma* 屬植物之用途，其特徵為 *Eustoma* 屬植物或其後代為具有細胞質雄性不孕且具有於序列號碼 1 或序列號碼 2 所記載的鹼基序列，*Eustoma* 屬植物或其後代係藉由具有有用性質的 *Eustoma* 屬植物之種子親（*Seed parent*）進行反復回交育種者。

5. 一種使用 *Eustoma* 屬植物或其後代於製造具有有用性質且表現細胞質雄性不孕性的 *Eustoma* 屬植物之用途，其特徵為 *Eustoma* 屬植物或其後代為係由具有以寄存號碼 BCRC 960473 所特定的細胞質雄性不孕性之 *Eustoma* 屬植物的癒傷組織所誘導而藉由組織培養進行無性繁殖，藉由具有有用性質的 *Eustoma* 屬植物之種子親進行反復回交育種。

6. 如請求項 4 或 5 之用途，其中具有有用性質的 *Eustoma* 屬植物係來自 *E. grandiflorum* 者。

7. 一種使用種子親於製造雜種第一代種子的用途，其特徵為該種子親為具有序列號碼 1 或 2 所記載的鹼基序列且具有細胞質雄性不孕性之 *Eustoma* 屬植物或其後代者。

8. 一種使用種子親於製造雜種第一代種子的用途，其特徵為該種子親係由具有以寄存號碼 BCRC 960473 所特定的細胞質雄性不孕性之 *Eustoma* 屬植物的癒傷組織所誘導而藉由組織培養進行無性繁殖的 *Eustoma* 屬植物或其後代者。

9. 如請求項 7 或 8 之用途，其中具有有用性質之 *Eustoma* 屬植物為來自 *E. grandiflorum* 者。