

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

美 國(地區) 申請專利，申請日期：1997.7.15 案號：08/892,735，☐有 ☐無主張優先權

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

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

技術領域

本發明關於植物遺傳工程之一般範疇，特別係關於藉由以花粉為主之土壤桿菌轉形作用，而將外源遺傳物質轉形入植物品系之種系中。

發明背景

使用重組型土壤桿菌轉形經培養植物細胞，隨後使經轉形細胞再生為完全植株之作用，已成為用以產生轉移基因植物的標準方法。已發展出各種使用土壤桿菌載體之方法，且於該項技藝中為已知，其包括揭示於美國專利第4,940,838號（席普羅特(Schilperoort)等人，1990年7月10日）之二分質體系統，及揭示於美國專利第4,693,976號（席普羅特等人，1987年9月15日）之所謂共整合質體系統。最近之方法係利用減毒之土壤桿菌，亦即，已將腫瘤誘發功能缺失或去活化之土壤桿菌，如此轉形作用不會造成腫瘤成長，而是使能再生成為正常植株之，正常癒傷組織進行生長。

如同大多數其他轉形技術，土壤桿菌之使用實有其缺點。為獲得經均一轉形（亦即，於每一細胞中皆有異源DNA存在）之植物，必需將個別細胞轉形，並從其再生成為體細胞純株。某些植物品種之細胞並不易於組織培養中獲得，且不容易被再生成為體細胞純株。一項業經研究以消除此等障礙之技術，係使用花粉作為載體。藉由轉形花粉，然後使用該轉移基因花粉使接受植物受精，可製得含有該異源DNA之轉移基因種子。該轉移基因種子可經萌

五、發明說明(2)

發，而自然產生一種轉移基因植物。

術語“轉移基因花粉”或“經轉形花粉”與本發明連用時，係定義為能夠於花粉或已萌發花粉內，或於與花粉管相連結之土壤桿菌內，將DNA遞送至卵子之經土壤桿菌處理的花粉或已萌發花粉。雖無意受限於任何理論，至少有兩種藉其而使，根據本發明之經處理已萌發花粉（亦即，用於下文之術語“轉移基因花粉”或“經轉形花粉”），能夠將異源DNA遞送至植物卵子的可能機制。一種可能機制涉及將異源DNA導入花粉生殖細胞本身中，然後於受粉時將異源DNA與內源DNA一起，沿著花粉管向下帶至卵子。另一種可能機制涉及，土壤桿菌附著至伸長中之花粉管上，藉此將該細菌經由花粉管帶至卵子，而於該處發生卵子之轉形或受精卵發育。由於存在數種可能機制，故有必要對前述之術語“轉移基因花粉”或“經轉形花粉”做確切的定義。

然而，使用花粉作為載體並非全無問題。為有效果且有效率地獲得轉移基因花粉，首先必需使花粉粒萌發。於以土壤桿菌為主之系統中，此為使異源DNA從細菌轉移至花粉生殖細胞，或使細菌有效附著至生長中之花粉管上所需要的。由於時間變數，此使供花粉萌發及花粉管生長之活體外系統成為必要條件。萌發中花粉及花粉管之培養，業已經證實確具有困難，因為花粉粒易於培養基中破裂，而導致其DNA釋出與分解。花粉存活率已相當低，後續之植物轉形作用效率亦差。有些花粉類型（所謂之“乾燥”或

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(3)

“乾燥柱頭”花粉，例如棉花粉）因對水份過於敏感，以致使獲得花粉萌發，及持續花粉管生長之努力失敗。因此，已證實難以有效於活體外培養及獲得，供使作為用以製造轉移基因植物之載體的經轉形花粉。美國專利第5,066,594號（迪邦特(DeBonte)等人，1991年11月19日）含有對活體外花粉萌發方法，與以花粉為主之植物轉形方法的回顧，以及其使用上所面臨之困難。迪邦特等人指出，該技藝中之一般看法為，以鈣、硼與成滲透壓物質（通常為蔗糖），作為萌發培養基的重要成分，以獲得花粉萌發。第2欄，第10-22行。迪邦特等人亦指示，已發現於不含瓊脂之花粉萌發培養基中，發生花粉壁溶解。第2欄，第44-49行。經發現含有鈣、硼、離胺酸、麩胺酸與蔗糖之培養基，對已於開花後經儲存12小時之花粉，可給予相當之萌發率，但是經證實花粉粒之穩定性差，且容易於萌發培養基上隨時間增加而破裂。第2欄，第50-63行。

應注意，迪邦特之論述專限於溼柱頭花粉之萌發，以及使用液體或半液體萌發培養基。

迪邦特提出一種，用於與水性萌發培養基結合之水性“安定化溶液”，以使能將萌發中之花粉保持於培養物中，達一段足以被土壤桿菌轉形之時間。一旦萌發後，即將花粉轉移至安定化溶液中，並與土壤桿菌載體進行培育，以完成花粉之轉形作用。迪邦特並未證實，此方法對轉形中花粉確實有效，亦未證實該花粉經過此處理後，仍能夠使接受植物受精。

五、發明說明(4)

其他為轉形花粉所提出之方法包括，微粒子轟擊（美國專利第5,100,792號；美國專利第5,120,657號）、顯微注射（美國專利第4,743,548號）及電穿透作用（美國專利第5,629,183號）。第一者需要精巧且昂貴之設備，而第二者需要巧妙地對個別花粉粒進行操作。任一方法皆未顯示可有效用於產生，能夠使接受植物受精之存活轉移基因花粉。第三者雖然有效率，但是又需要精巧且昂貴之設備、經高度教育及訓練之人員，而且花粉必須暴露於含水條件下；於正常情況中其對乾燥柱頭花粉而言為致死環境。

仍有需要一種供活體外萌發且獲得轉移基因花粉，尤其是乾燥柱頭花粉之簡單、有效的方法，亦即一種有效率且能容易使接受植物以該轉移基因花粉受精的方法。

發明概要

本發明關於一種供遺傳轉形植物之方法，其包含下列步驟：製造能夠於活體外誘發並支持花粉管生長之培養基，且伴隨添加土壤桿菌亦增進花粉管生長；將一菌落增進花粉管生長之土壤桿菌，放置於萌發培養基之表面上；將花粉與土壤桿菌培育於受控溫度及濕度環境中，以使花粉萌發，並接著產生轉移基因花粉；將轉移基因花粉轉移至接受植物（較佳為去雄植物）之柱頭上，以完成接受植物之受粉；自己受粉之植物採收得轉移基因種子；以任何供確定已發生轉形作用之標準篩選試劑系統，自己萌發轉移基因種子篩選出幼苗；進一步使幼苗生長而製得成熟之具生育力轉移基因植物。本發明之方法提供較先前技藝方法優

五、發明說明(5)

之花粉萌發及植物轉形，且係簡單又具經濟效益的。本發明具有用以萌發乾燥柱頭花粉，及產生轉移基因乾燥柱頭花粉之實用性。本發明亦具有毋需進行活體外植物組織培養，且毋需從經培養植物細胞再生體細胞純株之優點。

圖示概述

圖 1 列示，所使用作為本發明測試質體之質體 pBin19GmBar。

發明詳述

本發明關於供製造轉移基因植物之有效率方法，其係使用花粉為主之土壤桿菌轉形系統。相對於較早欲使用花粉作為轉形載體之嘗試，本發明提供一種活體外，於固體生長培養基上萌發及維持花粉（特別是乾燥柱頭花粉），而不會使花粉溶解之方法，如此可在與土壤桿菌共培養時，有效率地製造轉移基因花粉。轉移基因花粉提供轉形植物種系，而毋需使用植物細胞培養及，全株植物之體細胞再生的有效方法。因此，本發明提供一種轉形各種不易受轉形，或其體細胞再生現今仍為未知或不可能進行之植物的方法。

本發明所使用之萌發培養基為包含瓊脂糖、蔗糖、 KNO_3 、 MnSO_4 、 H_3BO_3 、 MgSO_4 及赤黴酸之固體培養基。雖然花粉萌發仍被以麥芽糖或葡萄糖，取代作為成滲透壓物質所支持，但於所測試糖類結果中，受持養之棉花粉管需要蔗糖存在。萌發百分比亦於含有蔗糖之培養基中增加，超過以麥芽糖、葡萄糖或果糖所觀察到者。較佳之培

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(6)

養基包含10%瓊脂糖、25%蔗糖、0.52 mM KNO₃、3.06 mM MnSO₄、1.66 mM H₃BO₃、0.42 mM MgSO₄·7H₂O及1.0 μM A₃赤黴酸。培養基之pH值應介於6.0至8.0之範圍中，較佳為約7.6。較佳地於高壓滅菌後，立即將培養基倒入培養皿中，加蓋並儲存於冰箱中直到使用。

此等培養基將支持，得自各種植物之花粉萌發與生長，且雖然其經設計特別用於乾燥柱頭植物（亦即棉花），仍會支持溼柱頭植物（菸草與大豆）之花粉萌發與花粉管生長。該培養基亦經發展，以與土壤桿菌協同作用之方式，增進花粉管生長，而其確切機制尚未被測定。

轉移基因花粉可使用任何以土壤桿菌為主之載體系統製得，包括美國專利第4,940,838號之二分載體系統，及美國專利第4,693,976號之共整合質體系統。

以使用減毒（非-腫瘤生成性）之土壤桿菌為較佳。較佳之載體系統為，美國專利第4,940,838號之二分載體系統。從許多揭示於先前技藝者中，篩選出適當載體系統及轉形方法，並將其使用於本發明中，為習於該項技藝人士所熟知。同樣，供活體外生長且維持土壤桿菌之方法，為該項技中所熟知，且習於該項技藝人士將不困難地，自可利用文獻中發現適宜之方法。

選擇欲藉由花粉且最終導入植物之異源基因序列，並不特別受本發明用途所限制，而該基因之選擇係受控於所欲授與轉移基因植物之特徵。可用於本發明之基因類型實例包括，授與除草劑抗性、昆蟲抗性、疾病抗性、經改變澱

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(7)

粉生產、經改變蛋白質生產、經改變脂肪酸生產、經改變胺基酸生產、經改變花朵顏色、經改變開花時間、乾旱抗性之基因、壓制內源基因功能之反有意義基因、或編碼以純化形式自植物分離之產物，例如藥劑或抗體的基因。本發明可使用任何可於植物中表現、能夠導入土壤桿菌中、且可自土壤桿菌轉移至，植物細胞中之基因構築物。較佳之構築物包括，一或多個能夠篩檢出轉形株之可篩選標記，其為經鍵聯至編碼序列之土壤桿菌或植物，及植物-活性啟動子。此類構築物為該項技藝所熟知。供組合此類構築物並將其導入土壤桿菌之方式，並非本發明之一部分，且為習於該項技藝人士所熟知。

植物嵌合型基因與土壤桿菌載體構築物，係參見於美國專利第 5,352,605、5,149,645、5,034,322、5,068,193 及 4,762,785 號。

供用於本發明之花粉係從花藥，較佳係從剛裂開之花藥上，藉由搖晃托住之花朵或，藉由任何其他不傷害花粉粒之方式收集得。較佳於使用前始將花粉收集。一旦收集得後，將花粉置於固體萌發培養基上，並使其萌發。較佳地，在塗覆花粉之前，最佳係於立即欲塗覆花粉之前，先將一菌落具有所希望異源性基因序列之土壤桿菌，塗覆於該培養基表面上。已發現土壤桿菌之存在，會增進花粉萌發及生長。較佳係將花粉以薄層方式，例如藉由溫和搖晃平盤，並將過量花粉倒出而均勻塗遍培養基表面。花粉之萌發較佳係於受控溫度及濕度環境中完成，其溫度介於 24

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(8)

至28℃之間，而濕度較佳介於約50%至100%之間，最佳係於80%下。用於將濕度控至在80%之方便方法，係將培養基平盤置於一層飽和硫酸銨上，使其進行萌發。萌發作用及花粉管生長，正常係於約3-4小時內發生，伴隨著少量或無花粉粒與花粉管溶解。一項較佳具體實施例係使用以乾燥柱頭花粉，最佳係以棉花粉執行之本發明。一旦花粉管已經萌發，且業經與土壤桿菌培育一段足以使該細菌附著，或使DNA轉移之時間（正常為3-4小時）後，可將受處理之花粉用於使接受植物（為相同品種之植物，或為能夠與花粉供者植物雜交之品種）受粉。

此可藉由簡單將萌發平盤之表面與，受者花朵之柱頭接觸而完成。於一項較佳具體實施例中，該受者花朵為雄性不孕或經去雄的。使用為雄性不孕或經去雄的花朵，可防止自花受粉，並可減低被得自其他植物未經轉形花粉受粉之可能性。較佳用於將棉花花朵去雄之方法，係將全開之花朵充滿水，以使花藥與柱頭達飽和。藉由使花藥與柱頭以水保持飽和達一段時間，較佳為30秒至30分鐘，而將存在花朵中之花粉，甚至萌發中花粉破裂並被毀壞。一旦已完成花粉破壞後，便將水從該花中抽乾，並將該花朵立即用於受粉。較佳地將去雄花之柱頭藉由某方式覆蓋直到立即用於受粉為止，以避免發生意外的交叉-受粉。最佳地，此程序係於午後中段（約2:30）以前完成，因為於此時段將花朵去雄，並未顯示播種數目有顯著減少。已顯示使用此技術時，棉花花朵之去雄作用效率達95%至100%。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(9)

一旦使接受植物經受處理花粉受粉後，較佳地進一步採行防止其他意外交叉-受粉的步驟。此可包括將植物分離（例如置於溫室中），將柱頭加蓋或將整株花朵覆蓋，以防止經昆蟲或風攜帶之非-轉移基因花粉進入。可使已受粉之植物正常生長及進行播種。經此製得之種子，可稱為經認定之轉移基因種子，因為其總族群係由個別，於其基因組中含有經導入花粉之，異源DNA的種子所組成。經認定之轉移基因種子，將會萌芽並長成經認之定轉移基因植物。因此，可見本發明在於使能構製造經認定之轉移基因植物，而毋需使用植物細胞培養及體細胞純株再生作用。經認定之轉移基因植物族群，可於種子、萌芽中種子、幼苗或成熟植株時，使用任何標準可挑選或可篩選標記，例如卡那黴素抗性，或指示劑蛋白質（例如水母素或螢光素），或藉由使用存在於經由土壤桿菌-處理花粉所導入之基因構築物中，作為可挑選標記的除草劑、除草劑抗性基因，進行篩檢而分離出真正之轉移基因個別植株。篩檢選轉移基因植株，可自動挑選出穩定之轉形株（具有經穩定整合至其染色體中之異源DNA的植株），因為只有經穩定轉形之植株已保存該經導入之序列，而使其能於篩選中存活。

圖示詳述

圖1代表所使用作為本發明測試質體之質體pBin19GmBar。該質體係藉由將嵌合型35S-*bar*基因插入質體pBin19（貝文(Bevan)，“以分離根癌土壤桿菌Ti-質體

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (10)

之 Vir-與 T-區域為主之二分植物載體策略”，自然，303:179-180 (1983)；ATCC 37327) 中而構築得。該質體於序列中含有 T-DNA 右邊界序列，經鍵聯至 NPTII 編碼序列之 NOS 啟動子，經鍵聯至 Bar 編碼序列之 CaMV 35S 啟動子，接著 35S 聚腺苷酸化序列，及最後經以反有意義方向插入作為可挑選標記之慶大黴素基因，再藉著 T-DNA 左邊界序列。

實施例 1：花粉萌發培養基

製備得用於支持花粉萌發之固體培養基，其含有 10% 瓊脂糖、25% 蔗糖、0.52 mM KNO₃、3.06 mM MnSO₄、1.66 mM H₃BO₃、0.42 mM MgSO₄·7H₂O 及 1.0 μM A₃ 赤黴酸。將最終之 pH 值調整至為 7.6。地於高壓滅菌後，立即將培養基倒入 35 毫米×10 毫米之培養皿中，以石蠟紙密封並儲存於冰箱中直到使用。

實施例 2：轉移基因根癌土壤桿菌

將根癌土壤桿菌株 EHA 101 以含有嵌合型 35S-*bar* 基因之“測試者質體” pBin19Gm*bar* (含有細菌慶大黴素抗性標記之 pBin19) 轉形。此質體列示於圖 1 中。藉由將得自 pAHC25 (克里汀森 (Cristensen) 等人 1992) 之 *bar* 編碼序列 (編碼酵素磷絲菌素乙醯基轉移酶) 插入立即接於雙重 35S 啟動下游，及 35S 終結子序列上游之 pRTL2 (古普托 (Gupta) 等人 1993) 多選殖部位中，得 pRTL2*bar* 而構築得嵌合型 35S-*bar* 基因。將嵌合型 35S-*bar* 基因自 pRTL2*bar* 分離出呈 HindIII 片段，並選殖入 pBin 19Gm 之多

五、發明說明 (12)

率 > 75%。觀察到少量或無花粉管溶解。若濕度為 100%，則導致花粉管溶解，而濕度低於 60%，則減低花粉萌發。

業經以得自菸草與大豆之花粉重複該方法，亦獲得實質上相同之存活率、萌發頻率及管生長動力學。

實施例 4：轉移基因植物之受粉及製造

將棉花花朵充滿足以蓋過柱頭與花藥之水而進行去雄。經 30 秒後，將水移除出，並將柱頭以塑膠真空管蓋住，防止受精直到所希望之時間為止。經發現，此程序藉由造成花粉（及萌發中之花粉管）破裂，並藉此防止自花-受粉，而使棉花花朵去雄作用效率達 95% 至 100%。將經此去雄之花朵藉由簡單將柱頭去蓋，將柱頭表面以 Kimwipe 紙巾乾燥，以及將乾燥柱頭與花粉萌發平盤之表面接觸，而與實施例 3 之萌發中、經處理的花粉進行受粉。

將已受粉之植物置於溫室中，於水耕條件下生長於陶盆中，並使其進行播種。將從此等植物獲得之種子經軋棉籽、脫棉絨及熱水處理，以增進萌芽。將種子種植於含有 Sunshine #3（特別之細緻盆栽混合物）（Sun Gro 園藝公司，加拿大）之陶盆中生長兩星期，之後進行幼苗篩檢。藉由以 1/2 至 3/4 推薦劑量之白明膠（葡果亞硫酸鈉）除草劑噴灑種苗，而篩檢出轉形株。此方法經發現，對於鑑定可表現經導入嵌合型基因之轉移基因植株達 100% 有效，且經指示出轉形率幾近於，每 3,000 個受分析種子即出現 1 個轉形株。

五、發明說明 (13)

參考文獻

克里汀森 (Cristensen), A.H., (Sharrock), R.A., (Quail), P.H. 1992。玉米聚遍在蛋白基因：結構、表現與轉錄物剪接之熱微擾及藉由電穿透轉移至原生質體後之啟動子活性。植物分子生物學 18:675-689。

米勒 (Miller), J. 1973。分子生物學實驗，冷泉港實驗室，紐約。

古普托 (Gupta), A.S., 海南 (Heinen), J.L., 哈勒迪 (Holaday), A.S., 布爾克 (Burke), 與 J.J. 艾倫 (Allen), R.D. 1993。於過量表現葉綠體 Cu/Zn 超氧化物歧化酶之轉移基因植物中增加對氧化壓力的抗性。Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1629-1633。

沃克皮屈 (Walkerpeach), C. 與 J. 威耳頓 (Velten) (1994)。經土壤桿菌介導之基因轉移至植物細胞：共整合及二分載體系統。於“植物分子生物學手冊”。S.B. 吉爾文 (Gelvin), R.A. 席普魯特 (Shiperoort), D.P.S. 威爾馬 (Verma) 編著。由克魯維學院出版社出版，多德勒克，荷蘭，B1 節；1-19 頁。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

錄

四、中文發明摘要(發明之名稱： 用固體培養基之花粉為主的轉形系統)

本發明揭示一種於土壤桿菌存在下支持花粉萌發及花粉管生長之培養基，該培養基包含瓊脂糖、蔗糖、 KNO_3 、 MnSO_4 、 H_3BO_3 、 MgSO_4 及赤黴酸。揭示一種藉由以花粉為主之土壤桿菌-所介導轉形作用，而供遺傳轉形植物及品系之方法。該方法包含自第一種植物獲得花粉、將一菌落土壤桿菌塗於固體花粉培養基上（該土壤桿菌包含至少一種能夠被轉移至植物細胞中之異源性基因序列）、將花粉塗覆於固體培養基上、使花粉於該培養基上萌發並生長（藉此該土壤桿菌附著至花粉管上，或其介導該異源性基因序列轉移至萌發中的花粉管中，而獲得轉移基因花粉）、將轉移基因花粉塗覆於能夠被第一種植物花粉受精之第二種植物的柱頭上、藉此使第二種植物受精、自第二種植物獲

英文發明摘要(發明之名稱： "POLLEN-BASED TRANSFORMATION SYSTEM USING SOLID MEDIA")

A medium is disclosed that supports pollen germination and pollen tube growth in the presence of Agrobacterium, the medium comprising agarose, sucrose, NO_3 , MnSO_4 , H_3BO_3 , MgSO_4 and gibberellic acid. A method is disclosed for the genetic transformation of plants and lines by a pollen-based Agrobacterium-mediated transformation. The method comprises the steps of obtaining pollen from a first plant, applying a lawn of Agrobacteria to a solid pollen culture medium, the Agrobacterium comprising at least one heterologous gene sequence capable of being transferred to a plant cell, applying the pollen to the solid medium, allowing the pollen to germinate and grow on the medium, whereby the Agrobacterium attaches to the pollen tube or mediates

四、中文發明摘要 (發明之名稱：)

得轉移基因種子、以及使該轉移基因種子萌發，而獲得轉移基因植物等步驟。該方法特別適用於所謂之“乾燥柱頭”花粉。

英文發明摘要 (發明之名稱：)

transfer of the heterologous gene sequence to the germinating pollen to obtain transgenic pollen, applying the transgenic pollen to the stigma of a second plant capable of being fertilized by the pollen of the first plant, thereby fertilizing the second plant, obtaining transgenic seed from the second plant and germinating the transgenic seed to obtain a transgenic plant. The method is particularly suited for use with so-called "dry stigma" pollen.

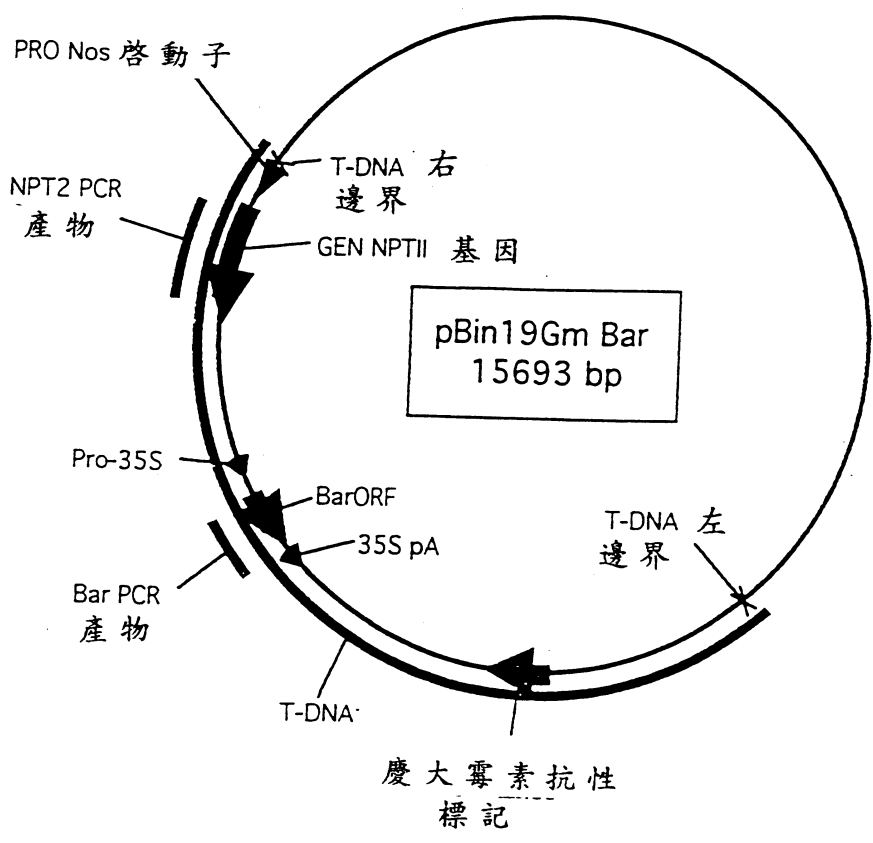


圖 1

88. 7. 27 修正
年 月 日 補充

申請日期	87. 7. 15.
案 號	87111505
類 別	C12N 15/82. 5/14

(本)

中文說明書修正本(88年7月)

公告本

(以上各欄由本局填註)

577922

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	用固體培養基之花粉為主的轉形系統
	英 文	"POLLEN-BASED TRANSFORMATION SYSTEM USING SOLID MEDIA"
二、發明 創作人	姓 名	1. 約翰 傑 布克 2. 梅芬 傑 奧立佛 3. 傑佛瑞 皮 菲騰
	國 籍	均美國
	住、居所	1. 美國德州路博克市第七十九街5412號 2. 美國德州路博克市第七十二街5728號 3. 美國德州路博克市第七十廣場5722號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美國農業部
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國哥倫比亞特區華盛頓市
	代 表 人 姓 名	麥可 迪·露夫

五、發明說明 (11)

修正
補充
90年12月4日

選殖部位中，而得最終之測試者質體 pBIN19Gmbar。將所構築得之 pBIN 19Gmbar 藉由標準電穿透方法（沃克皮屈 (Walkerpeach) 與威耳頓 (Velten)，1994）導入 根癌土壤桿菌 株 EHA 101 中。以生長於含有 25 微克/毫升慶大黴素之 LB 瓊脂（米勒 (Miller)，1973）平盤上生長篩選出選殖株。進一步藉由 PCR 確定 pBIN 19Gmbar 質體之存在。然後將經轉形之 土壤桿菌 置於 1 毫升含有 25 微克/毫升慶大黴素，及 50 μ M 乙醯丁香酮之 LB 培養液中，於 28°C 下生長 18 小時。經 18 小時培育後，將 200 微升細菌培養物轉移至含有乙醯丁香酮與慶大黴素之 LB 瓊脂平盤中。將經接種之 LB 瓊脂平盤於 28°C 下培育過夜。

經二十四小時後，藉由首先將覆蓋一片無菌薄膜之燒杯壓於經接種之 L-肉湯平盤上，然後將該薄膜轉壓至花粉萌發平盤上，而將實施例 1 之花粉萌發平盤，接種以一菌落經轉形的 土壤桿菌。

實施例 3：轉移基因花粉之萌發與製造

藉由於搖晃至一片錫箔上，而從剛開放之棉花花朵獲得花粉。將經此獲得之花粉置於實施例 2 之花粉萌發平盤上，並將平盤溫和搖晃以使培養基表面完全覆蓋花粉。將過量花粉轉移到第二個花粉萌發平盤上，並重複該步驟直到獲得數個覆蓋著花粉之萌發平盤為止。然後將萌發平盤置於一層飽和硫酸銨上，於密壁濕度小室中得濕度大約為 80%，並於 28°C 下培育 30 分鐘，然後於 24°C 下 3-4 小時，以使其萌發

六、申請專利範圍

92.12.05 修正
年 月 日 補充

1. 一種供製造轉移基因植物之方法，其包含：
 - a. 自第一種植物獲得花粉，
 - b. 將一菌落土壤桿菌 (*Agrobacteria*) 塗於固體花粉培養基上，而該土壤桿菌包含至少一種能夠被轉移至植物細胞中之異源性基因序列，
 - c. 將花粉塗覆於固體培養基上，其中該固體培養基包含 10% 瓊脂糖、25% 蔗糖、0.52 mM KNO_3 、3.06 mM MnSO_4 、1.66 mM H_3BO_3 、0.42 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 1.0 μM A_3 赤黴酸，
 - d. 使花粉於該培養基上萌發並生長，藉此製造轉移基因花粉，
 - e. 將轉移基因花粉塗覆於能夠被第一種植物花粉受精之第二種植物的柱頭上，藉此使第二種植物受精，
 - f. 自第二種植物獲得轉移基因種子，
 - g. 使該轉移基因種子萌發而獲得轉移基因植物，其中該植物為乾燥柱頭花粉植物。
2. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該植物為棉花植株。
3. 根據申請專利範圍第 2 項之方法，其中第二種棉花植物係為去雄棉花植物。
4. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其包含在將轉移基因花粉塗覆於其上之前，先將第二種植物去雄的額外步驟。

六、申請專利範圍

5. 一種供花粉萌發及花粉管生長之培養基，其包含 10% 瓊脂糖、25% 蔗糖、0.52 mM KNO_3 、3.06 mM MnSO_4 、1.66 mM H_3BO_3 、0.42 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 1.0 μM A_3 赤黴酸。

裝

訂