Int. Cl. 298558 告本

298558

申請日期	93.10.1
案號	931072740
類別	A01K61/00

（以上各欄由本局填註）

B4 298558
D4

~~298562~~

追加發明專利說明書

一、發明名稱	中文	四倍體貝類 追加(一)
	英文	TETRAPLOID SHELLFISH
二、發明人	姓名	(1)郭希明 (2)小斯坦狄許K.亞倫
	國籍	(1)中國 (2)美國
	住、居所	(1)美國紐澤西州葛拉斯保羅・馬利卡山路515號 (2)美國紐澤西州茅里斯頓・大街郵政信箱205號
三、申請人	姓名（名稱）	美商・紐澤西州立大學
	國籍	美國
	住、居所（事務所）	美國紐澤西州新布魯斯威克山姆斯特和喬治街
	代表人姓名	安德魯B.路得辛斯基

（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

（由本局填寫）

承辦人代碼：	A6 B6
大　　類：	
ＩＰＣ分類：	

本案已向：

美國（地區）　申請專利，申請日期：1994.9.30　案號：08/316,279，□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

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

技術領域

本發明為有關一活之四倍體貝類，其包含牡蠣。該四倍體藉由使用染色體組處理技術加以產生的。

發明背景

大部份有性生殖的動物具有二組染色體，且因此稱為二倍體。減數分裂為將該染色體數降低一半以可避免每一代染色體數增倍之方法，其為二步驟的方法，藉此二倍體細胞產生四個單倍體細胞，每一細胞具有一組染色體。該單倍體細胞之一個或者所有可成熟以形成具有功能的卵或是精子細胞，在一另面可為已知的配子。

一般在動物中四倍體（也就是具有四組染色體者）對各種目的，包含產生三倍體、雜交以及其它育種計畫上，是十分重要的。但是，但是先前嘗試在包含牡蠣之軟體動物中產生活的四倍體一直並未成功，推論在二倍體之卵中引起四倍體為無法存在之部份原因乃是由於細胞數的不全，此係由於藉由一大的四倍體核於正常二倍體卵細胞中分裂造成的。較理想的是發展出一方法，藉此四倍體合子可在貝類中產生，該軟體動物可經由一般的孵化步驟而存活，且可成熟而成為生長完全的軟體動物，以提供可靠的供給之四倍體貝類，而後該軟體動物可使用於，例如，作為四倍體軟體動物的商業上大量生產。

本發明將藉由以下使用太平洋的牡蠣，也就是 Crassotrea gigas Thunberg加以說明。

在太平洋牡蠣的例子中，雖然四倍體的胚胎已被一些

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ ）

包含有絲分裂 I 的阻礙(Guo 1991)、極體 I 的阻礙(Guo等人，1993a，b)、胚葉細胞的融合(Guo 1991)及雌核生殖之方法加以產生，但所有產生的胚胎無法活超過變態階段。如前所示，已推論引起的四倍體無法存活之因可能是由於在胚胎中細胞-數目有不全所引起，該不全是由於以較大四倍體核作正常卵的分裂所造成的。在另一方面，由三倍體的牡蠣所得之卵是顯著大於由正常二倍體牡蠣所得的卵(Stephan Downing，1989)。

三倍體的太平洋牡蠣是商業上可取得的(Allen，1989)，該三倍體之太平洋牡蠣已知具有比正常二倍體牡蠣更佳的優點，該優點包含其具有較佳的味道(Allen及Downing，1991)，特別是在該二倍體正常的生殖期間，以及改進其生長速率(Allen，1988)。現今，該商業上可取得的太平洋三倍體係為正常的二倍體牡蠣藉由使用一些染色體組處理技術加以產生，藉此，對該在卵細胞中的減數分裂情事加以處理而使該卵細胞保持第二極體於其中，以取代該第二次減數分裂期間將該極體的釋出(Allen，1988)。因此，該三倍體牡蠣被稱為誘發的三倍體。相對於此，本發明可引起的直接益處之一為該交配過的三倍體可藉由簡單的將一成熟的四倍體與一正常的二倍體交配加以產生。

本發明的摘要

依據本發明，在一三倍體軟體動物中的第一極體是可加以處理以產生一活的四倍體軟體動物（貝類）。一般而言，利用解剖而由雌性三倍體中取得卵，而後將以一過濾

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

過的海水加以清洗。在該卵受精後的一合適時間點（例如受精後5分鐘），進行一段合適的時間的阻礙極體I由卵中釋出之步驟。而後，該卵在標準的孵育條件下加以培育。本發明的一較佳實施例中，該阻礙極體I之方法的進行是藉由合適濃度且溶於過濾海水之細胞鬆馳素B(CB)或其它阻礙劑加以處理，但是該方法亦可藉由對受精卵施加一熱或是流體靜力(hydrostatic)衝擊加以進行。藉由本發明，可生長至成熟的四倍體貝類是可產生的。

本發明的詳細的說明

本發明一般可應用至貝類，但是本發明的詳累說明書是藉由使用為雙殼貝類的太平洋牡蠣(Crassotrea gigas Thunberg)加以說明。雙殼貝類是任何具有三門貝殼所組成的貝類的軟體動物。

為能有助於了解本發明，一些專業句詞的定義是在說明書的最後加以說明。但是，該些定義並非想要限制或是或是取代一般熟習此技藝人士所接受的定義。

太平洋牡蠣是海底中的雙殼貝類，其自然分佈於日本、韓國及中國的海岸。太平洋牡蠣為一過濾食者，其基本上以微海藻及小的有機碎片為食，且為雌雄異體，並是體外受精，該牡蠣並無第二性徵可鑑定出，其性別的決定是藉由檢驗性腺組織加以決定。在產卵的季節，太平洋牡蠣會有超過一半的體重是致力於產生配子。在平均市場上大小的雌性太平洋牡蠣可產生50-100百萬個卵(Quayle, 1998)。該太平洋牡蠣新釋出的卵為桃形，且在受精後，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ ）

則為直徑為50μm的球形。該受精卵會作快速的變化，於25℃下在受精後6-7小時內則孵化成可游動的擔輪幼蟲。在受精後約24小時，該擔輪幼蟲形成二個殼，且顯示出"D"型的幼蟲。該幼蟲之可游動階段持續約3-5週，在該期間，其可隨水流散布開。在該自由游動之最後，當其大小到達0.3mm時，該幼蟲會變態，且永久固化而形成一堅硬的表面。依溫度及食品的取得，其可在1-2年時達成性成熟。

太平洋牡蠣，該屬(Grassostrea)的所有種為二倍數的20個染色體。太平洋牡蠣成熟的卵是停滯於第一次減數分裂的前期(Lu,1986)。藉由顯微鏡觀察可看見10個聯會的四分體。在受精或是活化後，10聯會的四分體正常會經過二次減數分裂，且釋出二極體，也就是，含有20二分體之極體Ⅰ及含有10染色單體的極體Ⅱ。在卵細胞中所餘的10染色單體會與來自精子的10染色單體統合而形成一二倍體的合子。在上述正常二倍體牡蠣中之減數分裂及受精的正常步驟是陳述於第1圖。

見於第1圖，(a)至(h)各步驟是說明如下：(a)在減數分裂前，使該二組染色體二倍化而形成二組重複的染色體；重複的染色體可藉由中心體將其握在一起；(b)受精使該卵活化，且減數分裂開始；(c)第一次減數分裂導致在第一極體中的重複組的染色體被去除；(d)第二次減數分裂分出為中心體所握在一起的剩餘染色體；(e)消除在第二極體中一組染色體；(f)將由卵中的剩餘單倍體組及在精子中的單倍體組在一稱為的有性生殖的步驟下加以統

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

合，而使該細胞回歸形成二倍體的細胞；(g)使該二倍體組的染色體重複；(h)分裂而產生一二倍體胚胎。

依據本發明，四倍體的牡蠣是藉由染色體組處理的幫助而由三倍體的雌性與二倍體的雄性加以產生的。在此方面，三倍體的雌性是被置條件為在一具有高溫且食品豐富的環境下。較佳為該條件是在配合形成的最早期階段，馬上接著冬眠。如前所述，三倍體的牡蠣現今是可商業上可取得的，其典型是將二倍體在減數分裂期間阻礙極體Ⅱ由受精卵中釋出加以產生。本發明的所得的結果打開產生三倍體牡蠣的一新路徑，其具有比習知路徑更佳的優點。但是，基於習知技術且將其視為起始線，才可達成本發明的目的，習知技術的雌性三倍體是使用為起始物質。而後可很明顯的得知一新型的三倍體牡蠣是可藉由將本發明的四倍體牡蠣與一正常的雄性二倍體交配而加以產生的。如此新型的三倍體牡蠣是由正常交配產生而在受精步驟無有任何人工方法的參與，此是被預期具有一些優於習知藉由有關極體Ⅱ阻礙之受精步驟而加以產生的三倍體牡蠣之優點。（見於下列的更進一步的討論）。三倍體動物在產卵前是個別以流動細胞檢測法(flow cytometry)加以檢視以確認其倍數性。

下一步驟為藉由解剖而由該三倍體雌性中（狹帶產卵處strip spawning)收集卵。該卵以過濾的海水加以清洗，且可保持在一合適的篩目上，如25μm的篩目上。

該卵以由正常二倍體所得的精子加以受精，使用於受

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ ）

精的精子量一般為每1個卵細胞約10個精子細胞。

抑制由受精卵中釋出極體可在受精後之合適時間點下開始。該PB1的抑制可藉由熱或是熱或是流體靜力(hydrostatic)衝擊的應用而達成，或是利用化學試劑，如細胞鬆馳素B或6-二甲基胺嘌呤，的幫助加以達成。在本發明較佳是利用細胞鬆馳素B(CB)的幫助達成該PB1抑制效用。該受精卵的化學處理期間是必須調整，以得一理想的結果。一般而言，該CB處理期間約相對應於一統計上平均時間的60至80%，該統計上平均時間為在缺少化學試劑之相對應的條件下，使未處理的三倍體卵之一半量釋出其極體所需的時間。在大多的例子中該統計上平均時間是藉由顯微檢視加以決定的，且太平洋牡蠣中於25℃下為約25分鐘。因此，該CB處理一般為在25℃下持續15-20分鐘。該CB處理的起始時間亦必須調整以得到最佳的結果。一般而言，CB處理的起始時間為在受精後5分鐘。

在PB1的阻礙步驟進行後，該卵由受該步驟影響中去除，且進入其後的步驟，該等步驟為一般貝類孵化工業上的標準步驟。

提出下列的實施例僅為說明本發明。

實施例1

使用於本研究的三倍體太平洋牡蠣之大小為二年，且是藉由阻礙PB2釋出加以產生的。三倍體動物在產卵前先以流動細胞檢測法(flow cytometry)加以確認。配子是由狹帶產卵處加以得之。該卵流經過一85μm的篩目以去除較

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

大的組織碎片，且在25μm的篩目上清洗。所有的受精及處理是使用過濾過(2μm)的海水在25-28℃下進行。在本研究中使用之海水的鹽分為20-22ppt。

由三倍體所得的卵是以由二倍體所得的單倍體的精子加以受精。在受精後，該卵分成二組：TD及TDCB二組。在TD組中，受精卵不以任何的化學試劑加以處理，且培養作為控制組。在TDCB組中，該受精卵是以纖維鬆馳素B(CB)加以處理以阻礙PB1的釋出。CB是在二甲基亞碸中加以製備，且是以最終濃度為具有0.5% DMSO的0.5mg/l加入受精卵中。該CB處理是在受精5分鐘後開始，且持續15分鐘。在該CB處理後，以DMSO-海水(1%)加以清洗，並在密度為65個卵／升下加以培養。使用三對的牡蠣作為親代以三重複實驗。因該三倍體雌性的產生力低，且預期實驗的存在力低，故使用所有可取得的卵，且在該三重複中的卵數目是無標準化的。同時，分配更多的卵給TDCB組中，以確保該四倍體的存活，但是培養的密度是保持在大約相同的數目。

在TD與TDCB二組中的分裂百分率是在90至120分鐘PF下決定。記錄該二組中分裂胚胎存活至D階段（第1天）、第7天、及幼牡蠣（第35天）。在取樣的天數下，該存活幼蟲的倍數組成是藉由流動細胞檢測法(flow cytometry)加以測定。

在三個月PF，存活的牡蠣樣品取樣以作體重及染色體數目的測定。對於染色體的分析，牡蠣首先利用秋水仙

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ ）

素(0.005%)密集的餵食12小時，牡蠣的內臟部份由貝殼中取出且稱重，將整個各體切碎，且在乙酸／甲醇混合液（3：1）中加以固定。該固定的樣品之合適量放在玻片上加風乾，而後該玻片以Leishman's染劑加以染色。對每一牡蠣可計算出至少10個為中期，且無顯示明顯的染色體遺失徵兆。僅有該些染色體數可大膽地加以決定者是包含在該分析中。具有20、30及40染色體的牡蠣可分別分級成二倍體、三倍體及四倍體。

平均而言，由三倍體所得的卵在直徑上是比由二倍體所得者大15%，此會使得其在體積上有54%的增加。由三倍體所得的卵數目在該三重複組中是變化不同的，因此，該三倍體雌性分別產生8.2、0.4及0.7百萬個卵。該CB處理在早期的有絲分裂上並不具有顯著功效，且該分裂百分率是約與在TD及TDCB二組中的相同。見於表1。

分裂的卵存活至D階段(24小時PF)的存活率在該二重複組間是變化的。在第1重複組中，TDCB組具有比TD組更低的存活百分率。在第2重複組中，該二組約相同。但是，在第3重複組中TDCB組具有比TD組更高的存活百分率。當以較晚的階段作比較，TDCB組最後具有比相對的TD組更為存活率之事情是十分清楚的。在第2及3重複組中，在第7天，TDCB組顯示出比TD組更高的存活率，雖然在對二重複組，不論是在TD或是TDCB組中在第35天時無有任何存活者。在第1重複組中，在第7天，該TDCB組顯示出比TD組更低的存活力，在變態及沈積後，該TDCB1組（也就是

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

由第1重複組之TDCB組）產生比TD1（也就是由第1重複肖之TD1組）更多的幼牡蠣。整體2500幼牡蠣是由TDCB1組中回收得，其為分裂卵的0.0738%，而由TD1組中僅得2幼牡蠣，其代表分裂卵的0.0003%。

在24小時PF，以流動細胞檢測法(flow cytometry)在TD組中的分離胚胎基本上是由2.5n非整倍體細胞所組成（n為該單倍體數，在此例中為10）。在TDCB組中，二非整倍體細胞族群是明顯的，一族群是落在在三倍體與四倍體間，另一族群則是落在四倍體至五倍體間，在24小時PF下，整倍體峰是不明顯的，在第7天，由存活幼蟲衍生之細胞基本上仍是非整倍體，在是在2.5n的峰已不再明顯。取而代之的，在TD組中的非整倍體是傾向於二倍體。在TDCB組中，存在的幼蟲細胞在第7天主要的為四倍體或是接近於四倍體的非整倍體。但有少量的三倍體或是接近於三倍體的非整倍體。

在第13天，在第2及3重複組中無有殘存任何的幼蟲，在TD1組中存活者是太少而無法取樣作流動細胞檢測法。我們估計細胞在2n、2n及4n級的比例分別為4%、16%及80%。在第22天，分析由TDCB1所得的12個變態的幼蟲：得到八個四倍體（67%）、二個三倍體（17%）及二個嵌合體（17%）。在TD1中，存活的二幼牡蠣在第35天被犧牲：一者為二倍體，另一者為三倍體。因為藉由流動細胞檢測法不容易檢測出在DNA含量上少量的不同，故在由所列（由TD1所得的）整倍體可能包含非整倍體加或減一些染色

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ ）

體。

實際上無有沈積後的死亡率，在3個月PF，由TDCB1所得的牡蠣之長度到達1-4cm，由TDCB1中取樣出三十一個作重量測定及染色體計算，由三十個牡蠣得到明確的染色體計算量，其餘的一個無具有足夠而可分級的中期，是故將其排除於此分析之外。在該30個牡蠣中，一具有20染色體，一具有30個染色體，其分別被分級成二倍體(3.3%)及三倍體(3.3%)。20個牡蠣確實具有40個染色體且分級成四倍體(66.7%)。7個牡蠣是非整倍體(23.3，其具有21、31、32、33、38(2)及41個染色體。一牡蠣為嵌合體，其為73%具有32染色體的細胞及27%具有40染色體的細胞。

四倍體牡蠣的平均體重為284mg、其範圍是在15mg至610mg（見表2）。平均而言，非整倍體的牡蠣是比四倍體顯著的小($p<0.05$)，但是具有38染色體的非整倍體重量為479mg，其為在該組中第四大的牡蠣，且整體的重量（具有貝殼）為最大。該三倍體與三倍體二者與四倍體比較是較大的。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

表 1 在三重覆的實驗組中，所使用卵的數目、分裂百分率及分裂的合子存活至D階段（第1天）、第7天及幼牡蠣（第35天）之百分率

組	卵 (X1000)	分裂 (%)	D階段 (%)	第7天 (%)	幼牡蠣 (%)
TD1	700	86.4	21.7	5.7	0.0003
TDCB1	3998	84.6	5.4	2.1	0.0739
TD2	144	79.3	5.1	0.3	0
TDCB2	217	70.8	5.7	1.1	0
TD3	217	87.7	29.5	1.0	0
TDCB3	444	89.2	35.2	1.2	0

表 2 藉由利用三倍體所得的卵以單體的精子加以受精而後抑制極體 I 所產生的三個月大太平洋牡蠣倍體數分類及體重(mg)

倍體數	數目 (%)	體重(SE)
二倍體	1(3.3)	65
三倍體	1(3.3)	92
四倍體	20(66.7)	284(33)
非整倍體	7(23.3)	160(49)
嵌合體	1(3.3)	62
整體	30(100)	237(28)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ ）

實施例2

藍色貽貝(Mytitus edulis)四倍體是依據實施例1的步驟加以產生，但使用相對應由三倍體所得的卵及二倍體所得的單倍體精子。

實施例3

珍珠貝(Pinctada magaratifera)四倍體是依據實施例1的步驟加以產生，但使用相對應由三倍體所得的卵及二倍體所得的單倍體精子。

實施例4

Kumonoto牡蠣(Crassostrea sikamai)四倍體是依據實施例1的步驟加以產生，但使用相對應由三倍體所得的卵及二倍體所得的單倍體精子。

實施例5

Suminoe牡蠣(Crassostrea rivularis)四倍體是依據實施例1的步驟加以產生，但使用相對應由三倍體所得的卵及二倍體所得的單倍體精子。

實施例6

美洲牡蠣(Crassostrea virginica)四倍體是依據實施例1的步驟加以產生，但使用相對應由三倍體所得的卵及二倍體所得的單倍體精子。

實施例7

棕色扇貝(Argopectin irrodians)四倍體是依據實施例1的步驟加以產生，但使用相對應由三倍體所得的卵及二倍體所得的單倍體精子。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

實施例 8

Chlamys屬，特別是中國扇貝Chlamys farrari，的四倍體是依據實施例 1 的步驟加以產生，但使用相對應由三倍體所得的卵及二倍體所得的單倍體精子。

實施例 9

Manila蛤蜊Tapes philippinarum四倍體是依據實施例 1 的步驟加以產生，但使用相對應由三倍體所得的卵及二倍體所得的單倍體精子。

實施例 10

Patinopectin屬四倍體是依據實施例 1 的步驟加以產生，但使用相對應由三倍體所得的卵及二倍體所得的單倍體精子。

實施例 11

腹足軟體動物，特別是石決明，Haliotus的四倍體是依據實施例 1 的步驟加以產生，但使用相對應由三倍體所得的卵及二倍體所得的單倍體精子。

實施例 12

本實施的數據顯示本發明的四倍體對於三倍體的生成是有用且有效的。如正常的二倍體，四倍體牡蠣在長到一年時成熟。在成熟階段，四倍體太平洋牡蠣（Crassostrea gigas Thunberg）被取樣之。其為雌性或者雄性性別比例相當。相對於其產量嚴重降低下挫的三倍體，四倍體展現出與二倍體相同的多產量。進行四倍體四與二倍體之間的雜交。所有源自四倍體x 二倍體（或相反的）雜交的幼牡蠣

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ ）

，當以流動細胞檢測法予人以分析，迄今所得均為三倍體。

進行二倍體(D)與四倍體(T)之間所有四種可能的雜交組合：DD，DT，TD及 TT（雌性列於前）。該二倍體雌性有 $8.9x10^6$ 個卵，而四倍體雌性有 $6.4x10^6$個卵。各組的受精程度都不錯，其範圍從92.3到 97.8%（表3）。與正常的二倍體對照組(DD)比較，DT及TD雜交組其受精卵存活至幼牡蠣期的數量都不錯。該TT雜交組的存活率非常低。

在受精後50天，源自 DD，DT及TD雜交組（每組30個牡蠣）的牡蠣予以取樣以供藉由流動細胞檢測法測定其倍數組成。所有30個源自DD之牡蠣都為二倍體。所有60個源自DT及TD雜交組的牡蠣都為三倍體。3 個源自TT雜交組的牡蠣經分析後為四倍體。

表３ 受精程度、受精卵的數目以及存活至D和幼牡蠣期的累積存活率。

組別	受精程度 (%)	受精卵的數目 ($x10^6$)	至 D期的存活率 (%)	至幼牡蠣期的存活率 (%)
DD	97.0	2.688	32.2	0.89
DT	92.3	2.986	11.4	0.50
TD	97.5	2.465	29.3	0.87
TT	97.8	2.442	9.5	0.001

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁） 裝 訂 線

五、發明說明（　）

使用本發明的四倍體Crassostrea virginica牡蠣和二倍體Crassostrea virginica牡蠣重覆上述流程。可獲得高產量的DT與TD雜交之三倍體Crassostrea virginica牡蠣。

各種被認為是在本發明上述方法中發生的情事是概要地陳述於第２圖，該情事係性藉由PBI阻礙作會導致由三倍體的雌性與一二倍體的雄性形成一四倍體牡蠣，此情事與陳述於第１圖的一般的情況是相對照的。

由三倍體所得的卵產生可存活的四倍體顯示其支持細胞數目不全的假說。由三倍體所得的卵在體積上是比由二倍體所得者大54%，且增加的卵體積可導致在細胞數目上顯著的增加。

一旦依據本發明產生的牡蠣成熟，其可與正常的二倍體牡蠣交配以產生三倍體──4n x 2n→3n。簡言之，因三倍體的產殖能力比正常二倍體低，其對商業上的生產者而言具有一些可轉換成增加市場上利益的優點(Allen, 1988)。三倍體的牡蠣是廣泛地培養於美國的西海岸，且在東海岸上增加。三倍體亦在歐洲（例如法國、愛爾蘭）及亞洲(例如日本、中國、韓國)培養。

現今商業上產生的三倍體之重要特徵為其是使用抗生素細胞鬆馳素Ｂ(CB)加以產生的，但CB被發現在多數的人體及動物體的研究中會造成畸形及突變。因其使用於牡蠣中，CB並不存在於市場大小的牡蠣中，所以沒有組織中殘餘的危險，但是該藥物固有的毒性以使得Department of

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

Health and Human Services Center for Veterinary Medicine將CB置於"無有低規定優先量"。可能其它的國亦將有相同地關心CB及其它化學物質的使用。一由本發明所提供之四倍體產生三倍體牡蠣的新路徑可全世界避免對該問題的關心。

與引發（以藥物或其它步驟）的三倍體相比，藉由交配產生三倍體在此至少有三項優點，（i）由將四倍體與二倍體交配產生三倍體可證實是比藉由藥物處理所得的二倍體為健壯，因為四倍體卵的大小是比三倍體者大很多的（三倍體卵的大小為二倍卵體積的1.5倍，四倍體的卵大小為二倍體者的二倍）。增加卵大小是有益的，蓋因在早期的幼蟲生活期中對於發展中的胚胎可保留更多的能量。在實施本發明，更是證實四倍體貝殼可產生配子，且該四倍體的卵是較大的。（ii）三倍體是由4n X 2n交配所得，此可不會發生因第二極體的抑制而造成的自交衰落。（iii）理論上，4n X 2n交配的子代100%為三倍體，此是引發的三倍體從來不曾達成的。與以一未決定數目的二倍體或嵌合體污染的穀類相比，一純三倍體穀物的優點是十分顯著的。純的三倍體穀類亦在族群的控制上亦具有優勢。因為三倍體的族群在官能上是不孕者（3n X 3n交配種是無法存活的），其可使用以防止其以如非自然的品種或是基因修飾過的生物體在生態系統中的繁殖。

四倍體貝殼自身是一具潛力的海洋培養物，由本發明的作的初步觀察已顯示該四倍體牡蠣具有一不正常的較大

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

閉殼肌，其為在扇貝中的市場上的物品。

除了上述四倍體的應用外，其還有其它的應用，因此，四倍體可使用作為在正常情況下無法雜交的二品種之異種交配的橋樑。四倍體亦可使用產生出更多的四倍體，4n x 4n→4n。四倍體可使用以產生獨特的二倍體結合物，此係藉由已知的雌核生殖的方法加以完成。本發明的其它優點及應用對熟習此技藝人士在小心是研讀本發明的揭露內容後的是十分明顯的。

雖然本發明的前述說明基本上是以對本發明的較佳實施例加以說明，但本發明的範圍並不限定於較佳實施例的任何方式，而是以在說明書後所附的申請專利範圍加以界定。

如前所述，一些專業名詞的界定是如下所述，以有助於了解本發明。

非整倍體：係為與正常二倍體相比，為失去或得至有一或多個別的染色體的形式（與具整組的染色體相反）。

中心體：一染色體的建構區域，其包含有絲分裂及減數分裂紡錘絲的接合處。

染色單體：藉由複製產生的的染色體複製物。

二倍體：一種具有一組染色體的形式，其是單倍體數，基本數目(n)的二倍。

整倍體：一具有染色體基本組數之整數倍數的形式。

單倍體：一具有染色體基本組數的形式。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝　訂　線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

減數分裂：細胞分裂的特殊步驟，其發生在性細胞成熟時，藉由該子核可得至一半數目的染色體，因此是與受精相反的，受精是補償作用，以使該在正常情況下受精而造成染色體成為二倍。

有絲分裂：一有關紡錘絲及染色體的細胞核分裂，該步驟可導致二個完全相同，且亦與母核相同的子核。

四倍體：一種具有一組染色體的形式，其為單倍體數的二倍。

三倍體：一種具有一組染色體的形式，其為單倍體數的三倍。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

參考文獻

Allen, Jr., S.K. (1988); Oceanus 31, 58-63.

Allen, Jr., S.K. and Downing, S.L. (1991); J. Shellfish Research 10, 19-22.

Guo, X. (1991); Ph.D. Dissertation, University of Washington, Seattle, Washington

Guo, X., Cooper, K., Hershberger, W.K. and Chew, K.K. (1992a); Biol. Bull. 183, 381-386.

Guo, X., Hershberger, W.K., Cooper, K. and Chew, K.K. (1992b); Biol. Bull. 183, 387-393.

Guo, X., Hershberger, W.K., Cooper, K. and Chew, K.K. (1993); Aquaculture 113, 201-214.

Lu, J.-K. (1986): M.S. Thesis, University of Washington, Seattle, Washington.

Perdue, J.A. (1983); Ph.D. Dissertation, University of Washington, Seattle, Washington.

Quayle, D.B. (1988); Can. Bull. Fish. Aquat. Sci., 218, 1-241.

Stephens, L.B. and Downing, S. L. (1989); J. Shellfish Research 8(1), 324.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

第八三一〇一九二七A〇一號專利申請案

發明名稱：四倍體貝類（追加一）

圖式簡要說明

第1圖圖示說明，於正常的二倍體牡蠣所觀察到的，正常的減數分裂及受精之過程。

第2圖圖示說明，被認為會在形成一個源自於一個雌性四倍體與一個雄性二倍體之四倍體牡蠣之過程中，由於PB1阻礙之故而發生的各種不同之生物現象。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

298558

A5
B5

四、中文發明摘要（發明之名稱：　　）

四倍體貝類

本發明為提供一新穎的四倍體軟體動物，其包含牡蠣、扇貝、蛤蜊、貽貝、石決明。同時，亦提供一產生四倍體軟體動物的方法，以及藉由將新穎的四倍體軟體動物與二倍體軟體動物交配而產生三倍體軟體動物之方法。

英文發明摘要（發明之名稱：TETRAPLOID SHELLFISH　　）

Provided by this invention are novel tetraploid mollusks, including oysters, scallops, clams, mussels and abalone. Also, provided are a method for producing the tetraploid mollusks and a method for producing triploid mollusks by mating the novel tetraploid mollusks with diploid mollusks.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

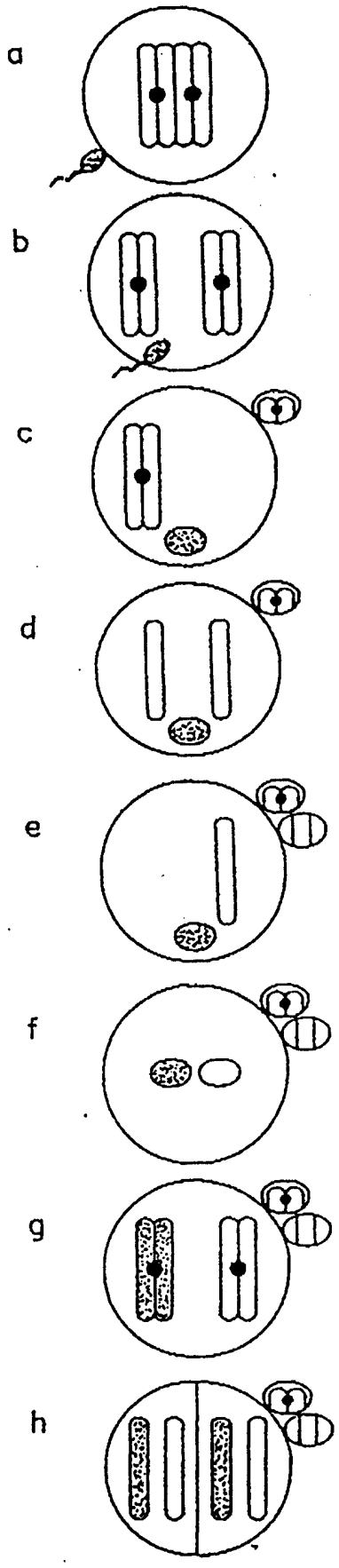
訂

線

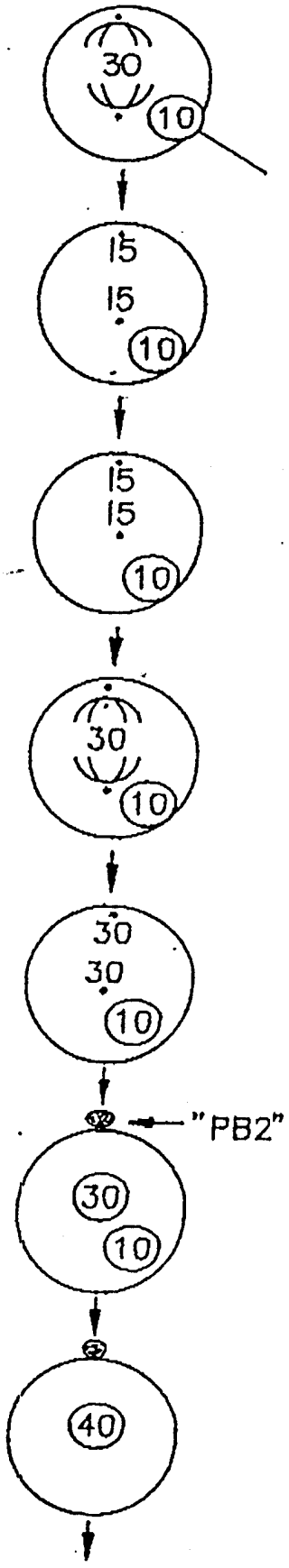
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

298558



第 1 圖



第 2 圖

85年2月8日 修正補充

六、申請專利範圍

第83101927A01號專利申請案申請專利範圍修正本

修正日期：85年2月

1.一種生成一活的且具有一種三倍體軟體動物之性質的三倍體軟體動物之方法，其包括令一個四倍體雄性軟體動物與一個二倍體雌性軟體動物交配。

2.如申請專利範圍第1項之方法，其中該三倍體軟體動物為一雙殼貝類。

3.如申請專利範圍第1項之方法，其中該三倍體軟體動物為一牡蠣。

4.如申請專利範圍第3項之方法，其中該三倍體牡蠣係歸屬於太平洋牡蠣(Crassostrea gigas Thunberg)。

5.如申請專利範圍第3項之方法，其中所生成的牡蠣係歸屬於珠母貝(Pinctada magaratifera)、熊本牡蠣(Crassostrea sikamai)、近江牡蠣(Crassostrea rivularis)以及美洲牡蠣(Crassostrea virginica)。

6.如申請專利範圍第1至5項任一項之方法，其中該四倍體雄性軟體動物係藉由一包含有如下步驟之方法所生成者：

(i)令一個源自於一個三倍體雌性軟體動物之卵與一個源自於一個二倍體雄性軟體動物之精子進行授精；

(ii)阻遏極體I從該經受精的卵中釋出；以及

(iii)培育該經受精的卵；

由此所生成的該軟體動物能夠在其所相應的二倍體軟體動物可天然地棲息之天然狀況下生長且成熟。

7.如申請專利範圍第6項之方法，其中該極體I之阻遏係

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

藉由細胞鬆弛素B之幫助而予以進行者。

8.如申請專利範圍第1至5項任一項之方法，其中該四倍體雄性軟體動物係藉由令一個四倍體雌性軟體動物與一個四倍體雄性軟體動物交配而生成者。

9.如申請專利範圍第8項之方法，其中該四倍體雌性軟體動物和/或該四倍體雄性軟體動物係衍生自一藉由一包含有如下步驟之方法所生成的四倍體軟體動物：

(i)令一個源自於一個三倍體雌性軟體動物之卵與一個源自於一個二倍體雄性軟體動物之精子進行授精；

(ii)阻遏極體I從該經受精的卵中釋出；以及

(iii)培育該經受精的卵；

由此所生成的該軟體動物能夠在其所相應的二倍體軟體動物可天然地棲息之天然狀況下生長且成熟。

10.如申請專利範圍第9項之方法，其中該極體I之阻遏係藉由細胞鬆弛素B之幫助而予以進行者。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製