



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년09월06일
(11) 등록번호 10-0755576
(24) 등록일자 2007년08월29일

(51) Int. Cl.
A01H 1/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2003-7014005
(22) 출원일자 2003년10월24일
심사청구일자 2004년12월27일
번역문제출일자 2003년10월24일
(65) 공개번호 10-2004-0029967
공개일자 2004년04월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/012741
국제출원일자 2002년04월24일
(87) 국제공개번호 WO 2002/85105
국제공개일자 2002년10월31일
(30) 우선권주장
60/286,296 2001년04월25일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
IGNATOVA, S.I. et.al."Resistance of Tomato F1
Hybrids to Grey Mold", Acta Ogtsuikigy Okabt,
2000, Vol22(3), pp 326-328

(73) 특허권자
세미니스 베저터블 시즈 인코포레이티드
미국 캘리포니아주 93030-7967 옥스나드 카미노
델 솔 2700
코넬 리서치 파운데이션 인코포레이티드
미국 뉴욕 14850 이타카 쏘우드 드라이브 20 스위트
105 코넬 비즈니스 앤드 테크놀로지 파크
(72) 발명자
가버브래드케인
미국캘리포니아주95695우드랜드카운티로드9518658
프램프톤아나줄리아
미국캘리포니아주95616데이비스프라도레인3064
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김창세, 장성구

전체 청구항 수 : 총 17 항

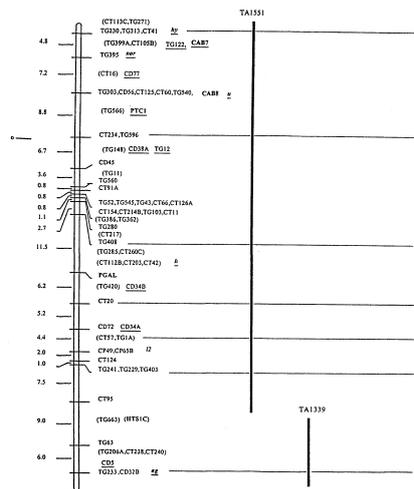
심사관 : 정진욱

(54) 보트리티스 시네리아에 내성을 나타내는 토마토 식물

(57) 요약

본 발명은 보트리티스 시네리아에 내성을 나타내는 토마토 식물, 및 보트리티스 시네리아에 내성을 가지며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 새로운 동종변형, 하이브리드, 무수정 및 유전 공학 처리된 토마토 식물을 개발하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

브라갈로니마우로

이탈리아아이-04010보르고사보티노비아리토라네아5

탱슬리스트븐디

미국뉴욕주14850이타카파인뷰테라스113

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

하기 단계 (a) 내지 (c)를 포함하는, 식물 군으로부터 *보트리티스* 내성 *라이코펠시콘*(*Botrytis* resistant *Lycopersicon*) 식물을 선발하는 방법:

(a) 식물 군중 *라이코펠시콘* 식물로부터 DNA를 획득하는 단계;

(b) TG408, CT20, CT57 및 TG241로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 분자 표지를 사용하여 상기 단계 (a)에서 *라이코펠시콘* 식물로부터 획득된 DNA를 분석함으로써 염색체 10 상에서 분자 표지 CD45와 CT95 사이에 위치하는, *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 함유하는 염색체 10 상의 하나 이상의 영역을 동정하는 단계; 및

(c) 상기 식물 군으로부터 *보트리티스* 내성을 암호화하는, 염색체 10 상에서 상기 영역을 갖는 식물을 선발하는 단계.

청구항 45

하기 단계 (a) 내지 (e)를 포함하는, *보트리티스* 내성 *라이코펠시콘* 식물을 제조하는 방법:

- (a) 염색체 10 상에서 분자 표지 CD45와 CT95 사이에 위치하는, TG408, CT20, CT57 및 TG241로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 분자 표지에 의해 동정될 수 있는 *보트리티스* 내성을 암호화하는 염색체 10 상의 하나 이상의 유전자를 함유하는 영역을 포함하는 *보트리티스* 내성 공여체 *라이코펠시콘* 식물을 제공하는 단계;
- (b) 상기 단계 (a)에서 제공된 *보트리티스* 내성 공여체 *라이코펠시콘* 식물을 *보트리티스*에 대하여 비내성이거나 중간 수준의 내성을 갖는 수용체 *라이코펠시콘* 식물과 교배시키는 단계;
- (c) 상기 단계 (b)에서 수득된 종자를 모으는 단계;
- (d) 상기 단계 (c)에서 모은 종자를 식물로 성장시키는 단계; 및
- (e) 상기 단계 (d)에서 성장시킨 식물로부터 하나 이상의 *보트리티스* 내성 식물을 선발하는 단계.

청구항 46

제 45 항에 있어서,

단계 (a)에서 제공된 *보트리티스* 내성 공여체 *라이코펠시콘* 식물이 *라이코펠시콘 히르슈툼(hirsutum)*(기탁번호 LA1777)인 방법.

청구항 47

제 45 항에 있어서,

수용체 *라이펠시콘* 식물이 *라이펠시콘 에스쿨렌텀(esculentum)* 식물인 방법.

청구항 48

제 45 항에 있어서,

- (f) 단계 (e)에서 선발된 식물을 자가수분시키는 단계;
 - (g) 단계 (f)에서 자가수분시켜 수득된 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; 및
 - (h) *보트리티스* 내성 *라이펠시콘* 식물을 선발하는 단계
- 를 추가로 포함하는 방법.

청구항 49

제 45 항에 있어서,

- (f) 단계 (e)에서 선발된 식물을 단계 (b)의 수용체 *라이코펠시콘* 식물과 역교배시키는 단계;
 - (g) 단계 (f)에서 수득된 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; 및
 - (h) *보트리티스* 내성 *라이펠시콘* 식물을 선발하는 단계
- 를 추가로 포함하는 방법.

청구항 50

제 45 항 내지 제 49 항중 어느 한 항에 있어서,

단계 (e)에서 *보트리티스* 내성 식물을 병리학 질병 선발법으로 선발하는 방법.

청구항 51

제 45 항 내지 제 49 항중 어느 한 항에 있어서,

단계 (e)에서 *보트리티스* 내성 식물을 TG408, CT20, CT57 및 TG241로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 분자 표지를 사용하여 표지-이용 선발법으로 선발하는 방법.

청구항 52

제 51 항에 있어서,

단계 (e)에서 *보트리티스* 내성 식물을 하기 단계 (f) 내지 (h)를 포함하는 방법에 의해 선발하는 방법:

(f) 단계 (d)에서 성장시킨 각 *라이코펠시콘* 식물로부터 DNA를 획득하는 단계;

(g) TG408, CT20, CT57 및 TG241로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 분자 표지를 사용하여 상기 단계 (f)에서 *라이코펠시콘* 식물로부터 획득된 DNA를 분석함으로써 염색체 10 상에서 분자 표지 CD45와 CT95 사이에 위치하는, *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 함유하는 염색체 10 상의 하나 이상의 영역을 동정하는 단계; 및

(h) 단계 (d)의 식물로부터 *보트리티스* 내성을 암호화하는, 염색체 10 상에서 상기 영역을 갖는 식물을 선발하는 단계.

청구항 53

하기 단계 (a) 내지 (e)를 포함하는, 상업적으로 바람직한 표현 형질을 갖는 *보트리티스* 내성 *라이코펠시콘* 식물을 육종시키는 방법:

(a) 염색체 10 상에서 분자 표지 CD45와 CT95 사이에 위치하는, TG408, CT20, CT57 및 TG241로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 분자 표지에 의해 동정될 수 있는 *보트리티스* 내성을 암호화하는 염색체 10 상의 하나 이상의 유전자를 함유하는 영역을 포함하는 *보트리티스* 내성 공여체 *라이코펠시콘* 식물을 제공하는 단계;

(b) 상기 단계 (a)에서 제공된 *보트리티스* 내성 공여체 *라이코펠시콘* 식물을 *보트리티스*에 대하여 비내성이거나 중간 수준의 내성을 갖는 수용체 *라이코펠시콘* 식물과 교배시키는 단계;

(c) 상기 단계 (b)에서 획득된 종자를 모으는 단계;

(d) 상기 단계 (c)에서 모은 종자를 식물로 성장시키는 단계; 및

(e) 상기 단계 (d)에서 성장시킨 식물로부터 상업적으로 바람직한 표현 형질을 갖는 하나 이상의 *보트리티스* 내성 식물을 선발하는 단계.

청구항 54

제 53 항에 있어서,

단계 (a)에서 제공된 *보트리티스* 내성 공여체 *라이코펠시콘* 식물이 *라이코펠시콘* *히르슈탐*(기탁번호 LA1777)인 방법.

청구항 55

제 53 항에 있어서,

수용체 *라이펠시콘* 식물이 *라이펠시콘* *에스클렌텀* 식물인 방법.

청구항 56

제 53 항에 있어서,

(f) 단계 (e)에서 선발된 식물을 자가수분시키는 단계;

(g) 단계 (f)에서 자가수분으로 획득된 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; 및

(h) *보트리티스* 내성을 나타내며 상업적으로 바람직한 표현 형질을 갖는 *라이펠시콘* 식물을 선발하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 57

제 53 항에 있어서,

(f) 단계 (e)에서 선발된 식물을 단계 (b)의 수용체 *라이코펠시콘* 식물과 역교배시키는 단계;

(g) 단계 (f)에서 획득된 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; 및

(h) *보트리티스* 내성을 나타내며 상업적으로 바람직한 표현 형질을 갖는 *라이펠시콘* 식물을 선발하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 58

제 53 항 내지 제 57 항중 어느 한 항에 있어서,
단계 (e)에서 *보트리티스* 내성 식물을 병리학 질병 선발법으로 선발하는 방법.

청구항 59

제 53 항 내지 제 57 항중 어느 한 항에 있어서,
단계 (e)에서 *보트리티스* 내성 식물을 TG408, CT20, CT57 및 TG241로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 분자 표지를 사용하여 표지-이용 선발법으로 선발하는 방법.

청구항 60

제 53 항에 있어서,
단계 (b)에서 수용체 식물의 상업적으로 바람직한 표현 형질이 내병성 및 내충성을 포함하는 방법.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 식물 육종 및 분자 생물학에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 *보트리티스* 시네리아(*Botrytis cinerea*)에 내성을 나타내는 토마토 식물, 및 *보트리티스* 시네리아에 내성을 가지며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 새로운 동종변식, 하이브리드, 무수정 및 유전 공학 처리된 토마토 식물을 개발하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 식물의 질병인 잿빛 곰팡이병 ("*보트리티스*")은 진균인 *보트리티스* 시네리아에 의해 유발된다. 이 질병은 통상적으로 토마토의 줄기, 잎 및 열매에서 발견된다. *보트리티스*는 온실 및 밭에서 자란 토마토 모두에서 발견될 수 있지만, 상기 균은 온실에서 자란 토마토에서 더 많이 발생하는 문제이다. *보트리티스* 감염에 가장 중요한 것은 습도이다. 공기는 병원체의 발생을 위해서는 90%보다 높은 상대 습도를 가져야 한다(문헌 [Sherf, A.F., et al., *Vegetable Diseases and Their Control*, John Wiley & Sons, pgs. 645-647, 1986] 참조). 안개와 많은 이슬이 지속되는 지역이 통상적으로 비가 많은 지역보다 병원체 발생에 더 이상적이다[Sherf, A.F., et al., *Vegetable Diseases and Their Control*, John Wiley & Sons, pgs. 645-647, 1986]. *보트리티스*의 성장에 최적인 온도는 68 내지 76 °F이다. 통상적으로, 77 °F 이상에서는 감염이 드물지만, 저장한 감염된 과일은 32 °F 정도의 낮은 온도에서도 부패할 수 있다.

<3> 토마토 식물의 오래된 노화된 조직은 통상적으로 어린 조직보다 *보트리티스*의 공격에 더 민감하다. 전형적으로, 상기 질병은 치밀한 수관을 갖는 성숙한 식물과 관련된다. 잎의 병반은 담갈색 또는 회색으로 진행되어, 원형 반점들이 자라서 어린 잎 전체를 덮을 수 있다(문헌 [Disease and Pests of Vegetable Crops in Canada, An Illustrated Compendium, Edited by Howard, R., et al., *The Canadian Phytopathological Society, Entomological Society of Canada*, 1994] 참조). 병에 걸린 잎은 분생자자루 및 분생자로 덮이게 되며, 이어서 부서지고 시들어 버린다[Disease and Pests of Vegetable Crops in Canada, An Illustrated Compendium, Edited by Howard, R., et al., *The Canadian Phytopathological Society, Entomological Society of Canada*, 1994]. 진균은 병든 잎으로부터 줄기로 자라갈 것이며, 길이가 수 mm에서 수 cm에 이르는 마른 담갈색 병반을 만들 것이다[Disease and Pests of Vegetable Crops in Canada, An Illustrated Compendium, Edited by Howard, R., et al., *The Canadian Phytopathological Society, Entomological Society of Canada*, 1994]. 병반은 또한 줄기상의 잎이 떨어진 잎자국에도 형성된다[Disease and Pests of Vegetable Crops in Canada, An Illustrated Compendium, Edited by Howard, R., et al., *The Canadian Phytopathological Society, Entomological Society of Canada*, 1994]. 줄기의 병반은 또한 잿빛 곰팡이로 덮일 수 있다[Disease and Pests of Vegetable Crops in Canada, An Illustrated Compendium, Edited by

Howard, R., et al., *The Canadian Phytopathological Society, Entomological Society of Canada*, 1994]. 심한 경우에, 감염은 줄기를 박피시키고 식물을 죽인다.

- <4> 생 토마토 열매에는, 전형적으로 "고스트 반점(ghost spot)"이 나타나며 이것이 *보트리티스*의 가장 보편적인 증상이다. 상기 "고스트 반점"은 전형적으로 달무리같은 경계로 둘러싸인 연한 갈색의, 종종 부풀어진 피사성 반점이다[Disease and Pests of Vegetable Crops in Canada, An Illustrated Compendium, Edited by Howard, R., et al., *The Canadian Phytopathological Society, Entomological Society of Canada*, 1994]. 전형적으로, 일단 열매가 특정 크기, 구체적으로 직경이 약 2.5 cm에 이르면, 표면은 매끄럽고 광택이 생겨 감염에 저항하는 경향을 갖는다[Disease and Pests of Vegetable Crops in Canada, An Illustrated Compendium, Edited by Howard, R., et al., *The Canadian Phytopathological Society, Entomological Society of Canada*, 1994]. 그러나, 열매는 또한 표면, 특히 꽃받침 끝에 달라붙은 꽃 부분을 통해 감염되어, 꽃이 피는 부분의 영역에 불규칙한 갈색 병반을 야기한다.
- <5> 유감스럽게도, 전술한 "고스트 반점"은 또한 익은 열매에서도 발생할 수 있다. 게다가, 숙성한 열매는 또한 꽃받침 끝에서 시작되는 부패에 의해 영향받을 수 있다[Disease and Pests of Vegetable Crops in Canada, An Illustrated Compendium, Edited by Howard, R., et al., *The Canadian Phytopathological Society, Entomological Society of Canada*, 1994]. 열매는 수침되고 감염 부위에서 물러질 수 있다[Disease and Pests of Vegetable Crops in Canada, An Illustrated Compendium, Edited by Howard, R., et al., *The Canadian Phytopathological Society, Entomological Society of Canada*, 1994]. 반점은 직경이 약 3 cm까지 담갈색에서 회색으로 불규칙하다[Disease and Pests of Vegetable Crops in Canada, An Illustrated Compendium, Edited by Howard, R., et al., *The Canadian Phytopathological Society, Entomological Society of Canada*, 1994]. 부패된 열매는 결국 식물로부터 떨어진다.
- <6> 토마토 이외에, *보트리티스*는 또한 아스파라거스 및 양상추와 같은 광범위한 다른 채소 작물을 침범한다. 질병은 사철 식물의 임의의 지리적 영역에 존재할 수 있으며, 조건이 최적이 되면 포자가 형성된다(문헌 [Compendium of Tomato Diseases, edited by Jones, et al., APS Press, 1991] 참조). 분생자는 용이하게 바람에 날려 밭에서 밭으로 날릴 수 있다[Compendium of Tomato Diseases, edited by Jones, et al., APS Press, 1991]. 또한, 병원체는 균핵 형태로 계절마다 생존하여, 토마토 식물의 목질 조직 위에서 성장할 수 있다[Compendium of Tomato Diseases, edited by Jones, et al., APS Press, 1991]. 또한, *보트리티스*는 매우 효과적인 부생균이며, 토양중의 유기 물질은 상기 균을 품을 수 있다[Compendium of Tomato Diseases, edited by Jones, et al., APS Press, 1991]. 진균은 균핵으로부터 또는 토양중의 유기 물질로부터 성장하며, 땅 위에 떨어진 잎을 감염시킬 수 있다[Compendium of Tomato Diseases, edited by Jones, et al., APS Press, 1991].
- <7> 온실에서 자란 토마토에서 *보트리티스*의 발생을 억제하기 위해서는, 온실의 온도와 상대 습도를 밀접하게 조절해야 한다. 전형적으로, 70 °F보다 높은 온도 및 90%보다 낮은 습도는 *보트리티스*의 발생을 억제한다. 추가로, 항상, 온실에는 어느 정도의 통풍 또는 강제 통풍을 또한 이용해야 한다. 잎을 건조하게 유지하고 병원체의 발생을 억제하기 위해서는 점적 관수 또는 표면수의 사용이 중요하다.
- <8> 밭에서 자란 식물의 경우, 식물이 젖어 있는 시간을 최소화하기 위해 우수한 배수법 및 잡초 방제법을 이용해야 한다. 또한, 식물의 영양분 농도는 높게 유지해야 한다. 밭에서 자란 토마토는 영양분 농도, 특히 질소 농도가 높게 유지되는 경우 감염 및 손실이 적은 듯한 것으로 밝혀졌다(문헌 [Sherf, A.F., et al., *Vegetable Diseases and Their Control*, John Wiley & Sons, pgs. 645-647, 1986] 참조).
- <9> 온실 및 밭에서 자란 토마토 모두에서 *보트리티스*를 억제하기 위해 살진균제도 또한 사용할 수 있다. 사용할 수 있는 몇몇 살진균제의 예로는 매주 적용할 수 있는 클로로탈로닐(엑소썸 터밀(Exotherm Termil)), 및 수확후에 토마토 열매에 적용할 수 있는 도위사이드(Dowicide) A 또는 DCNA(보티언(Botyan))가 포함된다.
- <10> 현재, *보트리티스*에 의한 감염에 대해 내성을 나타내는 토마토 품종은 상업적으로 시판되는 것이 없다. 따라서, 현재 당해 분야에는 *보트리티스*에 대한 내성을 가지며 또한 바람직한 상업적 특성을 나타내는 새로운 토마토 품종에 대한 요구가 존재한다.
- <11> **발명의 요약**
- <12> 한 태양에서, 본 발명은 *보트리티스* 내성 토마토 식물을 생산하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 적어도 다음의 단계들을 포함한다: (a) 라이코펠시콘 에스쿨렌텀(*Lycopersicon esculentum*), 라이코펠시콘 세라시포메(*Lycopersicon cerasiforme*), 라이코펠시콘 펌피넬리폴리움(*Lycopersicon pimpinellifolium*), 라이코펠시콘 체

스마니(*Lycopersicon cheesmanii*), 라이코펠시콘 파비플로럼(*Lycopersicon parviflorum*), 라이코펠시콘 크미엘르브스키(*Lycopersicon chmielewskii*), 라이코펠시콘 히르슈툼(*Lycopersicon hirsutum*), 라이코펠시콘 페넬리(*Lycopersicon pennellii*), 라이코펠시콘 페루비아눔(*Lycopersicon peruvianum*), 라이코펠시콘 칠렌스(*Lycopersicon chilense*) 및 솔라넘 라이코펠시코이데스(*Solanum lycopersicoides*)로 구성된 군중에서 선택된 보트리티스 내성 공여체 식물을 동정하는 단계; (b) 보트리티스 내성 공여체 식물을, 보트리티스에 대해 비-내성이거나 중간 수준의 내성을 가지며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (c) 단계 (b)의 교배로부터 얻은 종자를 심고 상기 종자를 식물로 성장시키는 단계; (d) 단계 (c)의 식물을 자가수분시키는 단계; (e) 단계 (d)에서 자가수분시켜 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (f) 단계 (e)의 식물로부터 유전 물질을 단리하고, 보트리티스 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 연결된 염색체 10 상의 하나 이상의 영역과 관련된, 염색체 10으로부터의 하나 이상의 분자 표지를 사용하여 표지-이용 선발을 수행하는 단계; 및 (g) 보트리티스 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 연결된 염색체 10의 영역들을 포함하는, 공여체 식물로부터 유전자이입된 DNA를 함유하는 식물을 동정하는 단계. 바람직하게는, 상기 방법에 사용된 수용체 토마토 식물은 라이코펠시콘 에스콜렌텀이다.

<13> 또 다른 태양에서, 본 발명은 전술한 방법에 따라 보트리티스 내성 토마토 식물을 생산하는 방법에 관한 것이다.

<14> 또 다른 태양에 있어서, 본 발명은 보트리티스 내성 동종번식 토마토 식물을 생산하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 적어도 다음 단계들을 포함한다: (a) 라이코펠시콘 에스콜렌텀, 라이코펠시콘 세라시포메, 라이코펠시콘 펄피벨리폴리움, 라이코펠시콘 체스마니, 라이코펠시콘 파비플로럼, 라이코펠시콘 크미엘르브스키, 라이코펠시콘 히르슈툼, 라이코펠시콘 페넬리, 라이코펠시콘 페루비아눔, 라이코펠시콘 칠렌스 및 솔라넘 라이코펠시코이데스로 구성된 군중에서 선택된 보트리티스 내성 공여체 식물을 동정하는 단계; (b) 보트리티스 내성 공여체 식물을, 보트리티스에 대해 비-내성이거나 중간 수준의 내성을 가지며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (c) 단계 (b)의 교배로부터 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (d) 단계 (c)에서 수득한 식물을 자가수분시키는 단계; (e) 단계 (d)의 교배로부터 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (f) 단계 (e)의 식물로부터 유전 물질을 단리하고, 보트리티스 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 연결된 염색체 10 상의 하나 이상의 영역과 관련된, 염색체 10으로부터의 하나 이상의 분자 표지를 사용하여 표지-이용 선발을 수행하는 단계; (g) 보트리티스 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 연결된 염색체 10의 영역을 포함하는, 상기 공여체 식물로부터 유전자이입된 DNA를 함유하는 식물을 동정하는 단계; (h) 단계 (g)에서 동정한 식물을 자가수분시키는 단계; (i) 단계 (h)에서 자가수분시켜 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (j) 보트리티스 내성을 나타내며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는, 단계 (i)로부터 얻은 식물을 동정하는 단계; 및 (k) 보트리티스 내성을 나타내고 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 동종번식 토마토 식물이 수득될 때까지 단계 (h) 내지 (j)를 반복하는 단계.

<15> 또 다른 태양에서, 본 발명은 보트리티스 내성 동종번식 토마토 식물을 생산하는 두 번째 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다: (a) 라이코펠시콘 에스콜렌텀, 라이코펠시콘 세라시포메, 라이코펠시콘 펄피벨리폴리움, 라이코펠시콘 체스마니, 라이코펠시콘 파비플로럼, 라이코펠시콘 크미엘르브스키, 라이코펠시콘 히르슈툼, 라이코펠시콘 페넬리, 라이코펠시콘 페루비아눔, 라이코펠시콘 칠렌스 및 솔라넘 라이코펠시코이데스로 구성된 군중에서 선택된 보트리티스 내성 공여체 식물을 동정하는 단계; (b) 보트리티스 내성 공여체 식물을, 보트리티스에 대해 비-내성이거나 중간 수준의 내성을 가지며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (c) 단계 (b)의 교배로부터 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (d) 단계 (c)에서 수득한 식물을 단계 (b)의 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (e) 단계 (d)에서 교배시켜 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (f) 단계 (e)의 식물로부터 유전 물질을 단리하고, 보트리티스 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 연결된 염색체 10 상의 하나 이상의 영역과 관련된, 염색체 10으로부터의 하나 이상의 분자 표지를 사용하여 표지-이용 선발을 수행하는 단계; (g) 보트리티스 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 연결된 염색체 10의 영역들을 포함하는, 상기 공여체 식물로부터 유전자이입된 DNA를 함유하는 식물을 동정하는 단계; (h) 단계 (g)에서 동정한 식물을 단계 (b)의 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (i) 단계 (h)의 교배로부터 수득된 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (j) 보트리티스 내성을 나타내며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는, 단계 (i)로부터 얻은 식물을 동정하는 단계; (k) 보트리티스 내성을 나타내고 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 동종번식 토마토 식물이 수득될 때까지 단계 (h) 내지 (j)를 반복하는 단계; (l) 보트리티스 내성을 나타내며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 토마토 식물을 자가수분시키는 단계; 및 (m) 보트리티스 내성을 나타내고 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 동형접합 동종번식 토마토 식물을 선택하는

단계.

- <16> 또 다른 태양에서, 본 발명은 전술한 방법들 중 어느 하나에 의해 생산된 *보트리티스* 내성 동종번식 토마토 식물에 관한 것이다.
- <17> 다른 태양에 있어서, 본 발명은 *보트리티스*에 내성을 나타내는 하이브리드 토마토 식물에 관한 것이다. 상기 하이브리드 토마토 식물은 전술한 방법들 중 하나에 의해 수득된 동종번식 토마토 식물을 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 동종번식 토마토 식물과 교배시킴으로써 생산할 수 있다.
- <18> 또 다른 태양에서, 본 발명은 *보트리티스* 내성 토마토 식물을 생산하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 적어도 다음의 단계들을 포함한다: (a) *라이코펠시콘 에스쿨렌텀*, *라이코펠시콘 세라시포메*, *라이코펠시콘 펄피벨리폴리움*, *라이코펠시콘 체스마니*, *라이코펠시콘 파비플로럼*, *라이코펠시콘 크미엘르브스키*, *라이코펠시콘 히르슈툼*, *라이코펠시콘 페벨리*, *라이코펠시콘 페루비아넘*, *라이코펠시콘 칠렌스* 및 *솔라넘 라이코펠시코이테스*로 구성된 군중에서 선택된 *보트리티스* 내성 공여체 식물을 동정하는 단계; (b) *보트리티스* 내성 공여체 식물을, *보트리티스*에 대해 비-내성이거나 중간 수준의 내성을 가지며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (c) 단계 (b)의 교배로부터 얻은 종자를 심고 상기 종자를 식물로 성장시키는 단계; (d) 단계 (c)의 식물을 자가수분시키는 단계; (e) 단계 (d)에서 자가수분시켜 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (f) 병리학 선발법을 이용하여 *보트리티스*에 내성인 식물을 동정하는 단계. 바람직하게는, 상기 방법에 사용된 수용체 토마토 식물은 *라이코펠시콘 에스쿨렌텀*이고, 공여체 식물은 *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 연결된 염색체 10 상의 하나 이상의 영역들을 함유한다.
- <19> 또 다른 태양에 있어서, 본 발명은 *보트리티스* 내성 토마토 식물을 생산하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 적어도 다음 단계들을 포함한다: (a) *라이코펠시콘 에스쿨렌텀*, *라이코펠시콘 세라시포메*, *라이코펠시콘 펄피벨리폴리움*, *라이코펠시콘 체스마니*, *라이코펠시콘 파비플로럼*, *라이코펠시콘 크미엘르브스키*, *라이코펠시콘 히르슈툼*, *라이코펠시콘 페벨리*, *라이코펠시콘 페루비아넘*, *라이코펠시콘 칠렌스* 및 *솔라넘 라이코펠시코이테스*로 구성된 군중에서 선택된 *보트리티스* 내성 공여체 식물을 동정하는 단계; (b) *보트리티스* 내성 공여체 식물을, *보트리티스*에 대해 비-내성이거나 중간 수준의 내성을 가지며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (c) 단계 (b)의 교배로부터 얻은 종자를 심고 상기 종자를 식물로 성장시키는 단계; (d) 단계 (c)의 식물을 자가수분시키는 단계; (e) 단계 (d)에서 자가수분시켜 수득된 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (f) 단계 (e)에서 성장시킨 식물 또는 식물의 일부(예를 들면, 떨어지거나 붙어 있는 잎, 줄기 등)에 *보트리티스*를 접종하는 단계; 및 (g) *보트리티스*에 내성인, 단계 (f)에서 접종시킨 식물을 동정하는 단계. 바람직하게는, 상기 방법에 사용된 수용체 토마토 식물은 *라이코펠시콘 에스쿨렌텀*이고, 공여체 식물은 *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 연결된 염색체 10 상의 하나 이상의 영역들을 함유한다.
- <20> 다른 태양에 있어서, 본 발명은 전술한 방법에 따라 *보트리티스* 내성 토마토 식물을 생산하는 방법에 관한 것이다.
- <21> 또 다른 태양에서, 본 발명은 *보트리티스* 내성 동종번식 토마토 식물을 생산하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 적어도 하기 단계들을 포함한다: (a) *라이코펠시콘 에스쿨렌텀*, *라이코펠시콘 세라시포메*, *라이코펠시콘 펄피벨리폴리움*, *라이코펠시콘 체스마니*, *라이코펠시콘 파비플로럼*, *라이코펠시콘 크미엘르브스키*, *라이코펠시콘 히르슈툼*, *라이코펠시콘 페벨리*, *라이코펠시콘 페루비아넘*, *라이코펠시콘 칠렌스* 및 *솔라넘 라이코펠시코이테스*로 구성된 군중에서 선택된 *보트리티스* 내성 공여체 식물을 동정하는 단계; (b) *보트리티스* 내성 공여체 식물을, *보트리티스*에 대해 비-내성이거나 중간 수준의 내성을 가지며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (c) 단계 (b)의 교배로부터 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (d) 단계 (c)에서 수득한 식물을 자가수분시키는 단계; (e) 단계 (d)의 교배로부터 수득된 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (f) 병리학 선발법을 이용하여 *보트리티스*에 내성인 식물을 동정하는 단계; (g) 단계 (f)에서 동정한 식물을 자가수분시키는 단계; (h) 단계 (g)에서 자가수분시켜 수득된 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (i) *보트리티스* 내성을 나타내고 상업적으로 바람직한 특성을 갖는, 단계 (h)로부터 얻은 식물을 동정하는 단계; 및 (j) *보트리티스* 내성을 나타내며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 동종번식 토마토 식물이 수득될 때까지 단계 (h) 내지 (i)를 반복하는 단계.
- <22> 또 다른 태양에 있어서, 본 발명은 *보트리티스* 내성 동종번식 토마토 식물을 생산하는 두 번째 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) *라이코펠시콘 에스쿨렌텀*, *라이코펠시콘 세라시포메*, *라이코펠시콘 펄피벨리폴리움*, *라이코펠시콘 체스마니*, *라이코펠시콘 파비플로럼*, *라이코펠시콘 크미엘르브스키*, *라이코펠시콘 히르슈툼*, *라이코펠시콘 페벨리*, *라이코펠시콘 페루비아넘*, *라이코펠시콘 칠렌스* 및 *솔라넘 라이코펠시*

코이테스로 구성된 군중에서 선택된 보트리티스 내성 공여체 식물을 동정하는 단계; (b) 보트리티스 내성 공여체 식물을, 보트리티스에 대해 비-내성이거나 중간 수준의 내성을 가지며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (c) 단계 (b)의 교배로부터 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (d) 단계 (c)에서 수득한 식물을 단계 (b)의 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (e) 단계 (d)에서 교배시켜 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (f) 병리학 선발법을 이용하여 보트리티스에 내성인 식물을 동정하는 단계; (g) 단계 (f)에서 동정한 식물을 단계 (b)의 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (h) 단계 (g)의 교배로부터 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (i) 보트리티스 내성을 나타내며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는, 단계 (h)로부터 얻은 식물을 동정하는 단계; (j) 보트리티스 내성을 나타내고 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 동종변식 토마토 식물이 수득될 때까지 단계 (g) 내지 (i)를 반복하는 단계; (k) 보트리티스 내성을 나타내며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 토마토 식물을 자가수분시키는 단계; 및 (l) 보트리티스 내성을 나타내고 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 동형접합 동종변식 토마토 식물을 선택하는 단계.

<23> 또 다른 태양에서, 본 발명은 보트리티스 내성 동종변식 토마토 식물을 생산하는 세 번째 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 적어도 하기의 단계들을 포함한다: (a) 라이코펠시콘 에스쿨렌덤, 라이코펠시콘 세라시포메, 라이코펠시콘 펄피벨리폴리움, 라이코펠시콘 체스마니, 라이코펠시콘 파비플로럼, 라이코펠시콘 크미엘르브스키, 라이코펠시콘 히르슈툼, 라이코펠시콘 페벨리, 라이코펠시콘 페루비아눔, 라이코펠시콘 칠렌스 및 솔라넘 라이코펠시코이테스로 구성된 군중에서 선택된 보트리티스 내성 공여체 식물을 동정하는 단계; (b) 보트리티스 내성 공여체 식물을, 보트리티스에 대해 비-내성이거나 중간 수준의 내성을 가지며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (c) 단계 (b)의 교배로부터 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (d) 단계 (c)에서 수득한 식물을 자가수분시키는 단계; (e) 단계 (d)의 교배로부터 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (f) 단계 (e)에서 성장시킨 식물 또는 식물의 일부에 보트리티스를 접종하는 단계; (g) 보트리티스에 내성인, 단계 (f)에서 접종시킨 식물을 동정하는 단계; (h) 단계 (g)에서 동정한 식물을 자가수분시키는 단계; (i) 단계 (h)에서 자가수분시켜 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (j) 보트리티스 내성을 나타내며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는, 단계 (i)로부터 얻은 식물을 동정하는 단계; 및 (k) 보트리티스 내성을 나타내고 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 동종변식 토마토 식물이 수득될 때까지 단계 (h) 내지 (j)를 반복하는 단계.

<24> 다른 태양에서, 본 발명은 보트리티스 내성 동종변식 토마토 식물을 생산하는 네 번째 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 라이코펠시콘 에스쿨렌덤, 라이코펠시콘 세라시포메, 라이코펠시콘 펄피벨리폴리움, 라이코펠시콘 체스마니, 라이코펠시콘 파비플로럼, 라이코펠시콘 크미엘르브스키, 라이코펠시콘 히르슈툼, 라이코펠시콘 페벨리, 라이코펠시콘 페루비아눔, 라이코펠시콘 칠렌스 및 솔라넘 라이코펠시코이테스로 구성된 군중에서 선택된 보트리티스 내성 공여체 식물을 동정하는 단계; (b) 보트리티스 내성 공여체 식물을, 보트리티스에 대해 비-내성이거나 중간 수준의 내성을 가지며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (c) 단계 (b)의 교배로부터 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (d) 단계 (c)에서 수득한 식물을 단계 (b)의 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (e) 단계 (d)에서 교배시켜 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (f) 단계 (e)에서 성장시킨 식물 또는 식물의 일부에 보트리티스를 접종하는 단계; (g) 보트리티스에 내성인, 단계 (f)에서 접종시킨 식물을 동정하는 단계; (h) 단계 (g)에서 동정한 식물을 단계 (b)의 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (i) 단계 (h)의 교배로부터 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (j) 보트리티스 내성을 나타내며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는, 단계 (i)로부터 얻은 식물을 동정하는 단계; (k) 보트리티스 내성을 나타내고 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 동종변식 토마토 식물이 수득될 때까지 단계 (h) 내지 (j)를 반복하는 단계; (l) 보트리티스 내성을 나타내며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 토마토 식물을 자가수분시키는 단계; 및 (m) 보트리티스 내성을 나타내고 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 동형접합 동종변식 토마토 식물을 선택하는 단계.

<25> 상기 방법은 적어도 하기의 단계들을 포함한다: (a) 라이코펠시콘 에스쿨렌덤, 라이코펠시콘 세라시포메, 라이코펠시콘 펄피벨리폴리움, 라이코펠시콘 체스마니, 라이코펠시콘 파비플로럼, 라이코펠시콘 크미엘르브스키, 라이코펠시콘 히르슈툼, 라이코펠시콘 페벨리, 라이코펠시콘 페루비아눔, 라이코펠시콘 칠렌스 및 솔라넘 라이코펠시코이테스로 구성된 군중에서 선택된 보트리티스 내성 공여체 식물을 동정하는 단계; (b) 보트리티스 내성 공여체 식물을, 보트리티스에 대해 비-내성이거나 중간 수준의 내성을 가지며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (c) 단계 (b)의 교배로부터 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (d) 단계 (c)에서 수득한 식물을 자가수분시키는 단계; (e) 단계 (d)의 교배로부터 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (f) 단계 (e)에서 성장시킨 식물 또는 식물의 일부에 보트리티스를 접종하는 단계; (g) 보트리티스에 내성인, 단계 (f)에서 접종시킨 식물을 동정하는 단계; (h) 단계 (g)에서 동정한 식물을 자가수분

시키는 단계; (i) 단계 (h)에서 자가수분시켜 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (j) *보트리티스* 내성을 나타내며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는, 단계 (i)로부터 얻은 식물을 동정하는 단계; 및 (k) *보트리티스* 내성을 나타내고 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 동종번식 토마토 식물이 수득될 때까지 단계 (h) 내지 (j)를 반복하는 단계.

<26> 다른 태양에서, 본 발명은 *보트리티스* 내성 동종번식 토마토 식물을 생산하는 네 번째 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) *라이코펠시콘 에스쿨렌텀*, *라이코펠시콘 세라시포메*, *라이코펠시콘 펄피넬리폴리움*, *라이코펠시콘 체스마니*, *라이코펠시콘 파비플로럼*, *라이코펠시콘 크미엘르브스키*, *라이코펠시콘 히르슈툼*, *라이코펠시콘 페넬리*, *라이코펠시콘 페루비아눔*, *라이코펠시콘 칠렌스* 및 *솔라넨 라이코펠시코이테스*로 구성된 군중에서 선택된 *보트리티스* 내성 공여체 식물을 동정하는 단계; (b) *보트리티스* 내성 공여체 식물, *보트리티스*에 대해 비-내성이거나 중간 수준의 내성을 가지며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (c) 단계 (b)의 교배로부터 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (d) 단계 (c)에서 수득한 식물을 단계 (b)의 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (e) 단계 (d)에서 교배시켜 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (f) 단계 (e)에서 성장시킨 식물 또는 식물의 일부에 *보트리티스*를 접종하는 단계; (g) *보트리티스*에 내성인, 단계 (f)에서 접종시킨 식물을 동정하는 단계; (h) 단계 (g)에서 동정한 식물을 단계 (b)의 수용체 토마토 식물과 교배시키는 단계; (i) 단계 (h)의 교배로부터 수득한 종자를 심고 식물로 성장시키는 단계; (j) *보트리티스* 내성을 나타내며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는, 단계 (i)로부터 얻은 식물을 동정하는 단계; (k) *보트리티스* 내성을 나타내고 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 동종번식 토마토 식물이 수득될 때까지 단계 (h) 내지 (j)를 반복하는 단계; (l) *보트리티스* 내성을 나타내며 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 토마토 식물을 자가수분시키는 단계; 및 (m) *보트리티스* 내성을 나타내고 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 동형접합 동종번식 토마토 식물을 선택하는 단계.

<27> 또 다른 태양에서, 본 발명은 전술한 방법들 중 어느 하나에 의해 생산된 *보트리티스* 내성 동종번식 토마토 식물에 관한 것이다.

<28> 다른 태양에 있어, 본 발명은 *보트리티스*에 대한 내성을 나타내는 하이브리드 토마토 식물에 관한 것이다. 상기 하이브리드 토마토 식물은 전술한 방법들 중 하나에 의해 수득한 동종번식 토마토 식물을 상업적으로 바람직한 특성을 나타내는 동종번식 토마토 식물과 교배시킴으로써 생산할 수 있다.

<29> 또 다른 태양에서, 본 발명은 계놈 내에 *보트리티스* 내성과 관련된 염색체 10으로부터의 하나 이상의 유전자를 함유하는 *보트리티스* 내성 토마토 식물에 관한 것이다. 상기 *보트리티스* 내성 토마토 식물은 *라이코펠시콘 에스쿨렌텀*, *라이코펠시콘 세라시포메*, *라이코펠시콘 펄피넬리폴리움*, *라이코펠시콘 체스마니*, *라이코펠시콘 파비플로럼*, *라이코펠시콘 크미엘르브스키*, *라이코펠시콘 히르슈툼*, *라이코펠시콘 페넬리*, *라이코펠시콘 페루비아눔*, *라이코펠시콘 칠렌스* 및 *솔라넨 라이코펠시코이테스*로 구성된 군중에서 선택된다.

발명의 상세한 설명

<31> 정의

<32> 본원에 나타난 표제는 명세서 전체를 참고로 할 수 있는 본 발명의 다양한 측면 또는 태양을 제한하는 것이 아니다. 따라서, 바로 하기에서 정의하는 용어들은 명세서 전체를 참고로 하여 보다 상세히 정의된다.

<33> 본원에서 사용한 바와 같이, "대립유전자(들)"이란 용어는 한 유전자의 하나 이상의 동형(同形)을 의미하는 것으로, 상기 유전자의 대립유전자는 모두 하나의 형질 또는 특성과 관련된다. 이배체 세포 또는 유기체에서, 해당 유전자의 두 대립유전자는 한 쌍의 상동 염색체 상에 상응하는 유전자좌를 차지한다.

<34> 본원에서 사용한 바와 같이, "*보트리티스*"란 용어는 토마토의 줄기, 잎 및 열매에서 통상적으로 발견되는 질병인 잿빛 곰팡이병(gray mold) 또는 점무늬병(gray spot)으로도 알려진 *보트리티스* 시네리아를 의미한다.

<35> 본원에 사용된 바와 같이, "이형접합"이란 용어는 상동 염색체 상의 상응하는 유전자좌에 상이한 대립유전자가 존재하는 경우 나타나는 유전적 조건을 의미한다.

<36> 본원에 사용된 바와 같이, "동형접합"이란 용어는 상동 염색체 상의 상응하는 유전자좌에 동일한 대립유전자가 존재하는 경우 나타나는 유전적 조건을 의미한다.

<37> 본원에서 사용한 바와 같이, "하이브리드"란 용어는 2개의 유전학적으로 상이한 개체간 교배의 임의의 자손을 의미한다[Rieger, R., A Michaelis and M.M. Green, *A Glossary of Genetics and Cytogenetics*, Springer-

Verlag, N.Y., 1968].

- <38> 본원에 사용된 바와 같이, "중중번식체"란 용어는 실질적으로 동형접합 개체 또는 변종을 의미한다.
- <39> 본원에 사용된 바와 같이, "유전자이입된"이란 용어는 하나의 식물에서 다른 식물로 유전자가 유입 또는 도입되는 것을 의미한다. 본원에서 사용한 바와 같이, "유전자이입"이란 용어는 유전자를 하나의 식물에서 또 다른 식물로 유입 또는 도입시키는 것을 의미한다.
- <40> 본원에서 사용한 바와 같이, "분자 표지"란 용어는 제한 단편 길이 다형성(RFLP), 증폭 단편 길이 다형성(AFLP), 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP), 미소부수체(microsatellite), 서열 특성화 증폭 반복체(SCAR) 또는 이소자임 표지, 또는 특정 유전자 및 염색체 부위를 결정하는, 본원에 기술된 표지들의 조합을 의미한다.
- <41> 본원에서 사용한 바와 같이, "식물"이란 용어는 식물 세포, 식물 원형질체, 그로부터 토마토 식물이 재생될 수 있는 식물 세포 조직 배양액, 식물 유합조직(calli), 식물 세포 군집, 및 식물들에서 손상되지 않은 식물 세포, 또는 식물의 일부, 예를 들어, 배아, 화분, 배주, 꽃, 잎, 종자, 뿌리, 뿌리끝 등을 의미한다.
- <42> 본원에서 사용한 바와 같이, "개체군"이란 용어는 공통되는 유전학적 파생물을 공유하는 식물들의 유전학적 이종 집합을 의미한다.
- <43> 본원에서 사용한 바와 같이, "제한 단편 길이 다형성" 또는 "RFLP"란 용어는 특정 제한 효소에 의해 절단된 DNA 단편 크기를 갖는 개체들 사이의 변화를 의미한다. RFLP를 야기하는 다형성 서열을 물리적 지도와 유전학적 연계 지도 둘 다에 표지로 사용한다.
- <44> 본원에서 사용된 바와 같이, "토마토"란 용어는 *라이코펠시콘 에스쿨렌텀*, *라이코펠시콘 세라시포메*, *라이코펠시콘 퓌피벨리폴리움*, *라이코펠시콘 체스마니*, *라이코펠시콘 파비폴로럼*, *라이코펠시콘 크미엘르브스키*, *라이코펠시콘 히르슈툼*, *라이코펠시콘 페벨리*, *라이코펠시콘 페루비아눔*, *라이코펠시콘 칠렌스* 및 *솔라눔 라이코펠시코이데스*의 임의의 변종, 품종 또는 개체군을 의미한다.
- <45> 본원에서 사용한 바와 같이, "변종" 또는 "품종"이란 용어는 구조적 특징 및 성능에 의해 동일 종 내의 다른 변종들로부터 동정될 수 있는 유사한 식물들의 군을 의미한다.
- <46> 발명의 설명
- <47> 한 태양에 있어서, 본 발명은 신규 *보트리티스* 내성 토마토 식물 및 토마토 계통, 및 선택적 육종 기술에 본원에 기술된 분자 표지 및 유전자를 이용하여 상기 식물을 생산하는 개선된 방법에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명의 발명자들은 특정의 새로운 *보트리티스* 내성 토마토 식물을 동정하였다. 이들 토마토 식물은 *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 함유한다. 이들 유전자를 함유하지 않는 토마토 식물은 *보트리티스* 감염에 민감하다. 바람직하게는, *보트리티스* 내성을 암호화하는 유전자들중 하나 이상이 염색체 10 상에 위치한다.
- <48> *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 연결된 염색체 10 상의 하나 이상의 영역을 나타내는, 염색체 10 상에 위치한 분자 표지는 표지-이용 선발법을 이용하여 동정할 수 있으며, 상기 방법의 기술은 당해 분야에 공지되어 있다. *보트리티스* 내성을 암호화하는 적어도 하나 이상의 유전자에 연결된 염색체 10 상의 하나 이상의 영역에 연결된 것으로 여겨지는 염색체 10 상의 몇몇 표지의 예로는 TG313, CT234, CD45, TG408, CT20, CT57, TG241, CT95, TG233 및 CD32B 중 하나 이상이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다(도 1 참조).
- <49> 염색체 10 위에 전술한 유전자를 함유하는 *보트리티스* 내성 토마토 식물의 한 공급원은 *라이코펠시콘 히르슈툼* 기탁번호 LA1777이다. 기탁번호 LA1777은 페루에서 발생된 야생 토마토 종이며, 캘리포니아주 95616 데이비스 원 쉘즈 애비뉴에 소재한 유니버시티 오브 캘리포니아의 채소 작물학과 시.엠. 릭 토마토 유전학 자원 센터(C.M. Rick Tomato Genetics Resource Center, Department of Vegetable Crops, University of California)(<http://tgrc.ucdavis.edu>)에서 공개적으로 입수가능하다. *보트리티스*에 내성을 나타내며 *보트리티스* 내성을 암호화하는 유전자를 하나 이상 함유하는 기타 관련 토마토 식물은, 본 발명에 의해 이제 상기 물질의 동정이 가능하므로, 이제 사용될 수 있다. 보다 특히, 당해 분야에는, 하나보다 많은 종 및 사실상 하나보다 많은 속(Genus)에 동일한 내성 유전자가 존재할 수 있는 것으로 알려져 있다(면-멜론 진딧물(*아피스 고시피* (*Aphis gossypii*) 글로버(Glover))에 대한 내성을 부여하는 동일한 내성 유전자 *Vat*를 멜론 유전자원의 두 공급원, 인도 기탁번호 PI371795 및 한국 기탁번호 PI 161375에서 발견한 문헌 [Klinger, J. et al., *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **126**(1):56-63, 2001]; 및 클로닝된 R 유전자의 고추 동족체 *Sw-5*, *N*, *Pto*, *Prf* 및 *I2*를 다른 가지과 계통의 신테노스(syntenus) 위치에서 발견하고 몇몇 경우에는 또한 표현형으로 정의된 가지과 R. 유

전자 부근의 추가 위치로 지도화한 문헌 [Grube, R. et al., *Genetics*, **155**:873-887, 2000] 참조). 따라서, *보트리티스* 내성에 대해 시험할 수 있는 관련 토마토 종의 다른 기탁물로는 *라이코펠시콘 에스쿨렌툼*, *라이코펠시콘 세라시포메*, *라이코펠시콘 펄피벨리폴리움*, *라이코펠시콘 체스마니*, *라이코펠시콘 파비플로럼*, *라이코펠시콘 크미엘르브스키*, *라이코펠시콘 페넬리*, *라이코펠시콘 페투비아넴*, *라이코펠시콘 칠렌스* 및 *솔라넴 라이코펠시코이테스*가 포함되지만, 이로 한정되지는 않는다.

<50> *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 연결된 염색체 10 상의 하나 이상의 영역들과 관련된 것으로 확인된 분자 표지를 사용하여 *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 첫 번째 공여체 식물로부터 수용체 식물로 유전자이입시킬 수 있다. 제한하는 것이 아니라 예로서, RFLP 선발 기술을 상기 유전자이입에 이용할 수 있다. 본 발명에 따라 생육된 토마토 식물은 유리하게는 수용체 식물로부터 그 형질의 대부분을 유도할 수 있으며 첫 번째 공여체 식물로부터 *보트리티스* 내성을 유도할 수 있다.

<51> 본 발명의 한 태양에 따르면, *보트리티스* 내성을 암호화하는 유전자는 내성 정량적 형질 유전자좌에 연결된 분자 표지를 동정함으로써 지도화할 수 있는데, 상기 지도화는 표현형 기록을 위해 *보트리티스*에 내성인 동종변식 토마토 식물과 민감한 동종변식 토마토 식물의 조합을 이용한다. 상기 계통의 분자 특성화는 몬포르테 및 단슬리(Monforte and Tanksley)가 문헌 [*Genome*, **43**:803-813, 2000]에서 설명한 기술을 이용하여 수행할 수 있다. 제한하는 것이 아닌 예로서, *보트리티스* 내성 표현형과 표지 유전자형 사이의 연계는 소프트웨어 패키지를 이용하여 회귀 분석법으로 조사할 수 있다[Nelson C.J., "QGENE: Software for Marker-Based Genomic Analysis and Breeding", *Molecular Breeding*, 3:239-245, 1997].

<52> 본 발명의 두 번째 태양에서, 본 발명은 우수한 새로운 *보트리티스* 내성 토마토 식물을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법에서는, *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 *보트리티스*에 내성인 공여체 어버이 식물로부터 *보트리티스* 감염에 대해 비-내성이거나 또는 중간 수준의 내성을 갖는 수용체 토마토 식물내로 유전자이입시킨다. 본 발명의 방법에 따라 수득된 *보트리티스* 내성 토마토 식물은 동종변식체, 하이브리드, 반수체, 무수정체 또는 유전 공학처리된 토마토 식물일 수 있다.

<53> *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 *보트리티스*에 대해 비-내성이거나 중간 수준의 내성을 갖는 수용체 토마토 식물내로 유전자이입시키는 것은 당해분야에 공지된 기술을 이용하여 수행할 수 있다. 예를 들면, 전통적인 육종 기술, 유전 공학 또는 원형질 융합을 이용하여 *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 *보트리티스*에 비-내성이거나 중간 수준의 내성을 갖는 수용체 토마토 식물내로 유전자이입시킬 수 있다.

<54> 상기에서 간략히 논의한 바와 같이, 전통적인 육종 기술을 이용하여 *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 *보트리티스*에 비-내성이거나 또는 중간 수준의 내성을 갖는 수용체 토마토 식물내로 유전자이입시킬 수 있다. 계통 육종법으로 불리는 한 방법에서는, *보트리티스*에 내성을 나타내며 *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 함유하는 제 1 토마토 식물을, *보트리티스*에 비-내성이거나 또는 중간 수준의 내성을 가지며 내병성, 내충성, 유용한 과일 특성 등(이로 제한되지는 않는다)과 같은 상업적으로 바람직한 특성을 나타내는 제 2의 토마토 식물과 교배시킨다. 그 다음, 수득된 식물 개체군(F1 하이브리드이다)을 자가-수분시키고 종자(F2 종자)를 뿌린다. 이어서, F2 종자로부터 성장한 F2 식물을 *보트리티스*에 대한 내성에 대해 선발한다. 개체군은 많은 다양한 방법으로 선발할 수 있다. 첫째로, 통상적인 병리학 질병 선발법을 이용하여 선발할 수 있다. 상기 병리학 질병 선발법은 당해 분야에 공지되어 있다. 구체적으로, 개개 식물 또는 그의 일부분을 배양기 또는 온실에서 *보트리티스*로 공격하고 각 식물의 수득된 내성 또는 민감성 표현형을 기록할 수 있다. 제한하는 것이 아닌 예로서, 식물은 다음과 같이 온실에서 선발할 수 있다.

<55> 먼저, 토마토 종자를 심고 온실(이하, "GH")에서 모종으로 성장시킨다(약 6 주의 시간). 계통당 총 30개의 식물에 대해 각각 10개의 식물로 3회 반복하여 평가한다. 잎, 줄기, 꽃 및 열매를 1 내지 5의 질병 등급 스케일(1=내성 및 5=민감성)을 이용하여 따로따로 등급을 매길 수 있다. 식목한지 10 주후에 *보트리티스*의 분생자 현탁액(1,000,000 분생자/ml)을 식물에 접종한다. 줄기 및 열매 상에 질병의 발생을 증대시키기 위해 두 번째 접종이 필요할 수 있다.

<56> 접종한지 1주일후에 다음의 질병 등급 스케일(1=내성 및 5=민감성)을 이용하여 잎을 *보트리티스* 포자형성 및 병반 발생에 대해 평가할 수 있다:

<57> 1 - 증상 없음.

<58> 2 - 1 내지 2개 잎에 괴사 및 포자형성 존재.

- <59> 3 - 잎의 10%에 괴사 및 포자형성 존재.
- <60> 4 - 잎의 20%에 괴사 및 포자형성 존재.
- <61> 5 - 20%보다 많은 잎에 괴사 및 포자형성 존재.
- <62> 집중한 지 4 주일후에 다음의 질병 등급 스케일(1=내성 및 5=민감성)을 이용하여 줄기를 *보트리티스* 포자형성 및 병반 발생에 대해 평가할 수 있다:
- <63> 1 - 증상 없음.
- <64> 2 - 줄기에 한정된 표면 병반.
- <65> 3 - 한정된 포자형성과 함께 직경 10 mm에 이르는 병반.
- <66> 4 - 포자형성으로 수축된, 직경 40 mm에 이르는 병반.
- <67> 5 - 포자형성으로 수축된, 직경 40 mm보다 큰 병반 또는 줄기가 완전히 박피됨.
- <68> 3개 이상의 꽃송이가 생기면 다음의 질병 등급 스케일(1=내성 및 5=민감성)을 이용하여 꽃을 *보트리티스* 시네리아 질병 발생 및 포자형성에 대해 평가할 수 있다:
- <69> 1 - 증상 없음.
- <70> 2 - 한 송이에서 꽃의 50% 미만에 꽃 이탈, 괴사 및/또는 포자형성.
- <71> 3 - 두 송이 이상에서 꽃의 50% 미만에 꽃 이탈, 괴사 및/또는 포자형성.
- <72> 4 - 두 송이 이상에서 꽃의 50 내지 75%에 꽃 이탈, 괴사 및/또는 포자형성.
- <73> 5 - 모든 송이에서 꽃의 75% 이상에 꽃 이탈, 괴사 및/또는 포자형성.
- <74> 열매의 50%가 성장 정지 단계에 이르면 다음의 질병 등급 스케일(1=내성 및 5=민감성)을 이용하여 열매를 *보트리티스* 병반 발생에 대해 평가할 수 있다:
- <75> 1 - 증상 없음.
- <76> 2 - 꽃자루에만 병반.
- <77> 3 - 하나의 열매에서만 병반 발생.
- <78> 4 - 식물 당 4개 이하의 열매에서 병반 발생.
- <79> 5 - 식물 당 4개 이상의 열매에서 병반 발생.
- <80> 두 번째로, *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 함유하는 하이브리드 식물을 확인하기 위해 하나 이상의 전술한 분자 표지를 사용하여 표지-이용 선발법을 수행할 수 있다. 또는, 표지-이용 선발법을 이용하여 병리학 선발법으로부터 획득된 결과를 확인할 수 있다.
- <81> *보트리티스* 내성 표현형을 나타내는 F2 하이브리드 식물은 *보트리티스* 내성을 암호화하는 필수 유전자를 함유하며 상업적으로 바람직한 특성을 가지므로, 토마토 식물이 점점 동종변식체가 되도록 하기 위해 다수의 세대에 대해 선택하고 자가수분시킨다. 상기 연속 자가수분 및 선택 과정은 5세대 이상에 대해 수행할 수 있다. 상기 육종 및 선택의 결과로 *보트리티스* 내성과 관련된 유전자, 및 상업적으로 주목되는 형질과 관련된 다른 유전자들에 대해 유전학적으로 동종인 계통이 생산된다.
- <82> 또는, 순환 선발법 및 역교배를 이용하여 새롭고 우수한 *보트리티스* 내성 동종변식 토마토 식물 계통을 발생시킬 수 있다. 상기 방법에서는, 순환 어버이(recurrent parent)를 제 1 공여체 식물(순환 어버이와는 다르며 본원에서는 "비-순환 어버이"로 지칭함)과 교배시켜 *보트리티스* 내성을 표적 수용체 식물(순환 어버이로 칭함)로 유전자이입시킬 수 있다. 순환 어버이는 *보트리티스*에 대해 비-내성이거나 또는 중간 수준의 내성을 가지며 내병성, 내충성, 유용한 과일 특성 등(이로 한정되지는 않는다)과 같은 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 식물이다. 비-순환 어버이는 *보트리티스* 내성을 나타내며 *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 함유한다. 비-순환 어버이는 순환 어버이와 타가-수정되는 임의의 식물 변종 또는 동종변식 계통일 수 있다. 순환 어버이와 비-순환 어버이간의 교배로부터 획득된 자손을 순환 어버이에 역교배시킨다. 이어서, 획득된 식물 개체군을 선발한다. 개체군은 많은 다양한 방법으로 선발할 수 있다. 첫째로, 본원에서 전술한 바와 같은 전통

적인 병리학 선발법을 이용하여 개체군을 선발할 수 있다.

- <83> 두 번째로, *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 함유하는 자손을 동정하기 위해 하나 이상의 전술한 분자 표지를 사용하여 표지-이용 선발법을 수행할 수 있다. 또는, 표지-이용 선발법을 이용하여 병리학 선발법으로부터 수득된 결과를 확인할 수 있다.
- <84> 일단 적절하게 선발이 되면, 과정을 반복한다. 순환 어버이에 역교배시키고 *보트리티스* 내성에 대해 선발하는 과정을 약 5 세대 이상 반복한다. 상기 과정으로부터 수득된 자손은 *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 대해 이형접합성이다. 그 다음, *보트리티스* 내성에 대해 동형접합의 순수한 육종 자손을 제공하기 위해 마지막 역교배 세대를 자가수분시킨다.
- <85> 본원에 기술된 *보트리티스* 내성 동종변식 토마토 계통을 추가의 교배에 이용하여 *보트리티스* 내성 하이브리드 식물을 생산할 수 있다. 예를 들면, 제 1 *보트리티스* 내성 동종변식 토마토 식물을 내병성, 내충성, 유용한 과일 특성 등(이로 한정되지 않는다)과 같은 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 제 2의 동종변식 토마토 식물과 교배시킬 수 있다. 상기 제 2의 동종변식 토마토 계통은 *보트리티스*에 대해 내성이거나 아닐 수 있다.
- <86> 전술한 방법에 사용된 표지-이용 선발법은, 예를 들면, 단계적으로 수행할 수 있거나(이때는, 상이한 *보트리티스* 내성 유전자를 하나보다 많은 세대에서 선택한다); 또는 대안적인 예로서, 상기 선발법을 동시에 수행할 수 있다(이때는 모든 내성 유전자를 동일 세대에서 선택한다). *보트리티스* 내성에 대한 표지-이용 선발법은, 내병성, 내충성, 유용한 과일 특성 등과 같은 다른 상업적으로 바람직한 특성에 대한 시험 및 선발 전에, 그와 함께 또는 그 후에 수행할 수 있다.
- <87> 또 다른 태양으로, 본 발명은 *보트리티스* 내성을 암호화하는 토마토로부터 하나 이상의 유전자를 동정, 단리 및 정제하는 것에 관한 것이다. 그로부터 상기 유전자(들)를 단리할 수 있는 물질의 공급원은 *라이코필콘 허프 슈툼* 기탁번호 LA1777이다. 추가로, 본 발명은 *보트리티스* 감염에 내성을 나타내는 유전자도입 식물을 제공하기 위해 상기 단리되고 정제된 유전자를 당해 분야에 공지된 기술을 이용하여 토마토 또는 다른 식물에 삽입시키는 것을 또한 포함한다.
- <88> 식물의 형질전환은 식물 세포에서 작용할 발현 벡터의 구축을 포함한다. 본 발명에서는, 상기 벡터는 프로모터와 같은 조절 요소의 제어하에 있거나 또는 상기 요소에 작용가능하게 연결된 *보트리티스* 내성을 암호화하는 유전자를 포함하는 DNA를 포함한다. 상기 발현 벡터는 하나 이상의 상기 작용가능하게 연결된 유전자/조절 요소 조합을 포함할 수 있으나, 단, 상기 조합에 포함된 유전자 중 적어도 하나는 *보트리티스* 내성을 암호화한다. 벡터(들)은 플라스미드의 형태일 수 있으며, 단독으로 또는 다른 플라스미드와 함께 사용되어 전술한 형질전환 방법을 이용하여 *보트리티스*에 내성인 유전자도입 식물을 제공할 수 있다.
- <89> 발현 벡터는 표지를 함유하는 형질전환 세포가 음성 선발에 의해(선택성 표지 유전자를 함유하지 않는 세포의 성장을 억제함으로써), 또는 양성 선발에 의해(유전자 표지가 암호화하고 있는 산물을 선발함으로써) 회수될 수 있게 하는 조절 요소(예를 들면, 프로모터)에 작용가능하게 연결된 하나 이상의 유전자 표지를 포함할 수 있다. 식물의 형질전환에 통상적으로 사용되는 많은 선택성 표지 유전자는 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면, 항생제 또는 제초제일 수 있는 선택적 화학 약제를 대사적으로 해독시키는 효소를 암호화하는 유전자, 또는 억제제에 둔감한 변형된 표적을 암호화하는 유전자를 포함한다. 만노스 선발법과 같은 여러 양성 선발 방법이 당해 분야에 공지되어 있다. 또는, 표지가 없는 형질전환법을 이용할 수 있으며, 그 기술은 당해 분야에 공지되어 있다.
- <90> 식물 형질전환에 통상적으로 사용되는 선택성 표지 유전자의 한 예는 트랜스포존(transposon) Tn5로부터 단리된 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 II(npt II) 유전자로서, 상기 유전자는 식물 조절 신호에 의해 제어될 때 카나마이신에 대한 내성을 부여한다(문헌 [Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**:4803, 1983] 참조). 통상적으로 사용되는 또 다른 선택성 표지 유전자는 항생제 하이그로마이신에 대한 내성을 부여하는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 유전자이다(문헌 [Vanden Elzen et al., *Plant Mol. Biol.*, **5**:299, 1985] 참조). 사용될 수 있는 다른 선택성 표지의 예로는 베타-글루쿠로니다제(GUS), 베타-갈락토시다제, 루시퍼라제 및 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제가 포함된다.
- <91> 발현 벡터는 프로모터와 같은 조절 요소를 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 유도되어야 한다. 단독으로 또는 프로모터와 함께 사용될 수 있는 다른 조절 요소들과 같이, 여러 유형의 프로모터들이 당해 분야에 공지되어 있다. 본원에서 사용한 바와 같이, "프로모터"는 전사 개시점으로부터 업스트림(upstream)에 위치하고, RNA 폴리머라제 및 전사를 개시하는 다른 단백질의 인식 및 결합에 관여하는 DNA 영역을 의미한다. "식물 프로모터"

는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. 발달에 의해 제어되는 프로모터의 예로는 잎, 뿌리, 종자, 섬유, 물관, 가도관 또는 후막조직과 같은 특정 조직에서 우선적으로 전사를 개시하는 프로모터가 포함된다. 상기 프로모터는 "조직-우선적"이라 칭한다. 특정 조직에서만 전사를 개시하는 프로모터는 "조직-특이적"이라 칭한다. "세포 유형" 특이적 프로모터는 주로 하나 이상의 기관, 예를 들면, 뿌리 또는 잎의 유관속 세포에서 특정 세포 유형의 발현을 유도한다. "유도성" 프로모터는 환경에 의해 제어되는 프로모터이다. 유도성 프로모터에 의한 전사를 수행할 수 있는 환경 조건의 예로는 혐기성 조건 또는 빛의 존재가 포함된다. 조직-특이적, 조직-우선적, 세포 유형 특이적 및 유도성 프로모터는 "비-구성(non-constitutive)" 프로모터 부류를 이룬다. "구성(constitutive)" 프로모터는 대부분의 환경 조건하에서 활성인 프로모터이다.

- <92> 유도성 프로모터는 토마토에서의 발현시 *보트리티스* 내성을 암호화하는 단리 및 정제된 유전자에 작용가능하게 연결된다. 유도성 프로모터를 이용하여, 전사 속도는 유도제에 대응하여 증가한다. 본 발명에는 어떤 유도성 프로모터도 사용할 수 있다.
- <93> 구성 프로모터는 토마토에서 발현시 *보트리티스* 내성을 암호화하는 단리 및 정제된 유전자에 작용가능하게 연결될 수 있다. 여러 상이한 구성 프로모터들이 당해 분야에 공지되어 있으며 본 발명에 사용할 수 있다. 본 발명에 사용할 수 있는 구성 프로모터의 예로는 CaMV로부터의 19S 또는 35S 프로모터와 같은 식물 바이러스 유래 프로모터가 포함되나, 이로 한정되지는 않는다(문헌 [Ode11 et al., *Nature*, **313**:810-812, 1985] 참조).
- <94> 조직-특이적 프로모터는 토마토에서 발현시 *보트리티스* 내성을 암호화하는 단리 및 정제된 유전자에 작용가능하게 연결된다. 조직-특이적 프로모터에 작용가능하게 연결된 *보트리티스* 내성을 암호화하는 단리 및 정제된 유전자로 형질전환된 식물은 특정 조직에서 독점적으로 또는 우선적으로 도입유전자의 단백질 산물을 생성한다.
- <95> 본 발명에는 어떠한 조직-특이적 또는 조직-우선적 프로모터도 사용할 수 있다. 조직-특이적 또는 조직-우선적 프로모터의 예로는 캐브(cab) 또는 루비스코(rubisco)로부터의 프로모터와 같은 잎-특이적 및 광-유도 프로모터가 포함되나, 이로 한정되지는 않는다(문헌 [Simpson et al., *EMBO J.*, **4(11)**:2723-2729, 1985; and Timko et al., *Nature*, **318**:579-582, 1985] 참조).
- <96> 생물학적 및 물리적 식물 형질전환 프로토콜을 포함하여 식물의 형질전환에 대한 많은 방법들이 개발되었다(예를 들면, 미키(Miki) 등의 문헌 [Miki et al., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B.R. and Thompson, J.E. Eds.(CRC Press, Inc., Boca Raton), pages 67-88, 1993] 참조). 또한, 식물 세포 또는 조직 형질전환 및 식물의 재생을 위한 발현 벡터 및 시험관내 배양법도 이용할 수 있다(그루버(Gruber) 등의 문헌 [Gruber et al., "Vectors for Plant Transformation" in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B.R. and Thompson, J.E. Eds.(CRC Press, Inc., Boca Raton), pages 89-119, 1993] 참조).
- <97> 식물에 발현 벡터를 도입하는 한가지 방법은 *아그로박테리움(Agrobacterium)*의 천연 형질전환 시스템을 기초로 한다(문헌 [Horsch et al., *Science*, **227**:1229, 1985] 참조). *아그로박테리움 투메파시엔시스(A. tumefaciens)* 및 *아그로박테리움 리조게네스(A. rhizogenes)*는 식물 세포를 유전적으로 형질전환시키는 식물 병원성 흙 박테리아이다. *아그로박테리움 투메파시엔시스* 및 *아그로박테리움 리조게네스*의 Ti 및 Ri 플라스미드는 각각 식물의 유전자 형질전환을 일으키는 유전자를 지닌다(문헌 [Kado, C.I., *Crit. Rev. Plant. Sci.*, **10**:1, 1991] 참조). *아그로박테리움-매개* 유전자 전이에 대한 *아그로박테리움* 벡터 시스템 및 방법은 그루버(Gruber) 등의 상기 문헌, 미키(Miki) 등의 상기 문헌 및 몰로니(Moloney) 등의 문헌 [Moloney et al., *Plant Cell Reports*, **8**:238, 1989]에 나와 있다(1997년 1월 7일자로 허여된 미국 특허 제 5,591,616 호 참조).
- <98> 식물에 발현 벡터를 도입하는 또 다른 방법은 DNA가 미세분사체(microprojectile)의 표면위에 존재하는 미세분사체-매개 형질전환법을 기초로 한다. 발현 벡터는 식물 세포벽 및 세포막을 관통하기에 충분한 300 내지 600 m/s의 속도로 미세분사체를 가속시키는 바이오리스틱(biolistic) 장치를 사용하여 식물 조직내로 도입된다(문헌 [Sanford et al., *Part. Sci. Technol.*, **5**:27, 1987; Sanford, J.C., *Trends Biotech.*, **6**:299, 1988; Klein et al., *Bio/Technology*, **6**:559-563, 1988; Sanford, J.C., *Physiol Plant*, **79**:206, 1990; Klein et al., *Biotechnology*, **10**:268, 1992] 참조).
- <99> DNA를 식물에 도입하는 또 다른 방법은 표적 세포의 초음파처리에 의한 것이다(문헌 [Zhang et al., *Bio/Technology*, **9**:996, 1991] 참조). 또는, 리조솜 또는 스페로플라스트 융합을 이용하여 발현 벡터를 식물에 도입하였다(문헌 [Deshayes et al., *EMBO J.*, **4**:2731, 1985; Christou et al., *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**:3962, 1987] 참조). CaCl₂ 침전법, 폴리비닐 알콜 또는 폴리-L-오르니틴을 이용하여 DNA를 원형질체에

직접 흡수시키는 방법도 또한 보고되었다(문헌 [Hain et al., *Mol. Gen. Genet.*, **199**:161, 1985; and Draper et al., *Plant Cell Physiol.*, **23**:451, 1982] 참조). 원형질체 및 전체 세포와 조직의 전기천공법도 또한 기술되어 있다[Donn et al., In *Abstracts of VIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC*, A2-38, p53, 1990; D'Halluin et al., *Plant Cell*, **4**:1495-1505, 1992; and Spencer et al., *Plant Mol. Biol.*, **24**:51-61, 1994].

<100> 토마토 표적 조직의 형질전환에 이어, 전술한 선택성 표지 유전자의 발현에 의해 현재 당해 분야에 공지되어 있는 재생 및 선발 방법을 이용하여 형질전환 세포, 조직 및/또는 식물의 우선적 선발이 가능하다.

<101> 전술한 형질전환 방법은 *보트리티스* 내성을 암호화하는 외래(이종) 유전자(들)를 함유하는 유전자도입 토마토 식물 또는 기타 식물 중, 예를 들면, 채소(즉, 아스파라거스, 양상추 등), 과일(즉, 딸기) 또는 관상 식물(즉, 아프리카 바이올렛(African Violet), 베고니아(Begonias), 부겐빌리아(Bougainvillea), 시클라멘(Cyclamen), 달리아(Dahlia), 제라늄(Geranium), 차이니즈 하이비스커스(Chinese Hibiscus), 봉선화(Impatiens), 칼란초(Kalanchoe), 관상용 고추(Ornamental Pepper), 페르시아 바이올렛(Persian Violet), 앵초(Primrose), 포인세티아(Poinsettia), 버베나(Verbena), 빈카(Vinca 등)(이로 한정되지는 않는다)을 생산하는데 이용할 수 있다. 이어서, *보트리티스* 감염에 내성인 토마토 또는 기타 식물 중의 유전자도입 하이브리드를 제조하기 위해, 상기 유전자도입 식물을 또 다른 (비-형질전환 또는 형질전환) 식물과 교배시킬 수 있다. 또는, 본원에 기술된 형질전환 기술을 이용하여 *보트리티스* 내성을 암호화하는 상기 외래(이종) 유전자(들)를 함유하도록 유전공학처리된 유전자도입 토마토 또는 기타 식물 중에서 *보트리티스* 내성에 대한 외래(이종) 유전자는 당해 분야에 공지되어 있는 통상적인 육종 기술(예를 들면, 역교배법)을 이용하여 또 다른 식물로 전달될 수 있다. 예를 들면, 본원에서 전술한 바와 같이, 역교배를 이용하여, *보트리티스* 내성을 암호화하는 외래(이종) 유전자를 함유하는 유전자도입 *보트리티스* 내성 동종변형 토마토 또는 기타 식물 계통으로부터 상기 유전자를 함유하지 않는 비-내성 토마토 식물 또는 기타 작물로 *보트리티스* 내성을 유전자이입하거나, 또는 *보트리티스* 내성을 암호화하는 외래 유전자를 함유하는 유전자도입 하이브리드 *보트리티스* 내성 토마토 식물 또는 기타 식물로부터 상기 유전자를 함유하지 않는 계통(들)로 *보트리티스* 내성을 유전자이입시킬 수 있다.

<102> 또 다른 태양에서는, 원형질체 융합을 이용하여 우수하고 새로운 *보트리티스* 내성 식물을 생산할 수 있다. 보다 구체적으로, *보트리티스* 감염에 내성을 나타내며 본원에 기술된 유전자를 함유하는 토마토 식물 또는 기타 식물 계통으로부터 첫 번째 원형질체를 수득할 수 있다. 예를 들면, 라이코펠시콘 히르슈펠트 기탁번호 LA1777로부터 얻은 원형질체를 사용할 수 있다. 내병성, 내충성, 유용한 과일 특성 등(이로 한정되지는 않는다)과 같은 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 제 2의 토마토 또는 기타 식물 변종으로부터 제 2의 원형질체를 수득할 수 있다. 이어서, 당해 분야에 공지된 통상적인 원형질체 융합 절차를 이용하여 원형질체를 융합시킨다. 예를 들면, 원형질체 융합은 막의 융합을 촉진하기 위해 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 용액을 사용함으로써 수행할 수 있다. 상기 체세포 하이브리드화는 종간 하이브리드 또는 그의 변이체의 생산에 대해 선버그(Sundberg) 등이 개시한 조건[*Plant Science*, **43**:155, 1986] 하에서 수행할 수 있다. 그러나, 당해 분야에 숙련된 자라면 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 사용하는 것 이외에 다른 방법으로 원형질체 융합을 수행할 수 있음을 인지할 것이다. 예를 들면, 원형질체는 쿠프(Koop) 등이 문헌 ["Electric Field-Induced Fusion and Cell Reconstruction-with Preselected Single Protoplasts and Subprotoplasts of Higher Plants" in *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, Neuman et al., editors, pgs. 255-265, 1989]에서 기술한 바와 같이 전기장-유도 융합 기술을 이용하여 융합할 수 있다. 또한, 원형질체 융합은 홉트만(Hauptmann) 등이 문헌 ["Carrot x Tobacco Somatic Cell Hybrids Selected by Amino Acid Analog Resistance Complementation", 6th International Protoplast Symposium, Basel, Switzerland, Aug. 12-16, 1983]에서 기술한 바와 같이 텍스트란 및 폴리비닐 알콜을 사용하여 수행할 수 있다.

<103> 또 다른 태양으로, 본 발명은 토마토 식물, 또는 토마토 종자에서 *보트리티스* 내성의 존재 또는 부재 여부를 결정하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 연결된 염색체 상의 하나 이상의 영역과 관련된 하나 이상의 분자 표지의 존재에 대해 식물 또는 종자에서 얻은 DNA를 분석함을 포함한다. 보다 구체적으로, 분자 표지는 바람직하게는 염색체 10으로부터 유래하며, *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 연결된 염색체 10 상의 하나 이상의 영역들을 확인하는데 이용한다. 상기 표지의 예로는 다음 중 하나 이상이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다: 염색체 10 상의 TG313, CT234, CD45, TG408, CT20, CT57, TG241, CT95, TG233 및 CD32B. 상기 방법에 따르면, 분석은 RFLP 분석법으로 토마토 식물 또는 종자를 분석함을 포함한다.

<104> 또 다른 태양에 있어, 본 발명은 전술한 방법에 따라 생산된 종자, 식물 및/또는 식물 계통에 관한 것이다. 보

다 특히, 본 발명은 제 1 식물 계통으로부터 얻은, 식물 계통에 *보트리티스* 내성을 부여하는 제 1 게놈 DNA; 및 식물 계통에 다른 목적하는 특성을 부여하는, 제 2 식물 계통으로부터 얻은 제 2 게놈 DNA를 포함하는, 선택적 육종법으로부터 유도된 *보트리티스* 내성 토마토 식물, 또는 식물 계통, 예를 들면, 채소(즉, 아스파라거스, 양상추 등), 과일(즉, 딸기) 또는 관상 식물(즉, 아프리카 바이올렛, 베고니아, 부겐빌리아, 시클라멘, 달리아, 제라늄, 차이니즈 하이비스커스, 봉선화, 칼란초, 관상용 고추, 페르시안 바이올렛, 앵초, 포인세티아, 버베나, 빈카 등)(이로 한정되지는 않는다)에 관한 것이다. 본 발명의 상기 태양에 따르면, 토마토에서, 첫 번째 분량의 게놈 DNA는 *보트리티스* 내성을 암호화하는 하나 이상의 유전자에 연결된 염색체 10 상의 하나 이상의 영역과 연관되는 염색체 10으로부터의 분자 표지를 포함한다. 보다 특히, 토마토에서, 분자 표지는 염색체 10 상의 TG313, CT234, CD45, TG408, CT20, CT57, TG241, CT95, TG233 및 CD32B 중 하나 이상을 포함하나, 이로 한정되지는 않는다.

<105> 이제, 제한하는 것이 아닌 예로서, 본 발명의 실시예를 나타낸다.

실시예

<106> 실시예 1: 라이코펠시콘 히르슈툼 x 라이코펠시콘 에스쿨렌툼 근 동질유전자 계통에서의 *보트리티스*에 대한 내성

<107> 하기의 *라이코펠시콘 히르슈툼* x *라이코펠시콘 에스쿨렌툼* 근 동질유전자 계통(near isogenic line, 이하, "NIL")의 종자를 2000 년에 온실 조건하에서의 내성 평가를 위해 이탈리아 라티나로 보내었다. 종자를 이식 트레이에서 흙에 심고 20 내지 24 °C의 온실에서 약 6 주간 성장시켰다. 구체적으로, 종자는 다음 계통으로부터 취하였다: LA1777, TA1551, TA1330, TA1276, TA1105, TA1277, TA1287, TA1541, TA1324, TA517, TA1266, TA1544, TA1316, TA1539, TA1121, TA1112, TA1545, TA1562, TA1258, TA1304, TA1280, TA1548, TA1127, TA1535, TA1540 및 E6203. 모든 계통은 캘리포니아 95616 데이비스 윈 쉘즈 애비뉴에 소재한 유니버시티 오브 캘리포니아의 채소 작물학과의 시.엠. 릭 토마토 유전 자원 센터(<http://tgrc.ucdavis.edu>)에서 공개적으로 입수가능하다.

<108> 식목한지 약 6 주후에 모종을 온실(이하, "GH")로 이식하였다. 계통당 총 30개 식물에 대해 각각 10개 식물씩 3회 반복하여 평가하였다. 잎과 줄기는 1 내지 5의 질병 등급 스케일(1=내성 및 5=민감성)을 이용하여 별도로 등급을 매겼다.

<109> 식목한지 4 주후에 *보트리티스* 시네리아의 분생자 현탁액(1,000,000 분생자/ml)을 식물에 접종한다. 줄기 상에 질병의 발생을 증대시키기 위해 첫 번째 접종한지 5 주후에 두 번째 접종을 하였다.

<110> 접종한 지 1 주일후에 다음의 질병 등급 스케일(1=내성 및 5=민감성)을 이용하여 잎을 *보트리티스* 시네리아 포자형성 및 병반 발생에 대해 평가하였다:

<111> 1 - 증상 없음.

<112> 2 - 1 내지 2개 잎에 피사 및 포자형성 존재.

<113> 3 - 잎의 10%에 피사 및 포자형성 존재.

<114> 4 - 잎의 20%에 피사 및 포자형성 존재.

<115> 5 - 20%보다 많은 잎에 피사 및 포자형성 존재.

<116> 접종한 지 4 주후에 다음의 질병 등급 스케일(1=내성 및 5=민감성)을 이용하여 줄기를 *보트리티스* 시네리아 포자형성 및 병반 발생에 대해 평가하였다:

<117> 1 - 증상 없음.

<118> 2 - 줄기에 한정된 표면 병반.

<119> 3 - 한정된 포자형성과 함께 직경 10 mm에 이르는 병반.

<120> 4 - 포자형성으로 수축된, 직경 40 mm에 이르는 병반.

<121> 5 - 포자형성으로 수축된, 직경 40 mm보다 큰 병반 또는 줄기가 완전히 박피됨.

<122> 하기 표 1 및 2는 보트리티스 시네리아에 의한 감염에 대한 라이코펠시콘 히르슈툼으로부터 취한 다양한 유전자 이입 단편을 함유하는 라이코펠시콘 에스클렌툼 근 동질유전자 계통으로부터 얻은 잎과 줄기의 질병 등급을 나타낸 것이다:

【표 1】

<123>

2000년 6월에 온실 조건하에서 곰팡이 질병인 잿빛 곰팡이병에 대한 내성에 대해 선 발된 LA1777 유전자이입 계통의 평균 잎 질병 등급				
NIL ¹	염색체 ²	평균 잎 등급 ³	N ⁴	p 값 ⁵
TA1551	10	2.8	30	0.065
TA1330	9	3.4	30	0.120
TA1105	2	3.5	30	0.170
TA1544	5	3.6	28	0.093
TA1316	8	3.6	27	0.480
TA1539	6	3.6	26	0.090
TA1277	3	3.6	30	0.396
TA1287	5	3.8	30	0.376
TA1121	12	3.8	20	0.632
TA1112	5	3.8	30	0.439
TA1545	6	4.0	27	0.955
TA1562	4	4.1	29	0.806
TA1258	1	4.1	30	0.855
TA1304	7	4.1	26	0.824
TA1541	3	4.1	30	0.657
TA1324	9	4.1	30	0.686
TA1280	4	4.1	22	0.553
TA1548	8	4.2	30	0.521
TA1127	1	4.2	30	0.486
TA1535	1	4.2	21	0.270
TA517	4	4.3	29	0.543
TA1276	3	4.4	29	0.241
TA1266	2	4.5	29	0.287
TA1540	3	5.0	16	0.009
LA1777 ⁶	전부	na	30	na
E6203	없음	4.1	35	

¹라이코펠시콘 에스클렌툼(E6203) 중의 라이코펠시콘 히르슈툼(LA1777) 유사 유전자 이입 계통. ²E6203에 유전자이입된 라이코펠시콘 히르슈툼(LA1777) 염색체 분절. ³NIL 줄기의 평균 질병 등급(1=내성; 5=민감성). ⁴평가된 식물의 수. ⁵NIL은 p가 0.05 미만인 경우 E6203과 상당히 다르다. ⁶질병 등급을 행한 시점에서 라이코펠시콘 히르슈툼에서 더 오래된 잎들의 자연 노화로 인해 잎은 등급을 매기지 않았다.

【표 2】

<124>

2000년 6월에 온실 조건하에서 곰팡이 질병인 잿빛 곰팡이병에 대한 내성에 대해 선발된 LA1777 유전자이입 계통의 평균 줄기 질병 등급				
NIL ¹	염색체 ²	평균 줄기 등급 ³	N ⁴	p 값 ⁵
LA1777	전부	1.00	30	0.003
TA1551	10	1.80	30	0.009
TA1276	3	2.27	30	0.175
TA1105	2	2.43	30	0.160
TA1277	3	2.63	30	0.277
TA1541	3	2.70	30	0.063

TA1548	8	2.70	30	0.063
TA1287	5	2.70	30	0.032
TA1112	5	2.80	30	0.560
TA1324	9	2.83	30	0.338
TA517	4	3.03	29	0.616
TA1127	1	3.20	30	0.549
TA1544	5	3.21	28	0.177
TA1304	7	3.22	27	0.181
TA1330	9	3.29	28	0.383
TA1266	2	3.29	28	0.728
TA1562	4	3.31	29	0.904
TA1539	6	3.37	30	0.934
TA1535	1	3.40	20	0.440
TA1280	4	3.48	23	0.920
TA1540	3	3.56	16	0.585
TA1258	1	3.57	30	0.765
TA1316	8	3.59	27	0.449
TA1121	12	3.65	20	0.761
TA1545	6	3.79	28	0.005
E6203	없음	3.37	35	

¹ 라이코펠시콘 에스콜렌탐(E6203) 중의 라이코펠시콘 히르슈탐(LA1777) 유사 유전자이입 계통(NIL). ²E6203에 유전자이입된 라이코펠시콘 히르슈탐(LA1777) 염색체 분절. ³NIL 줄기의 평균 질병 등급(1=내성; 5=민감성). ⁴평가된 식물의 수. ⁵NIL은 p가 0.05 미만인 경우 E6203과 상당히 다르다.

- <125> 계통 TA1551에서 잎(p=0.065)과 줄기(p=0.009) 둘 다에 대해 관찰된 내성 수준은 상기 계통이 그 어버이 계통인 E6203보다 훨씬 더 내성임을 입증한다(표 1 및 2 참조).
- <126> 계통 TA1551은 라이코펠시콘 히르슈탐의 염색체 10에서 얻은 유전자이입 단편을 포함한다(도 1 참조).
- <127> QTL이 부여한 보트리티스에 대한 내성이 존재하는 염색체 10 상의 특정 영역들의 위치를 결정하기 위해, 염색체 10 RFLP 표지와 보트리티스에 대한 내성간의 연계를 Q 유전자 통계 패키지를 이용하여 평가하였다. 통계적으로 의미가 있고 보트리티스에 대한 내성과 관련된 RFLP 표지를 하기 표 3 및 4에 열거하였다:

【표 3】

<128>

보트리티스 감염에 대한 토마토 잎의 내성과 상당히 관련된 RFLP 표지							
표지	염색체	잎 내성 공급원	p ¹	E6203질병 등급 ²	N ³	LA1777질병 등급 ²	N ⁴
TG408	10	LA1777	0.00	4.0	69	2.8	3
TG241	10	LA1777	0.00	4.0	69	2.8	3
CT20	10	LA1777	0.00	4.0	69	2.8	3
CT234	10	LA1777	0.00	4.0	69	2.8	3
TG313	10	LA1777	0.00	4.0	69	2.8	3
CT57	10	LA1777	0.04	4.0	66	3.5	6

¹표지는 p가 0.05 미만인 경우 내병성과 상당히 관련된다.²평균 질병 등급(1=내성; 5=민감성).³ 라이코펠시콘 에스클렌텀 대립유전자에 대한 관찰 수.⁴ 라이코펠시콘 히르슈텀 대립유전자에 대한 관찰 수.

【표 4】

<129>

보트리티스 감염에 대한 토마토 줄기의 내성과 상당히 관련된 RFLP 표지							
표지	염색체	일 내성 공급원	P ¹	E6203질병 등급 ²	N ³	LA1777질병 등급 ²	N ⁴
TG408	10	LA1777	0.00	3.2	69	1.8	3
CT20	10	LA1777	0.00	3.2	69	1.8	3
CT234	10	LA1777	0.00	3.2	69	1.8	3
TG313	10	LA1777	0.00	3.2	69	1.8	3
TG241	10	LA1777	0.00	3.2	69	1.8	3
CT57	10	LA1777	0.00	3.2	66	2.3	6

¹표지는 p가 0.05 미만인 경우 내병성과 상당히 관련된다.²평균 질병 등급(1=내성; 5=민감성).³ 라이코펠시콘 에스클렌텀 대립유전자에 대한 관찰 수.⁴ 라이코펠시콘 히르슈텀 대립유전자에 대한 관찰 수.

- <130> 실시예 2: 라이코펠시콘 히르슈텀 x 라이코펠시콘 에스클렌텀 근 동질유전자 계통에서의 보트리티스에 대한 내성
- <131> 하기의 라이코펠시콘 히르슈텀 x 라이코펠시콘 에스클렌텀 근 동질유전자 계통의 종자를 2001 년에 온실 조건하에서의 내성 평가를 위해 이탈리아 라티나로 보내었다. 종자를 이식 트레이에서 흙에 심고 20 내지 24 °C 의 온실에서 약 6 주간 성장시켰다. 구체적으로, 종자는 하기 계통으로부터 취하였다: LA1777, TA1551, TA1551-F1, TA1339, E6203 및 맥스(Max). TA1551-F1 및 맥스를 제외하고, 나머지 계통은 캘리포니아 95616 데이비스 윈슬즈 애비뉴 소재의 유니버시티 오브 캘리포니아 채소 작물학과의 시.엠. 릭 토마토 유전 자원 센터 (<http://tgrc.ucdavis.edu>)에서 공개적으로 입수가능하다.
- <132> 식목한지 약 6 주후에 모종을 온실로 이식하였다. 계통당 총 30개 식물에 대해 각각 10개 식물씩 3회 반복하여 평가하였다. 잎과 줄기, 꽃 및 열매를 1 내지 5의 질병 등급 스케일(1=내성 및 5=민감성)을 이용하여 별도로 등급을 매겼다.
- <133> 식목한지 4 주후에 보트리티스 시네리아의 분생자 현탁액(1,000,000 분생자/ml)을 식물에 접종한다. 줄기 및 열매 상에 질병의 발생을 증대시키기 위해 첫 번째 접종한지 5 주후에 두 번째 접종을 하였다.
- <134> 접종한지 1 주일후에 다음의 질병 등급 스케일(1=내성, 5=민감성)을 이용하여 잎을 보트리티스 시네리아 포자형성 및 병반 발생에 대해 평가하였다:
- <135> 1 - 증상 없음.
- <136> 2 - 1 내지 2개 잎에 괴사 및 포자형성 존재.
- <137> 3 - 잎의 10%에 괴사 및 포자형성 존재.

- <138> 4 - 잎의 20%에 괴사 및 포자형성 존재.
- <139> 5 - 20%보다 많은 잎에 괴사 및 포자형성 존재.
- <140> 접종한지 4 주일후에 다음의 질병 등급 스케일(1=내성 및 5=민감성)을 이용하여 줄기를 *보트리티스* 시네리아 포자형성 및 병반 발생에 대해 평가하였다:
- <141> 1 - 증상 없음.
- <142> 2 - 줄기에 한정된 표면 병반.
- <143> 3 - 한정된 포자형성과 함께 직경 10 mm에 이르는 병반.
- <144> 4 - 포자형성으로 수축된, 직경 40 mm에 이르는 병반.
- <145> 5 - 포자형성으로 수축된, 직경 40 mm보다 큰 병반 또는 줄기가 완전히 박피됨.
- <146> 3개 이상의 꽃송이가 생기면 다음의 질병 등급 스케일(1=내성 및 5=민감성)을 이용하여 꽃을 *보트리티스* 시네리아 질병 발생 및 포자형성에 대해 평가하였다:
- <147> 1 - 증상 없음.
- <148> 2 - 한 송이에서 꽃의 50% 미만에 꽃 이탈, 괴사 및/또는 포자형성.
- <149> 3 - 두 송이 이상에서 꽃의 50% 미만에 꽃 이탈, 괴사 및/또는 포자형성.
- <150> 4 - 두 송이 이상에서 꽃의 50 내지 75%에 꽃 이탈, 괴사 및/또는 포자형성.
- <151> 5 - 모든 송이에서 꽃의 75% 이상에 꽃 이탈, 괴사 및/또는 포자형성.
- <152> 열매의 50%가 발달 정지 단계에 이르면 다음의 질병 등급 스케일(1=내성 및 5=민감성)을 이용하여 열매를 *보트리티스* 병반 발생에 대해 평가하였다:
- <153> 1 - 증상 없음.
- <154> 2 - 꽃자루에만 병반.
- <155> 3 - 하나의 열매에서만 병반 발생.
- <156> 4 - 식물 당 4개 이하의 열매에서 병반 발생.
- <157> 5 - 식물 당 4개 이상의 열매에서 병반 발생.
- <158> 하기 표 5는 *보트리티스* 시네리아 감염에 대해 *라이코필시콘 히르슈툼*으로부터 취한 유전자이입 단편을 함유하는 *라이코필시콘 에스클레툼* 근 동질유전자 계통으로부터 얻은 잎, 줄기, 꽃 및 열매의 질병 등급을 나타낸 것이다:

【표 5】

<159>

2001년 6월에 온실 조건하에서 곰팡이 질병인 잣빛 곰팡이병에 대한 내성에 대해 선발된 토마토 계통의 평균 잎, 줄기, 꽃 및 열매 질병 스코어									
계통	N ¹	평균 잎 등급 ²	p-값 ³	평균 줄기 등급 ²	p-값 ³	평균 꽃 등급 ²	p-값 ³	평균 열매 등급 ²	p-값 ³
LA1777	30	na ⁴	na	1.0	0.00	1.0	0.01	1.0	0.01
TA1551	25	2.2	0.01	1.0	0.00	1.0	0.01	1.0	0.01
TA1551 F1	15	2.4	0.08	1.8	0.38	1.1	0.02	1.0	0.04
TA1339	30	3.0	0.07	2.1	0.06	1.8	0.13	2.5	0.01
MAX	21	5.0	0.01	3.0	0.48	1.9	0.41	3.8	0.02
E6203	29	3.5		2.7		2.1		2.0	

¹평가된 식물의 수. ²잎, 줄기, 꽃 및 열매에 대한 평균 질병 등급(1=내성; 5=민감성). ³계통들은 p가 0.05 미만인 경우 E6203에 비해 훨씬 질병이 덜하다. ⁴질병 등급을 행한 시점에서 *라이코필시콘 히르슈툼*에서 더 오래된 잎들의 자연 노화로 인해 잎은 등급을 매기지 않았다.

- <160> 계통 TA1551에 대해 잎(p=0.01), 줄기(p=0.00), 꽃(p=0.01) 및 열매(p=0.01)에 대해 관찰된 내성 수준은 그 어버이 계통 E6203보다 훨씬 더 큰 내성을 가짐을 입증한다(표 5 참조).
- <161> 또한, 계통 TA1339는 평균 잎(p=0.07) 및 줄기(p=0.06) 스코어에 대해 민감한 E6203보다 질병 발생(α0.1에서 심함)이 적은 것으로 나타났다.
- <162> 계통 TA1551 및 TA1339는 라이코펠시콘 히르슈텀의 염색체 10으로부터의 유전자이입 분절을 포함한다(도 1 참조).
- <163> QTL이 부여한 *보트리티스*에 대한 내성이 존재하는 염색체 10 상의 특정 영역들의 위치를 결정하기 위해, 염색체 10 RFLP 표지와 *보트리티스*에 대한 내성간의 연계를 Q 유전자 통계 패키지를 이용하여 평가하였다. 통계적으로 의미가 있고 *보트리티스*에 대한 내성과 관련된 RFLP 표지를 하기 표 6 내지 8에 열거하였다:

【표 6】

<164>

보트리티스 감염에 대한 토마토 잎의 내성과 상당히 관련된 RFLP 표지							
표지	염색체	잎 내성 공급원	p ¹	E6203질병 등급 ²	N ³	LA1777질병 등급 ²	N ⁴
CT234	10	LA1777	0.00	3.5	58	2.1	3
TG313	10	LA1777	0.00	3.5	58	2.1	3
TG241	10	LA1777	0.00	3.6	49	3.0	12
CT57	10	LA1777	0.00	3.6	49	3.0	12
CD32B	10	LA1777	0.01	3.5	54	2.9	9
TG233	10	LA1777	0.01	3.5	57	2.8	6

¹표지는 p가 0.05 미만인 경우 내병성과 상당히 관련된다.²평균 질병 등급(1=내성; 5=민감성).³ 라이코펠시콘 에스콜랜텀 대립유전자에 대한 관찰 수.⁴ 라이코펠시콘 히르슈텀 대립유전자에 대한 관찰 수.

【표 7】

<165>

보트리티스 감염에 대한 토마토 줄기의 내성과 상당히 관련된 RFLP 표지							
표지	염색체	잎 내성 공급원	p ¹	E6203질병 등급 ²	N ³	LA1777질병 등급 ²	N ⁴
TG408	10	LA1777	0.00	2.1	55	1.3	6
TG313	10	LA1777	0.00	2.0	58	1.0	3
CT234	10	LA1777	0.00	2.0	58	1.0	3

¹표지는 p가 0.05 미만인 경우 내병성과 상당히 관련된다.²평균 질병 등급(1=내성; 5=민감성).³ 라이코펠시콘 에스콜랜텀 대립유전자에 대한 관찰 수.⁴ 라이코펠시콘 히르슈텀 대립유전자에 대한 관찰 수.

【표 8】

<166>

보트리티스 감염에 대한 토마토 열매의 내성과 상당히 관련된 RFLP 표지							
표지	염색체	일 내성 공급원	P ¹	E6203질병 등급 ²	N ³	LA1777질병 등급 ²	N ⁴
TG241	10	LA1777	0.00	1.6	49	1.0	12
CT57	10	LA1777	0.00	1.6	49	1.0	12
CT20	10	LA1777	0.04	1.5	46	1.2	15
TG313	10	LA1777	0.04	1.5	58	1.0	3
CT234	10	LA1777	0.04	1.5	58	1.0	3

¹표지는 p가 0.05 미만인 경우 내병성과 상당히 관련된다.²평균 질병 등급(1=내성; 5=민감성).³ 라이코필시콘 에스클렌텀
 대립유전자에 대한 관찰 수.⁴ 라이코 필시콘 히르슈텀 대립유전자에 대한 관찰 수.

<167>

본원에 언급된 모든 초록, 참고문헌, 특허 및 공개 특허출원은 본원에 참고로 인용된다.

<168>

본 발명은 전술한 설명 및 실시예로 예시된다. 전술한 설명을 고찰하여 당해 분야에 숙련된 자들에게 많은 변형이 명백할 것이므로 전술한 설명은 제한하는 것이 아닌 예시로 나타낸 것이다.

<169>

본 발명의 개념 및 범위를 벗어나지 않고 본원에 기술된 본 발명 방법의 구성, 작용 및 배열에 변화를 행할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<30>

도 1은 토마토의 염색체 10의 분자 표지 지도이다.

도면

도면1

