

요약

본 발명은 실질적으로 씨가 없는 토마토에 관한 것이다. 본 발명의 토마토는 옹성 어버이로서 하나 이상의 단위결실 유전자를 함유하는 토마토 식물을 자성 어버이로서 하나 이상의 단위결실 유전자를 함유하는 옹성 불임성 토마토 식물과 교배하여 제조한다. 이러한 교배에 의해 생성된 토마토는 실질적으로 씨가 없다.

대표도

도 1b

명세서

기술분야

본 발명은 씨 없는 토마토 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

많은 농작물들은 특정 온도 범위내 및 특정 환경 조건하에서 과일을 생산한다. 이 온도 범위나 환경 조건을 벗어나면, 충분한 수정 화분이 생산되지 않아 수분과 수정이 어려워지기 때문에 과일이 열리지 않는 것이 전형적이다. 예를 들면, 토마토는 15°C 내지 21°C(밤) 및 30°C 내지 35°C(낮)의 좁은 온도 범위내에서 과일을 생산한다. 루키아넨코(A.N. Lukyanenko)의 문헌["Parthenocarpy in Tomato", *Monographs on Theoretical and Applied Genetics* 14, pgs. 167-177(1991)]을 참조하시오.

단위결실(parthenocarpy)이란 수정하지 않고 과일을 생산하는 것을 말한다. 높거나 낮은 주야(晝夜) 온도, 낮은 광 강도 및 높은 습도와 같은 특정 환경 조건이 단위결실에 유리하다. 단위결실은 인공적으로 유도할 수 있거나 자연적으로 발생할 수 있다. 단위결실을 유도하는 경우, 다양한 성장 조절제를 사용하여 과일 생산을 촉진할 수 있다. 예를 들면, 지중해 연안에서 겨울-봄에 성장한 토마토(라이코펠시콘 에스쿨렌툼(*Lycopersicon esculentum*))에 과일 생산을 촉진하기 위해 옥신(auxins)을 적용하는 것이 통상적이다.

천연 또는 유전공학적인 단위결실은 완전(obligate) 또는 불완전(facultative) 단위결실일 수 있다. 완전 단위결실은 유전공학적 불임으로부터 발생하며, 임의의 외부 자극 없이도 나타나고, 영양번식 생산법을 필요로 한다. 완전 단위결실은 바나나 및 파인애플과 같은 과일에서 발견된다. 루키안크리코(A.N. Lukyancriko)의 문헌["Parthenocarpy in Tomato", *Monographs on Theoretical and Applied Genetics* 14, pgs. 167-177(1991)]을 참조하시오. 불완전 단위결실은 수분과 수정 과정이 좁은 환경 범위에 좌우되는 토마토 및 기타 종에서 발견된다. 불완전 단위결실에서는, 환경 자극에 반응하여 씨가 있거나 없는 과일이 생산된다. 예를 들면, 러시아 공화국 모스크바 근교에 소재한 그리보브스키야 엑스페리멘탈 베지터블 스테이션(Gribovskja Experimental Vegetable Station)에서 입수가능한 단위결실 토마토 계통인 "세베리아닌(Severianin)"은 환경 조건에 따라 유사한 중량의 씨가 없거나 있는 과일을 생산하는 주목할만한 능력을 갖는 것으로 밝혀졌다. 스플리트스토에서르(Splittstoesser, Walter E.)의 문헌["Temperature influences Parthenocarpic Fruit Production in Tomato", *Proc. Plant Growth Regal. Soc. Am*(1988)]을 참조하시오. 천연 단위결실 계통은 씨방에 다량의 성장 촉진 물질을 함유하여 그 결과, 수분작용의 실패나 종자 형성의 부족에 의해 과일의 발육이 방해받지 않는 것으로 또한 공지되어 있다.

전세계적으로 단위결실을 나타내는 많은 품종이 연구되었으며, 따라서 다양한 단위결실 공급원이 공지되어 있다. 단위결실은 하나 이상의 열성 유전자에 의해 유전공학적으로 조절될 수 있는 것으로 공지되어 있다. 단위결실을 조절하는 많은 열성 유전자들이 공지되어 있다. 이러한 유전자로는 pat(parthenocarpic fruit), pat-2, pat-3, pat-4 및 pat-5를 들 수 있다. 또한, 짧은 꽃밥(short anthers, sha) 대립유전자가 단위결실 과일을 생산하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 씨가 없거나 또는 아주 작은 씨가 단지 소량 있는 정상적인 과일을 생산하는 종자 발생 억제제(seed development suppressor, sds) 대립유전자가 밝혀졌다.

단위결실 과일이 지닌 문제점중 하나는 이들의 품질이 의심스러울 수 있다는 점이다. 예를 들면, 단위결실 과일은 보통 과일보다 크기가 더 작은 경향이 있다. 또한, 단위결실 과일의 산도가 더 낮은 경향이 있으며, 이것은 향미에 불리한 영향을 미친다. 추가로, 단위결실 과일, 특히 토마토는 저온 조건하에서 생산할 때 부풀어 오름(puffiness)과 같은 다양한 기형을 종종 경험한다.

경작 토마토, 즉 라이코펠시콘 에스쿨렌툼은 미국 및 전세계에서 가장 중요한 식물 작물중 하나이며, 미국에서만 매년 수백만 톤이 생산된다. 작물의 상업적인 중요성에 비추어 경작 품종을 개선시키기 위해 지속적인 노력이 필요하다.

여러 가지 단위결실 씨 없는 토마토가 공지되어 있다. 예를 들면, 토마토 계통 "파씨스트 노쓰(Farthest North)"로부터의 토마토중 30%에 씨가 없다(바게트(Baggett, J.R.)등의 문헌 [*Hortsci.* 13(5):598 (Oct. 1978)]; 바게트 등의 문헌 [*Hortsci.* 13(5):599(Oct 1978)]). 토마토 계통 오레곤(Oregon) 11 및 골드 누게트(Gold Nugget)로부터의 토마토중 약 50 내지 70%에 씨가 없다(바게트 등의 문헌[Hortiscience, Alexandria, American Society for Horticultural Science, 17(6), 984-985(Dec. 1982)]. 바게트 등의 문헌[Hortiscience, Alexandria, Va.: American Society for Horticultural Science, 20(5), 957-958(Oct. 1985)]). 더욱더, 이러한 씨 없는 토마토가 지닌 문제중 하나는 토마토를 먼저 자르지 않고는 토마토의 씨가 있는지 없는지 누구도 알아낼 수 없다는 점이다. 그러므로, 씨 없는 토마토를 얻기위한 본 발명 이전의 방법은 씨를 함유하지 않는 특정 퍼센트의 과일을 생산했다. 이것은 씨없는 과일을 얻기 위한 실용적이거나 상업적으로 유리한 시도는 아니다.

실질적으로 씨 없는 토마토는 현재 상업적으로 입수할 수 없다. 특히 씨가 있는 식료품을 먹을 수 없는, 엄격한 식사 제한을 가하는 개인들에게 우수한 품질의 실질적으로 씨 없는 토마토에 대한 필요가 존재한다. 예를 들면, 위장관의 탈장 부위를 치료하기 위해 수술로부터 회복중인 개인은 씨를 함유하는 식품을 보통 먹을 수 없다. 문제는 이러한 종자들이 위장관의 회복 영역의 봉합 부위에 걸림으로써 치유 과정을 나쁘게 할 수 있다는 것이다. 만일 위장관의 벽이 적절히 치유되지 않는다면, 추가의 과열이 일어날 수 있다.

더욱더, 실질적으로 씨 없는 토마토는 식품 제조 및 가공 제품 산업에서 유익할 것이다. 예를 들면, 가공하기 전에 씨를 제거할 필요가 없기 때문에, 완전히 씨 없는 토마토는 토마토 쏘스 및 토마토 페이스트와 같은 특정 제품의 제조를 더욱 효과적이고 저렴하게 만들 것이다.

그러므로, 본 발명의 하나의 목적은 우수한 품질을 나타내는 실질적으로 씨 없는 단위결실 토마토를 제공하는 것이다. 본 발명의 제2의 목적은 상기 씨 없는 토마토를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명은 실질적으로 씨 없는 토마토(라이코펠시콘 에스쿨렌툼)를 포함한다. 본 발명의 토마토는 약 100% 씨가 없다. 본 발명의 씨 없는 토마토는 웅성(male) 어버이로서 하나 이상의 단위결실 유전자를 함유하는 토마토 식물(라이코펠시콘 에스쿨렌툼)을 자성(female) 어버이로서 하나 이상의 단위결실 유전자를 함유하는 웅성 불임성 토마토 식물(라이코펠시콘 에스쿨렌툼)과 교배함으로써 제조된다. 웅성 및 자성 어버이 계통은 pat, pat-2, pat-3, pat-4 및 pat-5, sha 및 sds와 같은 임의의 단위결실 유전자를 함유할 수 있다. 웅성 및 자성 어버이 계통에서 단위결실 유전자(들)은 본 발명의 씨 없는 토마토의 생산을 보장하기 위해 동일해야 한다.

본 발명의 씨 없는 토마토는 어버이 계통의 과일 크기를 보유하며, 그러므로 상업적으로 허용되는 크기의 씨 없는 토마토를 얻기 위한 수단을 제공한다. 본 발명의 씨 없는 토마토는 또한 우수한 향미(당 및 산 균형)를 보유하며 부풀어 오름과 같은 임의의 기형을 나타내지 않는다.

도면의 간단한 설명

도 1a 및 1b는 2개의 상이한 토마토로부터 절단한 절반의 흑백 사진을 나타낸다. 도 1a는 씨가 있는 보통의 토마토로부터 얻은 토마토 절반이다. 도 1b는 본 발명의 씨 없는 토마토로부터 얻은 토마토 절반이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 씨 없는 토마토(라이코펠시콘 에스쿨렌툼) 및 씨 없는 토마토의 제조 방법을 포함한다. 본원에서 사용한 바와 같은, "씨없는 토마토"란 임의의 수정된 성숙 종자를 함유하지 않는 토마토를 말한다. 본 발명의 토마토는 임의의 수정된 성숙 종자를 함유하지 않지만, 토마토는 작고 흰색의 비수정 씨방을 함유할 수 있다. 이들 비수정 씨방은 진정한 씨로 생각되지 않는다.

본 발명의 씨 없는 토마토는 실질적으로 씨가 없는 것이다. 본원에서 사용한 바와 같은, "실질적으로 씨가 없는"이란 용어는 토마토가 90% 이상 씨가 없음을 의미한다. 바람직하게는, 본 발명의 씨 없는 토마토는 약 95% 내지 약 99% 씨가 없고, 가장 바람직하게는, 본 발명의 토마토는 약 100%에 씨가 없다.

본 발명의 씨 없는 토마토는 웅성 어버이로서 하나 이상의 단위결실 유전자를 함유하는 토마토 식물(라이코펠시콘 에스쿨렌툼)을 자성 어버이로서 하나 이상의 단위결실 유전자를 함유하는 웅성 불임성 토마토 식물(라이코펠시콘 에스쿨렌툼)과 교배함으로써 제조된다. 본 발명의 씨 없는 토마토를 생산하기 위해 교배되는 웅성 및 자성 식물들은 각각 단위결실 유전자(들)에 대해 동형접합성(homozygous)이어야 하고, 동일한 단위결실 유전자를 함유해야 한다.

본 발명의 씨 없는 토마토를 제조하기 위해 사용된 웅성 및 자성 어버이 계통은 하나 이상의 단위결실 유전자를 함유해야 한다. 상기 어버이 계통은 pat, pat-2, pat-3, pat-4, pat-5, sha, sds 등과 같은 임의의 단위결실 유전자를 함유할 수 있다. 실질적으로 씨 없는 토마토의 제조를 보장하기 위해, 교잡(hybridization)에 사용된 웅성 및 자성 어버이 계통은 바람직하게는 동일한 단위결실 유전자를 함유해야 한다. 예를 들면, 웅성 어버이 계통이 pat 유전자를 함유하는 경우, 자성 어버이 계통도 또한 pat 유전자를 함유해야 한다.

본 발명의 방법에서 웅성 어버이 계통으로 사용되는, 단위결실 유전자를 함유하는 다양한 토마토 계통을 공중이 입수할 수 있다. 본 발명에 사용할 수 있는 단위결실 유전자를 함유하는 토마토 계통의 예를 하기 표에 열거한다.

품종/육종 계통	공급 국가	유전적 조절	참고 문헌
세베리아닌 (Severianin)	소비에트 사회주의 공화국 연방(USSR)	pat-2	본원에 참고로 인용한 필로우즈(Philouze)등의문헌[<i>Genotype-and-environment-in-breeding-greenhouse-tomatoes</i> , 2,54-64(1978)]
서브 악틱 플렌티(Sub Arctic Plenty)	캐 나 다	pat-5	본원에 참고로 인용한 누에즈(Nuez)등의 문헌[<i>J. Plant Breeding</i> 96(3) 200-206(April 1986)]
오레곤 체리 (Oregon Cherry)	미국	미 지	본원에 참고로 인용한 바게트 등의 문헌[<i>Hort Science</i> 13(5):598 (1978)]
오레곤 티5-4 (Oregon T5-4)	미국	미 지	본원에 참고로 인용한 바게트 등의 문헌[<i>Hort Science</i> 13(5):598 (1978)]
골드 너겟트 (Gold Nuggett)	미국	미 지	본원에 참고로 인용한 바게트 등의 문헌[<i>Hort Science</i> 20 (5) :957-958(1985)]
산티암 (Santiam)	미국	미 지	본원에 참고로 인용한 바게트 등의 문헌[<i>Hort Science</i> 21 (5) :1245-1247(1986)]
오레곤-11 (Oregon-11)	미국	미 지	본원에 참고로 인용한 바게트 등의 문헌[<i>Hort Science</i> 17 (6) :984-985(1982)]
실레쯔 (Siletz)	미국	미 지	본원에 참고로 인용한 바게트 등의 문헌[<i>Hort Science</i> 17(6):984-985(1982)]
오레곤 스프링 (Oregon Spring)	미국	미 지	본원에 참고로 인용한 바게트 등의 문헌[<i>Hort Science</i> 21(5) :1245-1247(1986)]
오레곤 스타 (Oregon Star)	미국	pat-2	본원에 참고로 인용한 바게트 등의 문헌[<i>Hort Science</i> 30(3):649 (1995)]
오레곤 프라이드 (Oregon Pride)	미국	pat-2	본원에 참고로 인용한 바게트 등의 문헌[<i>Hort Science</i> 30(3):649 (1995)]

오레곤-11, 골드 너겟트, 오레곤 스프링, 오레곤 스타, 오레곤 프라이드 및 실레쯔는 미국 오레곤주 97424 커티지 그로브 피.오.박스 157에 소재한 테리토리얼 시드 캄파니(Territorial Seed Co.)에서 상업적으로 입수할 수 있다. 골드 너겟트 및 오레곤 스프링도 또한 미국 마인주 04910-9731 알비온 포스 힐 로드에서 소재한 자니즈 셀렉티드 시즈(Johnny's Selected Seeds) 및 미국 오레곤주 97321 알바니 노쓰 퍼시픽 하이웨이 1190에 소재한 니콜스 가든 널서리(Nichol's Garden Nursery)에서 상업적으로 입수할 수 있다. 산티암 및 오레곤 스타는 또한 미국 오레곤주 알바니에 소재한 니콜스 가든 널서리에서 상업적으로 입수할 수 있다.

추가로, 동형접합 토마토 계통으로부터 입수한 단위결실 유전자를 역교배에 의해 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 토마토 계통에 전달할 수 있다. 단위결실 유전자를 함유하는 동형접합 토마토 계통을 공여 어버이로 사용하고, 상업적으로 바람직한 특성을 갖는 토마토 계통을 순환(recurrent) 어버이로 사용한다. 순환 어버이와 공여 어버이를 초기 교배한 후, 생

성된 F_1 자손을 자가 수분한다. 이어서, F_2 자손이 싹트고, 씨없는 과일이 최대한의 원하는 원예학적 형질과 조합된 자손만을 선별한다. 그후 선별한 것을 단위결실 유전자를 보유하면서 원하는 원예 형질을 추가로 고정시키기 위해 자가 수분하거나 또는 만족스러운 F_2 분리물을 회수할 때까지 순환 어버이와의 추가의 역교배를 적용한다. 이제, 본 발명의 교배에서 옹성 어버이 계통으로 상기 토마토 계통을 사용할 수 있다.

본 발명의 씨 없는 토마토를 제조하기 위해 사용된 자성 어버이 계통은 하나 이상의 단위결실 유전자를 함유하며, 또한 옹성 불임성을 나타낸다. 어버이 계통은 세포질적으로 또는 유전학적으로 옹성 불임성일 수 있다. 본원에서 사용한 바와 같이, 식물이 화분을 생성하지 않거나 또는 생존능력이 없는 화분을 생성하는 경우 "옹성 불임성"이라 한다. 옹성 불임성 식물에서는 자가 수정(self-fertilization)을 배제한다. 옹성 불임성 식물은 식물의 꽃에서 잡교 수정(cross-fertilization)을 제어함으로써 육종업자들이 잡종(hybrid) 종자를 더욱 경제적으로 생산할 수 있도록 허용한다. 잡교 수정은 자성 어버이가 앞선 자가 수정을 하지 못하게 막음으로써 제어할 수 있다. 일단 옹성을 불임성으로 만들고, 그후 식물을 원하는 형질을 보유하는 유전자 공여 식물과 교잡할 수 있다. 본 발명에서는, 옹성 불임성 자성 토마토 식물을 하나 이상의 동일한 단위결실 유전자 쌍을 함유하는 옹성 임성(fertility) 옹성 토마토 식물과 교잡한다.

옹성 불임성을 이룩하는 한 가지 방법은 세포질 옹성 불임성을 이용하는 것이다. 현재까지는 세포질, 특히 미토콘드리아 DNA 계열에서 세포질 옹성 불임성(CMS; cytoplasmic male sterility)을 제어하는 유전 인자가 발견되었다고 생각된다. 식물에서 2개의 통상적인 세포질 옹성 불임성은 라파누스 사티버스(*Raphanus sativus*)의 오구라(Ogura) 옹성 불임성 세포질 및 브라씨카스 나푸스(*Brassica napus*)의 폴리마(Polima) 옹성 불임성 세포질이다. 기타 세포질 옹성 불임성 및 이러한 불임성을 만드는 방법이 또한 당해 분야에 잘 알려져 있으며, 본 발명에서 사용하기 위해 이용가능하다. 예를 들면, 유럽 특허 출원 공개 제363 819 A1호는 불활성화 세포질 원소를 함유하는 토마토 원형질체를 불활성화 핵 원소를 함유하는 솔라눔(*Solanum*) 원형질체와 융합시킴으로써 옹성 불임성 토마토 식물로 재생될 수 있는 융합 생성물을 수득하여 옹성 불임성 토마토 식물을 제조하는 방법을 기술하고 있다.

토마토에서, 세포질 옹성 불임성은 교배에 의해 전달될 수 있다. 자성(난) 어버이는 세포질에 제공되므로 CMS 자성과 교배하여 CMS 자손을 생산한다. 그러나 핵 유전자는 이형접합성이다. 그러므로, 원예학적으로 바람직한 핵 특성을 위해 동형접합성인 CMS 육종 계통을 생산하는데 6 내지 8 세대의 역교배가 필요하다.

다르게는, 원형질체 융합에 의해 세포질 옹성 불임성 토마토 계통을 생산할 수 있다. 예를 들면, 상업적으로 바람직한 형질을 갖는 식물로부터 얻은 원형질체를 CMS 계통으로부터 얻은 원형질체와 융합하여 옹성 불임성 식물을 생산할 수 있다.

일반적으로, 융합을 위한 원형질체는 통상의 효소적 기법에 의해 얻을 수도 있다. 원형질체의 효소적 분리는 2 단계(또는 연속적) 또는 1 단계 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 2 단계 방법에서는, 중간 박막층을 분해함으로써 세포를 분리하는 마세로자임(macerozyme) 또는 펙티나제로 식물 조직을 먼저 처리한다. 이어서, 유리된 세포를 셀룰라제로 처리하여 원형질체를 방출시킨다. 일반적으로, 세포를 1 단계 방법에서 사용하는 것 보다 짧은 시간동안 상이한 효소에 노출시킨다. 1 단계 방법에서는, 조직을 마세로자임과 셀룰라제를 포함하는 효소 혼합물에 적용한다.

원형질체는 음으로 하전되기 때문에, 이들은 자발적으로 융합하지 않을 것이다. 그러므로, 원형질체의 융합을 유도해야 한다. 원형질체의 융합은 원형질체를 높은 pH에서 다량의 칼슘으로 처리함으로써 또는 폴리에틸렌 글리콜을 적용함으로써 화학적으로 유도할 수 있다. 추가로, 본원에 참고로 인용한 비엔켄(Vienken) 등의 문헌[*Physiol. Plant* 53:64(1981)]에 개시된 전기장 충격 기법과 같은 전기적 방법을 사용하여 원형질체 융합을 유도할 수 있다.

융합하기 전에, 원형질체가 세포질만을 제공하도록 보장하기 위해 CMS 계통으로부터의 원형질체와 같은 하나의 원형질체의 핵 물질을 제거하거나 또는 불활성화시킨다. 핵 물질의 불활성화는 감마, 자외선 또는 X 선을 사용하여 조사함으로써 이룩할 수 있다. 일부 예에서는, 원형질체만이 핵 물질을 제공하도록 융합하기 전에 세포질의 유전적 물질을 불활성화시킨다. 세포질 물질의 불활성화는 원형질체를 요오드아세트산 또는 로다민 6-G와 같은 화합물에 노출시킴으로써 화학적으로 이룩할 수 있다. 일반적으로, 이들 화합물은 복제를 차단하거나 또는 미토콘드리아 DNA를 붕괴시킨다.

일단 원형질체가 융합되면, 이들을 원형질체의 성장 및 융합조직의 형성을 위해 잘 균형잡힌 영양 공급물을 포함하는 적절한 배양 배지에서 배양한다. 배지는 미세원소 및 거대원소, 비타민, 아미노산 및 소량의 탄수화물, 예를 들면 글루코스와 같은 다양한 당을 함유한다. 배양 배지는 세포 분열 및 어린씨의 재생을 조절할 수 있는 식물 호르몬(옥신 및 사이토킨)을 또한 포함한다. 이어서, 세포질적 옹성 불임성 식물을 재생시킨다.

임의의 웅성 불임성 토마토 식물을 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들면, 본원에 참고로 인용한, 유럽 특허 출원 공개 제 363 819 A1호에 기술된 방법에 따라 제조한 세포질적 웅성 불임성 토마토 식물을 본 발명에 사용할 수 있다.

자성 어버이 계통으로서 사용된 웅성 불임성 토마토 식물은 또한 웅성 어버이 계통에 함유된 단위결실 유전자와 동일한 하나 이상의 단위결실 유전자를 함유해야 한다. 자성 어버이 계통은 단위결실 유전자중 하나 이상에 동형접합성인 토마토 계통을 웅성 불임성 토마토 식물과 역교배하여 제조할 수 있다. 이러한 역교배 전략은 자가 수분이 가능하지 않아 원예학적으로 허용가능한 단위결실 계통이 CMS 자성 계통의 유지자로 작용하기 때문에, CMS 자성과 단위결실 근친의 직접적인 역교배를 수반한다는 점에서 웅성 근친 발생(male inbred development)과는 다르다. 역교배는 CMS 토마토 계통이 단위결실 유전자와 동형접합성일 때까지 지속한다. 식물 집단의 100%가 단위결실 과일을 생산할 때 동형접합이 이룩된다.

본 발명의 씨 없는 토마토는 웅성 어버이 계통을 자성 어버이 계통과 교잡하여 얻는다. 생성된 자손은 약 90%가 씨가 없으며, 바람직하게는 약 95% 내지 약 99%가 씨가 없고, 가장 바람직하게는 100%에서 씨가 없다. 그러나, 주목할 점은 벌과 같은 수분체가 자성 어버이 계통에서처럼 하나 이상의 동일한 단위결실 유전자를 함유하지 않는 수정 계통의 화분으로 자성 어버이 계통을 수분한다면, 자손의 약 90%에서 씨가 없지 않을 것이다.

본 발명은 또한 웅성 어버이로서 하나 이상의 단위결실 유전자를 함유하는 라이코펠시콘 에스쿨렌툼 식물을 자성 어버이로서 하나 이상의 단위결실 유전자를 함유하는 세포질적 웅성 불임성 라이코펠시콘 에스쿨렌툼 식물과 교배하여 라이코펠시콘 에스쿨렌툼을 생산하는 단계를 포함하는, 잡종 라이코펠시콘 에스쿨렌툼의 제조 방법에 관한 것이다. 잡종 식물은 웅성 불임성인 과일(라이코펠시콘 에스쿨렌툼)을 제공한다. 최적의 과일을 생산하기 위해서는, 잡종 식물을 13 시간 이상의 광주기하에서 성장시켜야 한다.

일반적으로, 식물에 세포질 웅성 불임성을 적용할 때, F₁ 자손에서 적절한 임성을 보장하기 위해 웅성 수분체로부터 회복 유전자를 전달받아야 한다. 더욱 구체적으로는, 회복 유전자의 기능은 잡종에서 임성을 회복시켜 과일을 생산하도록 하는 것이다. 웅성 어버이에 단위결실 유전자를 사용함으로써, 웅성 어버이로부터 회복 유전자를 필요로 하지 않는 세포질 웅성 불임성의 라이코펠시콘 에스쿨렌툼 잡종을 제조할 수 있다. 단위결실 유전자는 과일이 임의의 씨를 함유하지 않더라도 씨방을 팽창시켜 과일을 만들기 때문에 회복 유전자를 필요로 하지 않는다.

본 발명의 씨 없는 토마토의 일부 변종은 통상의 토마토와 동일한 속도로 토마토가 발육하는 중에 크기가 증가하지 않는 방(locules)을 갖는다. 이들 토마토에서 방은 더 작게 남아있기 때문에, 통상의 토마토보다 격벽 융합된 심피(carpel) 표면적은 더 크다. 도 1은 2개의 상이한 토마토로부터 얻은 토마토 절반의 흑백 사진이다. 도 1a는 씨가 있는 보통의 시판 토마토로부터 얻은 토마토 절반을 나타낸다. 도 1b는 본 발명의 방법에 의해 생산한 씨 없는 토마토로부터 얻은 토마토 절반을 나타낸다. 이들 사진으로부터 알 수 있듯이, 도 1b에서 토마토 절반은 도 1a에 있는 토마토 절반보다 과육이 더 많다. 그러므로, 본 발명의 씨 없는 토마토는 통상의 토마토보다 더 많은 과육을 종종 함유한다.

추가로, 본 발명의 씨 없는 토마토는 우수한 당 및 산 균형을 나타내어 우수한 향미를 갖는 토마토를 제공한다. 또한, 본 발명의 씨 없는 토마토는 대부분의 통상적인 토마토보다 높은 당 함량을 나타낸다.

본 발명의 상승된 당 함량은 겔에 존재하는 유리 당을 보통 동화하는 "싱크(sink)"로 작용하는 종자가 없다는 점과 관련이 있는 것으로 생각된다. 본원에서 사용한 바와 같은 "싱크"란 용어는 다른 식물 부위보다 더 많은 광합성 산물(슈크로스)을 우선적으로 수용하는 식물의 부분을 지칭하기 위해 식물과 관련하여 사용된다. 종자는 식물의 차세대 또는 자손을 상징하기 때문에 식물에서 유력한 "싱크"를 구성한다. 종자를 함유하는 식물은 특히 응력하에서 슈크로스를 발육하는 종자로 우선적으로 전류시키는 것을 암호화하는 유전 조직을 함유한다. 본 발명의 단위결실 토마토에서, 수정되지 않은 작은 배주는 씨방에 전류된 당을 흡수할 수 없으므로, 유리 당을 소비자가 즐길 수 있도록 남기는 것으로 생각된다.

본 발명의 씨 없는 토마토는 부풀어 오름과 같은 임의의 기형을 나타내지 않고 상업적으로 허용가능한 크기를 나타낸다.

최종적으로, 본 발명의 씨 없는 토마토는 방의 겔 면적이 더 작기 때문에 통상적인 토마토보다 더 잘 얇게 썰릴 수 있다.

본 발명을 제한하지 않고 예시하기 위해, 본 발명의 실시예를 하기에 나타낼 것이다.

실시예

실시예 1

씨 없는 토마토 96 FH 241의 제조 방법에 대한 설명

이 실시예는 본 발명의 방법에 따른 씨 없는 토마토 96 FH 241의 발생을 기술한다.

96 FH 241은 다음과 같이 발생시켰다. 자성 어버이로서 "CMS VFN8"로 불리는 세포질적 응성 불임성(CMS) 토마토 식물을 전통적인 교배 잡종화 기법을 사용하여 "Det. Parth 1"로 불리는 토마토 식물과 교배했다. CMS VFN8은 일본 도쿄에 소재한 도키타 시드 캄파니, 리미티드(Tokita Seed Co., Ltd.)에서 구입한 전매 특허 세포질적 응성 불임성 토마토 식물이다. 버티실리움 달리아 품종 1(*Verticillium dahliae* race 1), 푸사리움 옥시스포룸 품종 1(*Fusarium oxysporum* race 1) 및 뿌리혹 선충류 멜로이도진 인코니타(*Meloidogyne incognita*)에 대해 저항성을 갖는 페토시드(Petoseed) 근친 계통인 잡종 어버이 VFN8의 종자를, 세포질적 응성 불임성 솔라눔 아카울(*Solanum acaule*)의 미토콘드리아로 응성 임성 라이코필시콘 에스쿨렌툼, VFN8의 미토콘드리아를 치환한 원형질체 융합 실험에서 핵 공여 어버이로 사용했다. VFN8의 식물 형은 강력한 디터미네이트(determinate)이며, 과일 크기는 초 대형(200 내지 250g)이고, 우수한 향미를 나타낸다.

Det. Parth 1은 본 발명의 양수인인 세미니스 베저터블 시즈, 인코포레이티드의 전매특허 근친 계통인 디터미네이트 단위 결실 토마토 식물이다. Det. Parth 1은 pat-2 단위결실 유전자를 함유한다. Det. Parth 1은 초 대형 (200 내지 250g) 과일인 디터미네이트 관목 토마토이다. 과일은 녹색의 어깨 모양 부위(green-shoulders)를 가지며 충분한 산도와 높은 당 함량으로 인해 탁월한 향미를 나타낸다.

교배에서 얻은 종자를 수거하여 파종한다. 이어서, 생성된 식물을 자성 어버이로서 CMS VFN8을 사용하여 역교배한다. 이 역교배로부터 얻은 종자를 수거하여 파종한다. 이어서, 생성된 식물을 자성 어버이로서 CMS VFN8로 두번째로 역교배한다. 제2회의 역교배로부터 얻은 식물 및 자성 어버이로서 CMS VFN8을 사용하여 3회의 추가의 역교배를 수행했다. 총 5회의 역교배를 수행한 후, "CMS VFN8/Det. Parth 1^{*4}"로 부르는 생성된 식물은 pat-2 유전자와 동형접합성이다. CMS VFN8/Det. Parth 1^{*4} 식물은 씨 없는 토마토 96 FH 241을 발생시키기 위한 교배시에 자성 어버이로 사용했다. "CMS VFN8/Det. Parth 1^{*4}" 식물의 종자를 1997년 10월 13일 미국 매릴랜드주 20852 록빌 파크런 드라이브 12301에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC; American Type Culture Collection)에 ATCC 기탁 번호 209361로 기탁하였다. 이 기탁은 기탁일로부터 30년간 또는 기탁기관에서 최종 기탁 요청이 있는지 5년 동안 또는 본 출원으로부터 완성된 미국 특허의 존속 기간동안 어느 기간이 길든지 가장 긴 기간동안 기탁을 지속시켜야 하는 부다페스트 협약 조건에 따라 이루어졌다. 기탁기관에서 생존해 있지 않으면 CMS VFN8/Det.Parth 1^{*4} 식물의 종자를 새로 공급할 것이다.

자성 어버이로서 본 발명의 양수인인 세미니스 베저터블 시즈로부터 상업적으로 입수할 수 있는 "델리셔스(Delicious)"라 부르는 개방 수분한 토마토 변종을, 미국 오레곤주 코르발리스에 소재한 오레곤 주립 대학에서 얻은 "33"으로 부르는 전매 특허 토마토 식물과 전통적인 교배 잡종화 기법을 사용하여 교배했다. 33은 단위결실 유전자 pat-2를 함유하고 있다. 교배에서 얻은 종자를 수집하여 파종했다. 생성된 식물을 자성 어버이로서 델리셔스를 사용하여 역교배했다. "F₆('델리셔스'/33*)"으로 부르는 생성된 식물은 pat-2 유전자와 동형접합성이다. 씨 없는 토마토 96 FH241을 발생시키기 위해 교배시에 "F₆('델리셔스'/33*)" 식물을 응성 어버이로서 사용하였다. F₆('델리셔스'/33*)의 종자를 1997년 10월 13일 미국 매릴랜드주 20852 록빌 파크런 드라이브 12301에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션에 ATCC 기탁 번호 209360으로 기탁하였다. 이 기탁은 기탁일로부터 30년간 또는 기탁기관에서 최종 기탁 요청이 있는지 5년 동안 또는 본 출원으로부터 완성된 미국 특허의 존속 기간동안 어느 기간이 길든지 가장 긴 기간동안 기탁을 지속시켜야 하는 부다페스트 협약 조건에 따라 이루어졌다. 기탁기관에서 생존해 있지 않으면 F₆('델리셔스'/33*) 식물의 종자를 새로 공급할 것이다.

자성 어버이로서 CMS VFN8/Det.Parth 1^{*4}를 전통적인 교배 잡종화 기법을 사용하여 응성 어버이로서 F₆('델리셔스'/33*)과 교배했다. 생성된 종자를 수집한 후 파종했다. 생성된 토마토 96FH241은 100% 씨가 없었다.

실시예 2

샤디 레이디(Shady Lady) 및 96FH241의 당 함량 및 당의 산 비율을 측정했다. 샤디 레이디는 상당히 조밀한 디터미네이트 덩굴이고, 일반적으로 과일 크기가 큰(180 내지 220g) 시판 품종이다. 96FH241은 본 발명의 방법에 의해 생산한 씨 없

는 잡종 토마토이다. 이들 각각의 토마토로부터 얻은 샘플을 부드러운 컨시스턴시(consistency)를 얻을때까지 표준 식품 블렌더에서 개별적으로 균질화시켰다. 베크만(Beckman) GS-6R 원심분리기로 4℃에서 1000 x g으로 15분간 원심분리 함으로써 각각의 푸레(puree) 샘플로부터 토마토 유장(serum)을 얻었다.

모델 RFM91 굴절계(벨링햄 앤 스탠리(Bellingham & Stanley))를 사용하여 유장의 당 함량을 측정했다. 굴절계를 물 및 10°브릭스(Brix) 글루코즈 용액으로 칼리브레이션했다. 당 함량은 °브릭스(당%(중량/중량))로 나타낸다. 2개의 토마토의 당 함량을 하기 표 1에 나타낸다.

메틀러(Mettler) D67 자동적정계를 사용하여 적정가능한 산도(A)를 측정했다. pH 8.2의 종말점 및 D.1000 N 수산화 나트륨(VWR) 적정물질을 사용했다. 적정가능한 산도를 H⁺/유장 100 g의 밀리몰로 표시한다. 당:산 비율(S/A)은 식 S/A = (°브릭스/180.16)/(A/1000)을 이용한 당 대 적정가능한 H⁺ 함량의 몰비이다. 2개의 토마토의 당:산 비율을 하기 표 1에 나타내었다.

[표 1]

	브릭스 (당)	당:산 비율
'샤디 레이디' (시판하는 변종)	4.47	3.71
96 FH 241 (씨 없는 잡종)	6.42	3.96

상기 표의 결과는 본 발명의 방법에 의해 제조한 씨 없는 토마토의 당 함량이 토마토의 표준 시판 변종보다 높다는 것을 입증한다. 본 발명의 토마토의 당:산 비율도 또한 표준 토마토의 비율보다 더 높다.

본 발명을 명확하게 하고 이해를 돕기 위해 예시 및 실시예로 상세하게 기술했지만, 첨부한 청구의 범위의 범주에 의해서만 한정되는 바와 같은 본 발명의 범위내에서 특정 변화 및 변경이 이룩될 수 있다는 것은 명백할 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

- a. pat, pat-1, pat-2, pat-3, pat-4, pat-5 및 sha로 구성된 군중에서 선택된 하나 이상의 단위결실(parthenocarpy) 유전자에 대해 동형접합성(homozygous)인 라이코펠시콘 에스쿨렌툼(*Lycopersicon esculentum*) 식물의 집단으로부터 라이코펠시콘 에스쿨렌툼 식물을 선별하는 단계;
- b. 세포질적으로 응성 불임성이고 pat, pat-1, pat-2, pat-3, pat-4, pat-5 및 sha 로 구성된 군중에서 선택된 하나 이상의 단위결실 유전자에 대해 동형접합성인 라이코펠시콘 에스쿨렌툼 식물의 집단으로부터 라이코펠시콘 에스쿨렌툼 식물을 선별하는 단계; 및
- c. 단계 a 및 b에서 선별된 식물들을 교배하는 단계를 포함하되, 단계 a 및 b에서 선별된 각각의 식물의 단위결실 유전자가 동일한,

100% 씨 없는 잡종(hybrid) 라이코펠시콘 에스쿨렌툼 식물의 제조 방법.

청구항 2.

삭제

청구항 3.

제 1 항에 있어서,

단계 c의 잡종 식물을 성장시키거나 사용하여 씨 없는 잡종 라이코필시콘 에스쿨렌툼 과일을 수확하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 4.

삭제

청구항 5.

제 1 항의 방법에 의해 생산된, 씨 없는 잡종 라이코필시콘 에스쿨렌툼 과일.

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.

제 3 항에 있어서,

잡종 식물이 13 시간 이상의 광주기를 갖는 영역에서 성장되는 방법.

청구항 20.

제 3 항 또는 제 19 항에 있어서,

과일의 당 함량을 분석하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 21.

제 5 항에 있어서,

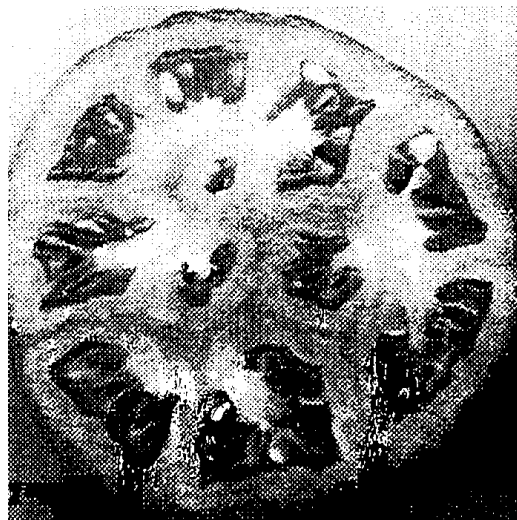
통상의 토마토 과일보다 높은 당 함량을 갖는, 씨 없는 잡종 라이코펠시콘 에스쿨렌툼 과일.

청구항 22.

제 1 항의 방법에 의해 수득될 수 있는, 씨 없는 잡종 라이코펠시콘 에스쿨렌툼 식물.

도면

도면1a



도면1b

