



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년05월08일
(11) 등록번호 10-2530404
(24) 등록일자 2023년05월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 2600/13 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0092790
- (22) 출원일자 2021년07월15일
심사청구일자 2021년07월15일
- (65) 공개번호 10-2023-0012244
- (43) 공개일자 2023년01월26일
- (56) 선행기술조사문헌
심성철 등. 농촌진흥청. 과제고유번호_1395062972 (2021)
(뒷면에 계속)
- (73) 특허권자
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
- (72) 발명자
김경남
경기도 성남시 분당구 정자로76번길 10, 205동 1903호(정자동, 상록마을라이프2단지아파트)
이지원
경기도 의정부시 백석로 33, 102동 1101호(호원동, 삼익1차아파트)
심성철
서울특별시 강남구 자곡로 192, 강남푸르지오시티 2차 347호(자곡동)
- (74) 대리인
특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 15 항

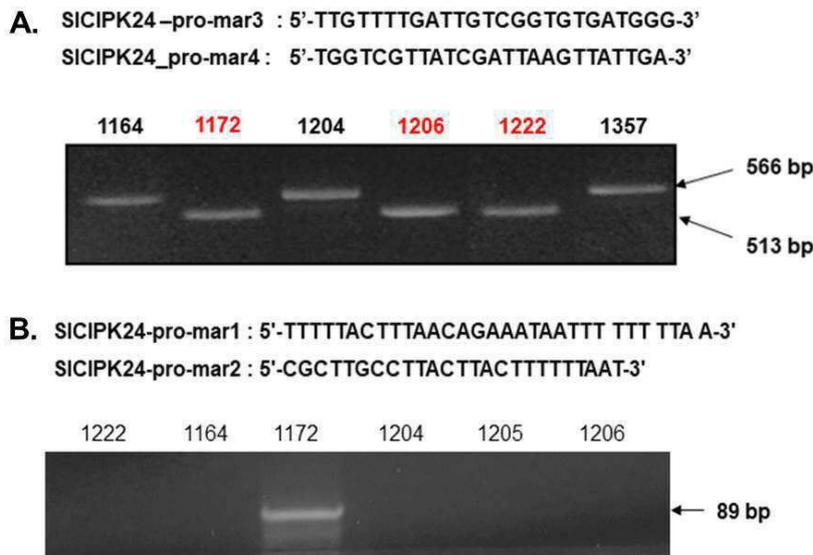
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 내염성 토마토 관별용 분자마커 및 이를 이용한 토마토 선별방법

(57) 요약

본 발명은 내염성 토마토 관별용 분자마커 및 이를 이용한 토마토 선별방법에 관한 것이다. 본 발명의 SICIPK24 프로모터 영역 내 특이 염기서열 차이를 관별할 수 있는 분자마커를 이용할 경우, 내염성 토마토를 유묘 단계에서부터 조기에 분리할 수 있으므로 내염성 토마토 품종 개발에 소요되는 비용과 시간을 절약할 수 있다.

대표도 - 도11



(56) 선행기술조사문헌

RAUL HUERTAS 등. PLANT, CELL ENVIRONMENT, VOL. 35, NO. 8, 페이지 1467_1482 (2012)
 ANDRES BELVER 등. BIOENGINEERED. VOL. 3, NO. 5, 페이지 298_302 (2012)
 MOURAD BAGHOUR 등. PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY. VOL. 135, 페이지 77_86 (2019)
 MOSTAPHA MAACH 등. PHYSIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS. VOL. 27, NO. 4, 페이지 703_712 (2021)
 KR1020120052156 A

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395062972
과제번호	PJ013114012020
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명	Post-GWAS 연구를 통한 토마토 유전체육종 기반 구축
기여율	1/2
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395065255
과제번호	PJ014781012020
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대농작물신육종기술개발(R&D)
연구과제명	내염성 및 흰가루병 저항성이 증진된 토마토 육종 계통 및 품종 개발
기여율	1/2
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

확인 대상 토마토의 SICIPK24 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 483~535번째 위치에 대응되는 염기의 결실 여부를 검출하는 제제를 포함하는, 내염성 토마토 선별용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 제제는 상기 염기 결실 부위를 포함하는 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 상기 염기 결실 부위를 포함하는 영역에 상보적으로 결합하는 프로브인, 내염성 토마토 선별용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 제제는 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 세트인 것인, 내염성 토마토 선별용 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 확인 대상 토마토의 SICIPK24 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 1687~1689번째 위치에 대응되는 위치에 AATA 염기의 존부 및 서열번호 1의 1695번째 위치에 대응되는 위치에 GTA 염기의 삽입 여부를 검출하는 제제를 더 포함하는, 내염성 토마토 선별용 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 위치의 염기의 존부 및 삽입 여부를 검출하는 제제는 서열번호 10 및 서열번호 11의 프라이머 세트를 포함하는 것인, 내염성 토마토 선별용 조성물.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 확인 대상 토마토의 SICIPK24 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 1652~1653번째 위치에 대응되는 위치에 AA 염기의 존부를 검출하는 제제를 더 포함하는, 내염성 토마토 선별용 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 위치의 AA 염기 존부를 검출하는 제제는 서열번호 10 및 서열번호 11의 프라이머 세트를 포함하는 것인, 내염성 토마토 선별용 조성물.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 내염성 토마토 선별용 키트.

청구항 9

확인 대상 토마토의 SICIPK24 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 483~535번째 염기서열 부분에 대응되는 부분이 있는지를 확인하는 단계; 및

상기 대응되는 부분이 없으면 내염성 토마토로 판단하는 단계를 포함하는, 내염성 토마토 선별 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 확인 단계는 상기 위치의 염기서열 부분을 포함하는 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 상기 위치의 염기서열 부분을 포함하는 영역에 상보적으로 결합하는 프로브에 의해 수행되는 것인, 내염성 토마토 선별 방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 확인 단계는 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머세트에 의해 상기 위치의 염기서열 부분을 포함하는 영역을 특이적으로 증폭하여 수행되는 것인, 내염성 토마토 선별 방법.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 프로모터 영역에서 서열번호 1의 1687~1689번째 위치에 대응되는 위치에 AATA 염기의 존부 및 서열번호 1의 1695번째 위치에 대응되는 위치에 GTA 염기의 삽입 여부를 확인하는 단계; 및

상기 위치에 AATA 염기 및 GTA 염기가 존재하는 경우에는 내염성 토마토로 판단하는 단계를 더 포함하는, 내염성 토마토 선별 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 위치의 특정 염기 존부를 확인하는 단계는 서열번호 10 및 서열번호 11의 프라이머 세트에 의해 상기 위치를 포함하는 영역을 특이적으로 증폭하여 수행되는 것인, 내염성 토마토 선별 방법.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 상기 프로모터 영역에서 서열번호 1의 1652~1653번째 위치에 대응되는 위치에 AA 염기 존부를 확인하는 단계; 및

상기 위치에 AA 염기가 존재하는 경우에는 내염성 토마토로 판단하는 단계를 더 포함하는, 내염성 토마토 선별 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 위치의 AA 염기 존부를 확인하는 단계는 서열번호 10 및 서열번호 11의 프라이머 세트에 의해 상기 위치를 포함하는 영역을 특이적으로 증폭하여 수행되는 것인, 내염성 토마토 선별 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 내염성 토마토 판별용 분자마커 및 이를 이용한 토마토 선별방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 일반적으로 식물의 품종간 구분은 품종 보호 및 개량된 품종 선별 등 여러 가지 목적을 가지는 것으로, 표현형에 근거하여 수행되어 왔으나, 표현형은 환경요인에 많은 영향을 받기 때문에 통계적으로 많은 실험을 요구한다. 또한 품종간 구별에 있어 표현형은 객관적 기준이 불분명하고 체감적인 차이를 반영하지 못한다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 DNA 분자 마커를 개발하기 시작했다.
- [0004] 토마토는 고부가가치 글로벌 채소작물로서 국내에서도 그 중요성이 점차적으로 증가하고 있으나 우수한 품종의 개발이 이루어지지 않아 수입품종에 대한 의존도가 높은 실정이며, 토마토의 시설 재배로 인한 토양의 염류 집적과 간척지 재배를 위해 내염성 토마토 품종의 개발이 요구되는 상황이나 국내에서 개발된 내염성 토마토 품종은 전무한 상태이다.
- [0005] 소비자에게 선호도가 높은 대저(일명 짹짹이) 토마토는 일본 사카다 종묘가 개발한 내염성 품종으로 종자의 가격이 비싸고 불량률이 높아 국내 토마토 농가에 피해를 주고 있는바, 농가의 피해를 막고 종자 수입에 따른 로열티 지불에 대한 부담을 줄이기 위해 내염성 토마토 품종을 개발할 필요성이 존재한다.
- [0006] 다만, 토마토는 국내 품종육성의 역사가 짧아 전문 육종인력이 부족하고, 민간 종자회사의 영세성으로 우수한 품종 개발 및 보급이 지체되고 있을 뿐만 아니라, 내염성 토마토 품종 육종을 위해 필요한 효율적인 분자 마커가 존재하지 않는 실정이다.
- [0007] 내염성 토마토 품종을 신속하고 경제적으로 육성하기 위해서는 염해 저항성과 밀접하게 연관된 분자마커의 개발이 선행되어야만 한다. 이처럼 개발된 내염성-연관 분자마커는 다양한 토마토 집단에서 분자표지 활용 선발(Marker-Assisted Selection, MAS)을 통해서 내염성 토마토를 유묘 단계에서부터 조기에 분리하는데 효율적으로 이용될 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국 등록 특허 제10-1832457호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 내염성 토마토 판별용 분자마커 및 이를 이용한 토마토 선별방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 1. 확인 대상 토마토의 SICIPK24 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 483~535번째 위치에 대응되는 염기의 결실 여부를 검출하는 제제를 포함하는, 내염성 토마토 선별용 조성물.
- [0013] 2. 위 1에 있어서, 상기 제제는 상기 염기 결실 부위를 포함하는 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 상기 염기 결실 부위를 포함하는 영역에 상보적으로 결합하는 프로브인, 내염성 토마토 선별용 조성물.
- [0014] 3. 위 1에 있어서, 상기 제제는 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머인 것인, 내염성 토마토 선별용 조성물.
- [0015] 4. 위 1에 있어서, 확인 대상 토마토의 SICIPK24 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 1687~1689번째 위치에 대응되는 위치에 AATA 염기의 존부 및 서열번호 1의 1695번째 위치에 대응되는 위치에 GTA 염기의 삽입 여부를 검출하는 제제를 더 포함하는, 내염성 토마토 선별용 조성물.
- [0016] 5. 위 4에 있어서, 상기 위치의 염기의 존부 및 삽입 여부를 검출하는 제제는 서열번호 11의 프라이머를 포함하는 것인, 내염성 토마토 선별용 조성물.
- [0017] 6. 위 4에 있어서, 확인 대상 토마토의 SICIPK24 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 1652~1653번째 위치에 대응되는 위치에 AA 염기의 존부를 검출하는 제제를 더 포함하는, 내염성 토마토 선별용 조성물.
- [0018] 7. 위 6에 있어서, 상기 위치의 염기 존부를 검출하는 제제는 서열번호 10의 프라이머를 포함하는 것인, 내염성 토마토 선별용 조성물.

- [0019] 8. 위 1 내지 7 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 내염성 토마토 선별용 키트.
- [0020] 9. 확인 대상 토마토의 SICIPK24 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 483~535번째 염기서열 부분에 대응되는 부분이 있는지를 확인하는 단계; 및 상기 대응되는 부분이 없으면 내염성 토마토로 판단하는 단계를 포함하는, 내염성 토마토 선별 방법.
- [0021] 10. 위 9에 있어서, 상기 확인 단계는 상기 위치의 염기서열 부분을 포함하는 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 상기 위치의 염기서열 부분을 포함하는 영역에 상보적으로 결합하는 프로브에 의해 수행되는 것인, 내염성 토마토 선별 방법.
- [0022] 11. 위 9에 있어서, 상기 확인 단계는 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머에 의해 상기 위치의 염기서열 부분을 포함하는 영역을 특이적으로 증폭하여 수행되는 것인, 내염성 토마토 선별 방법.
- [0023] 12. 위 9에 있어서, 상기 프로모터 영역에서 서열번호 1의 1687~1689번째 위치에 대응되는 위치에 AATA 염기의 존부 및 서열번호 1의 1695번째 위치에 대응되는 위치에 GTA 염기의 삽입 여부를 확인하는 단계; 및 상기 위치에 AATA 염기 및 GTA 염기가 존재하는 경우에는 내염성 토마토로 판단하는 단계를 더 포함하는, 내염성 토마토 선별 방법.
- [0024] 13. 위 12에 있어서, 상기 위치의 특정 염기 존부를 확인하는 단계는 서열번호 11의 프라이머에 의해 상기 위치를 포함하는 영역을 특이적으로 증폭하여 수행되는 것인, 내염성 토마토 선별 방법.
- [0025] 14. 위 12에 있어서, 상기 프로모터 영역에서 서열번호 1의 1652~1653번째 위치의 AA 염기 존부를 확인하는 단계; 및 상기 위치에 AA 염기가 존재하는 경우에는 내염성 토마토로 판단하는 단계를 더 포함하는, 내염성 토마토 선별 방법.
- [0026] 15. 위 14에 있어서, 상기 위치의 특정 염기 존부를 확인하는 단계는 서열번호 10의 프라이머에 의해 상기 위치를 포함하는 영역을 특이적으로 증폭하여 수행되는 것인, 내염성 토마토 선별 방법.

발명의 효과

- [0028] 본 발명은 토마토의 내염성 표현형과 밀접하게 연관이 되어있는 신규한 분자마커들을 개발한 것으로, 이들 마커를 활용하면 염해(염분)에 저항성이 있는 토마토의 품종개발에 소요되는 비용과 시간을 획기적으로 절약할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 온실 안의 모종판 배치도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 염해 처리 전 토마토 계통 162라인의 성장 상태를 나타낸 것이다.
- 도 3은 염해(300mM NaCl) 처리 후 10일 째 민감한 반응을 보이는 계통의 예시로서, (A) 토마토 육종계통 1204, 1205, 1210과 1322 라인이 각각 포함된 모종판의 모습 및 (B) 염해에 민감한 1210 및 1322 계통의 모습을 나타낸 것이다.
- 도 4는 염해 처리 후 28일 째 내염성 계통을 나타낸 것이다.
- 도 5는 토마토 계통에 따른 SICIPK24 유전자의 발현량을 비교 분석한 결과로서, 토마토 1357 계통에서 SICIPK24의 발현량을 기준값 1로 잡고, 나머지 계통에서의 발현량을 상대값으로 표시하였다.
- 도 6은 토마토 계통에서 증폭된 SICIPK24 프로모터 DNA를 보여주는 아가로즈 젤에 전기영동한 결과이다.
- 도 7은 토마토 15 계통으로부터 확보된 SICIPK24 프로모터 염기서열의 얼라인먼트 결과로서, GenBank에 있는 토마토 계통 Heinz 1706과 비교한 결과이다.
- 도 8은 염 처리에 따른 토마토 계통별 SICIPK24 유전자 발현량의 변화를 나타낸 것으로, 토마토 1357 계통의 0 h SICIPK24 발현량을 기준값 1로 잡고 나머지 계통에서의 발현량을 상대값으로 표시하였다.
- 도 9는 MS 배지에서 선발된 토마토 계통의 내염성을 조사한 것으로, 4일 자란 토마토 유묘를 표시된 MS 배지에 옮겨 5일 동안 키운 후 찍은 사진이다.
- 도 10은 토양에서 선발된 토마토 계통의 내염성을 조사한 것으로, 발아 후 2 주된 토마토 유묘를 화분에 옮겨

물 또는 300 mM NaCl 용액을 주며 3 주 동안 키운 후 찍은 사진이다.

도 11은 내염성 공동우성 마커(codominant marker) 및 우성 마커를 위한 프라이머 염기서열 및 이를 이용한 PCR 검증 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0033] 본 발명은 확인 대상 토마토의 SICIPK24 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 483~535번째 위치에 대응되는 염기의 결실 여부를 검출하는 제제를 포함하는, 내염성 토마토 선별용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0034] 상기 확인 대상 토마토는 내염성 또는 민감성 토마토를 구별하기 위한 목적으로 염기서열 변이를 검출하는 대상이 되는 미지의 토마토를 의미하며, 상기 내염성(salt-tolerant) 토마토는 염분이 포함되어 있는 토양에서도 성장할 수 있는 토마토를 의미하는 것으로서, 본래의 토마토, 즉 민감성 토마토는 염이 일정 수준 이상 토양에 쌓이면 작물은 뿌리에서 수분을 제대로 흡수하지 못하고 식물세포는 정상적인 대사활동을 할 수 없어 성장이 어려우나, 내염성 토마토는 염에 대해 저항성을 가지고 있어 염의 농도가 높은 토양에서도 재배가 가능한 특성을 갖는다.
- [0036] 상기 SICIPK24 유전자는 SISOS2, SOS2 또는 CIPK24 유전자와 동일한 유전자(Gene ID: 778340)이며, 해당 유전자가 과발현된 식물의 염분 내성 증가는 줄기 및 잎에서의 더 높은 나트륨 함량과 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다.
- [0037] 상기 프로모터는 전사의 시작에 관여하는 유전자의 상류 영역으로, RNA 중합효소가 DNA 가닥의 한 부위에 결합하여 전사가 시작되는 부위를 말한다.
- [0038] 상기 서열번호 1은 SICIPK24 유전자의 프로모터 영역에 해당되는 서열로, 해당 유전자의 상류 영역을 의미하며, SICIPK24 유전자의 발현량을 조절하는 것일 수 있다.
- [0039] 일반적으로 유전자의 발현은 프로모터 영역의 서열, 프로모터 영역에 결합하는 다양한 전사인자 단백질, RNA 결합 단백질, 인트론 서열의 차이, 유전자 자체의 안정성 또는 microRNA 등에 의해 조절될 수 있다.
- [0040] 상기 제제는 상기 특정 위치의 염기 결실 여부를 검출 또는 확인할 수 있는 제제라면 그 종류는 제한되지 않으며, 예를 들면 상기 염기 결실 부위를 포함하는 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 상기 염기 결실 부위를 포함하는 영역에 상보적으로 결합하는 프로브일 수 있으며, 구체적으로는 서열번호 8 및 9일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 또한 본 발명의 내염성 토마토 선별용 조성물은 확인 대상 토마토의 SICIPK24 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 1687~1689번째 위치에 대응되는 위치에 AATA 염기의 존부 및 서열번호 1의 1695번째 위치에 대응되는 위치에 GTA 염기의 삽입 여부를 검출하는 제제를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0043] 내염성 토마토 계통(품종)은 SICIPK24의 프로모터 영역(서열번호 1)에서 민감성 토마토 계통과 달리, 서열번호 1의 1687~1689번째 위치(개시코돈 기준 상류영역의 -199~-196번째 위치)에 대응되는 위치에 ATT 대신 AATA 염기가 존재하고, 서열번호 1의 1695번째 위치(개시코돈 기준 상류영역의 -191~-190번째 위치 사이)에 대응되는 위치에 GTA 염기가 삽입되어 있음을 확인하였다. 따라서 상기 위치에 특정 염기의 존부를 확인할 수 있다면, 대상 토마토가 내염성인지 민감성인지 구별이 가능하다.
- [0044] 상기 제제는 상기 특정 위치의 염기 존부를 검출 또는 확인할 수 있는 제제라면 그 종류는 제한되지 않으며, 예를 들면 상기 특정 위치의 염기를 포함하는 영역을 특이적으로 증폭할 수 있거나, 상기 특정 위치의 염기에 상보적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으며, 구체적으로는 정방향 프라이머 또는 역방향 프라이머가 서열번호 11일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 서열번호 11의 프라이머는 민감성 토마토 계통과 차이를 보이는 염기서열에 상보적이므로, 내염성 토마토의 경우에만 서열번호 11의 프라이머가 상보적으로 결합이 가능하다. 따라서 상기 정방향 프라이머가 서열번호 11인 경우에, 역방향 프라이머는 서열번호 11의 프라이머가 상보적으로 결합하는 서열번호 1의 염기서열 위치보다 하류에 위치하는 염기서열에 상보적으로 결합하는 것이라면 그 서열은 특정 염기서열에 제한되지 않는다. 마찬가지로 상기 역방향 프라이머가 서열번호 11인 경우에, 정방향 프라이머는 서열번호 11의 프라이머가 상보적으로 결합하는 서열번호 1의 염기서열 위치보다 상류에 위치하는 염기서열에 상보적으로 결합하는 것이라면 그 서열

은 특정 염기서열에 제한되지 않는다.

- [0047] 또한 본 발명의 내염성 토마토 선별용 조성물은 서열번호 1의 1652~1653번째 위치 (개시코돈 기준 상류영역의 -234~-233번째 위치)에 대응되는 위치에 AA 염기 존부를 검출하는 제제를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0048] 내염성 토마토 중 가장 우수한 내염성을 나타내는 토마토 계통(품종)은 서열번호 1(SICIPK24의 프로모터 영역)의 1652~1653번째 위치 (개시코돈 기준 상류영역의 -234~-233번째 위치)에 대응되는 위치에 TT가 아닌 AA 염기가 존재함을 확인하였다. 따라서 상기 위치에 특정 염기 존부를 확인할 수 있다면, 보다 우수한 내염성을 가지는 토마토를 구별할 수 있다.
- [0049] 상기 제제는 상기 특정 위치의 염기 존부를 검출 또는 확인할 수 있는 제제라면 그 종류는 제한되지 않으며, 예를 들면 상기 특정 위치의 특정 염기를 포함하는 영역을 특이적으로 증폭할 수 있거나, 상기 특정 위치의 특정 염기에 상보적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으며, 구체적으로는 정방향 프라이머 또는 역방향 프라이머가 서열번호 10일 수 있으나, 바람직하게는 정방향 프라이머는 서열번호 10이고 역방향 프라이머는 서열번호 11일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명은 내염성 토마토 선별용 키트를 제공할 수 있다.
- [0052] 상기 내염성 토마토 선별용 키트는 내염성 토마토 선별용 조성물이 포함된 키트를 의미한다. 상기 키트는 키트를 사용하기 위한 방법이 기재된 설명서를 더 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명은 내염성 토마토를 선별하는 방법을 제공할 수 있다.
- [0055] 상기 내염성 토마토를 선별하는 방법은 확인 대상 토마토의 SICIPK24 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 483~535번째 염기서열 부분에 대응되는 부분이 있는지를 확인하는 단계 및 상기 대응되는 부분이 없으면 내염성 토마토로 판단하는 단계를 포함한다.
- [0056] 상기 확인 단계는 상기 위치의 염기서열 부분을 포함하는 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 상기 위치의 염기서열 부분을 포함하는 영역에 상보적으로 결합하는 프로브에 의해 수행되는 것일 수 있고, 상기 특정 위치의 염기 결실 여부를 확인할 수 있는 프라이머 또는 프로브라면, 그 서열은 특정 서열에 한정되지 않는다.
- [0057] 구체적으로 특정 위치의 염기서열에 대응되는 부분이 있는지를 확인할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하고, 이후 PCR 생산물의 사이즈를 확인하거나 PCR 생산물에 대해 시퀀싱을 진행하여 특정 위치의 염기가 결실되었는지 확인하는 방식으로 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 프라이머의 구체적인 서열은 전술한 바와 같다.
- [0058] 상기 PCR 생산물의 사이즈는 프라이머 서열에 따라 정해지는 것으로, 특정 사이즈에 제한되지 않으나, 변이 (variation)의 확인이 쉽고 PCR 증폭에 필요한 시간이 짧은 측면에서는 PCR 생산물의 사이즈가 500bp 내외인 것이 바람직할 수 있다.
- [0059] 상기 내염성 토마토로 판단하는 단계는 프라이머의 서열에 따라 PCR 생산물의 사이즈에는 차이가 있겠지만, 민감 토마토의 gDNA로 수행한 PCR 생산물과 비교하여 PCR 생산물의 사이즈가 결실 부위만큼 짧은 경우에는, 내염성 토마토로 판단할 수 있다.
- [0061] 또한, 본 발명의 내염성 토마토 선별 방법은 확인 대상 토마토의 SICIPK24 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 1687~1689번째 위치에 대응되는 위치에 AATA 염기의 존부 및 서열번호 1의 1695번째 위치에 대응되는 위치에 GTA 염기의 삽입 여부를 확인하는 단계 및 상기 위치에 AATA 염기 및 GTA 염기가 존재하는 경우에는 내염성 토마토로 판단하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0062] 이 단계는 전술한 단계와 별도로 수행될 수도 있고, 전술한 단계에 추가로 수행될 수도 있다.
- [0063] 상기 위치의 특정 염기 존부를 확인하는 단계는 상기 특정 위치의 염기를 포함하는 영역을 특이적으로 증폭할 수 있거나, 상기 특정 위치의 염기에 상보적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브에 의해 수행되는 것일 수 있고, 상기 특정 위치의 염기 존부를 확인할 수 있는 프라이머 또는 프로브라면, 그 서열은 특정 서열에 한정되지 않는다.
- [0064] 구체적으로 상기 특정 위치의 염기 존부를 확인할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하고, 이후 PCR 생산물의 존부, 즉 증폭 여부를 확인하거나 증폭이 일어난 경우라도 PCR 생산물에 대해 시퀀싱을 수행하여 염기서열

을 확인하는 방식으로 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 프라이머의 구체적인 서열은 전술한 바와 같다.

[0065] 상기 내염성 토마토로 판단하는 단계는 특정 위치의 염기서열이 존재하는 경우에는 프라이머가 상보적으로 결합하여 PCR 증폭이 수행되지만, 해당 위치에 다른 염기서열이 존재하는 경우에는 프라이머가 상보적으로 결합하지 못하여 PCR 증폭이 일어나지 않으므로, PCR 생산물이 존재하는 경우에는 내염성 토마토로 판단할 수 있다.

[0067] 또한, 본 발명의 내염성 토마토 선별 방법은 확인 대상 토마토의 SICIPK24 유전자의 프로모터 영역에서 서열번호 1의 1652~1653번째 위치에 대응되는 위치에 AA 염기 준부를 확인하는 단계 및 상기 위치에 AA 염기가 존재하는 경우에는 내염성 토마토로 판단하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0068] 이 단계는 전술한 단계와 별도로 수행될 수도 있고, 전술한 단계에 추가로 수행될 수도 있다.

[0069] 상기 위치의 특정 염기 준부를 확인하는 단계는 상기 특정 위치의 염기를 포함하는 영역을 특이적으로 증폭할 수 있거나, 상기 특정 위치의 염기에 상보적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브에 의해 수행되는 것일 수 있고, 상기 특정 위치의 염기 준부를 확인할 수 있는 프라이머 또는 프로브라면, 그 서열은 특정 서열에 한정되지 않는다.

[0070] 바람직하게는 상기 특정 위치의 염기 준부를 확인할 수 있는 프라이머와 서열번호 1의 1687~1689번째 위치에 대응되는 위치에 AATA 염기의 준부 및 1695번째 위치에 대응되는 위치에 GTA 염기의 삽입 여부를 확인할 수 있는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하고, 이후 PCR 생산물의 준부, 즉 증폭 여부를 확인하거나 증폭이 일어난 경우라도 PCR 생산물에 대해 시퀀싱을 수행하여 염기서열을 확인하는 방식으로 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 프라이머의 구체적인 서열은 전술한 바와 같다.

[0071] 상기 내염성 토마토로 판단하는 단계는 특정 위치의 염기서열이 존재하는 경우에는 프라이머가 상보적으로 결합하여 PCR 증폭이 수행되지만, 해당 위치에 다른 염기서열이 존재하는 경우에는 프라이머가 상보적으로 결합하지 못하여 PCR 증폭이 일어나지 않으므로, PCR 생산물이 존재하는 경우에는 내염성 토마토로 판단할 수 있다.

[0073] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0075] **실시예**

[0076] **1. 실험방법**

[0077] **(1) 토마토 육종계통에 대한 염해 처리**

[0078] 아시아 종묘가 보유한 토마토 육종계통 총 162라인을 대상으로 내염성 정도를 비교 분석하였다. 각 계통별로 4 개체씩 자라도록 흩이 담긴 모종판에 씨앗을 심었으며, 이러한 모종판을 2 세트 만들어 온실에 배열하였다 (도 1). 즉, 8 개체씩을 분석하였다. 가급적 동일한 조건에서 모든 식물들이 성장할 수 있도록 매일 시계방향으로 모판을 옮겨가며 키웠음. 3주 동안 키운 후 300 mM NaCl 용액을 동일하게 처리하여 토마토의 성장을 관찰하였다. 분석이 이루어지는 동안 온실의 평균 온도는 21 °C ~ 27 °C 사이에서 유지되었다.

[0079] **(2) Total RNA 분리 및 qRT-PCR**

[0080] TRIzol 시약(Invitrogen)을 사용하여 토마토 식물 조직에서 total RNA를 제조업체의 지침에 따라 추출하였다. RNA 양과 질은 분광광도계 (OD: 260/280)와 1.2% 아가로스 젤에서 전기영동으로 모니터링하였다. QuantiTech SYBR Green RT-PCR 키트(QIAGEN)를 사용하여 Rotor-Gene Q (QIAGEN) 기계로 실시간 정량 RT-PCR (qRT-PCR) 분석을 수행하였다. 간단히 요약하면, total RNA 1µg을 각 프라이머 0.25 mM와 QuantiTect SYBR Green RT-PCR 마스터 믹스 및 2x QuantiTect RT 믹스가 포함된 10µL 반응 샘플에 첨가하여 주형으로 사용하였다. 50° C에서 20 분 동안 역전사를 한 후, 샘플을 95° C에서 15 분 동안 변성시킨 후 15초 동안 95° C 변성, 20초 동안 55° C 어닐링, 20초 동안 72° C로 구성된 35 회의 PCR주기를 거쳤다.

[0081] qRT-PCR 분석에 사용된 프라이머는 SICIPK23-RT1: 5'-TAAGCATAGAATGGTTGAACAGATC-3' (서열번호 2)와 SICIPK24-RT2: 5'-CAGAAAGCTACCTAGTAGAACAAAT-3' (서열번호 3)이며, 발현량 보정을 위한 internal control로는 housekeeping 유전자인 Actin7에 대해 프라이머를 제작하여 사용하였다. (SIACTIN7-RT_F: 5'-TGCTAGCGGTCGTACCACTGGTATT-3' (서열번호 4)와 SIACTIN7-RT_R: 5'-TACAATTCCCGTTCAGCAGTAGTG-3' (서열번호 5))

[0082] (3) 식물 Genomic DNA 분리

[0083] 식물 조직을 액체질소로 얼린 후 막자사발을 이용하여 곱게 갈았다. 곱게 갈린 식물 조직으로부터 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)을 사용하여 Genomic DNA를 추출하였다. 분리된 genomic DNA 양과 질은 분광광도계 (OD: 260/280)를 이용하여 분석하였다.

[0084] (4) SICIPK24 promoter 부위 분리 및 염기서열 결정

[0085] SICIPK24 유전자의 해독 개시암호 ATG로부터 상위 약 2 kb genomic DNA 부위를 SICIPK24 P_F: 5'-GCGGATCAATTTATCTAGAAAGG-3' (서열번호 6)와 SICIPK24 P_R: 5'-ACTTCCAAGCTTCTCTTCAC-3' (서열번호 7)의 프라이머 세트와 proof reading activity가 있는 pfu DNA polymerase를 사용하여 증폭하였다 (도 6). QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN)를 사용하여 아가로스 겔로부터 PCR 산물을 분리하여 분광광도계 (OD: 260/280)를 이용하여 정량하였다. 분리된 PCR 산물의 염기서열은 (주)마크로젠의 염기서열 분석 서비스를 이용하여 결정하였다.

[0087] 2. 실험결과

[0088] (1) 토마토 육종계통에서 염해에 대한 민감성 및 저항성 라인 선발

[0089] 염해 처리를 수행하기 전의 식물들은 거의 모든 계통의 식물체들이 눈에 띄는 차이 없이 비교적 잘 자라는 모습을 보였다 (도 2). 하지만, NaCl 300 mM 용액을 처리하고 7일이 지나면서 개체별로 염해에 대해 약간씩 다른 반응을 보이기 시작하였다. 즉 잎이 노란색으로 변하거나 시들며 떨어지는 현상을 보이는 개체들이 나타나기 시작하였으며 10일 이후부터 다른 계통에 비해 염해에 더 민감하거나 더 저항성을 보이는 계통을 확인할 수 있었다 (민감성 계통: 1204, 1205, 1206, 1210, 1321, 1322; 내염성 계통: 1142, 1164, 1172, 1173, 1206, 1222, 1229, 1267, 1268, 1327, 1357) (도 3).

[0090] 모종판에서 확인된 내염성 계통 11라인의 식물체를 화분으로 옮겨 300 mM NaCl 용액을 계속해서 처리하였다. 28일 경과 후 염해 저항성 여부를 잎의 황백화와 탈리 그리고 전체적인 성장저해 정도를 관찰하여 비교 분석하였다 (도 4). 그 결과 최종적으로 가장 우수한 내염성 계통 3 라인(1172, 1206, 1222)을 선별할 수 있었다 (표 1).

[0092] [표 1]

염 처리 후	10일 차		28일 차	
	민감성	저항성	민감성	저항성
토마토 계통	1204, 1205, 1210, 1321, 1322	1142, 1164, 1172, 1173, 1206, 1222, 1229, 1267, 1268, 1327, 1357	-	1172, 1206, 1222

[0093]

[0095] (2) 염해 민감성 및 저항성 토마토 계통에서의 SICIPK24 유전자 발현 및 염기서열 분석

[0096] 모델 식물인 애기장대의 연구결과에 따르면 CIPK24 유전자의 발현량은 내염성 과 연관되어 있다. 본 연구자는 선행연구를 통해 토마토 CIPK24 유전자(SICIPK24)의 발현량이 증가하면 토마토 식물체의 내염성도 향상됨을 확인하였다. 따라서 선발된 토마토 15 계통을 대상으로 SICIPK24 유전자의 발현량을 조사하였다. MS 배지에서 종자 발아 후 19일에 100 mM NaCl을 12 h 동안 처리한 후 뿌리로부터 total RNA를 분리하여 qRT-PCR 기술을 이용하여 분석하였다 (도 5). 그 결과 상대적으로 우수한 내염성을 보였던 세 개의 계통(계통번호 1172, 1206, 1222)이 더 높은 수준의 SICIPK24 발현량을 보이고 있음을 알 수 있었다.

[0097] 상기 토마토 계통 사이에서 발견된 SICIPK24 유전자의 발현량 차이는 SICIPK24 프로모터의 서로 다른 활성에서 비롯되었을 가능성이 있다. 이를 조사하기 위해 민감성과 내염성을 포함하는 총 15계통에서 SICIPK24 프로모터에 해당하는 부위를 PCR로 분리하여 염기서열을 결정하고 열라인먼트를 수행하여 비교 분석하였다 (도 7). 그 결과 SICIPK24의 발현량이 높았던 세 계통의 토마토(1172, 1206, 1222)과 다른 계통사이에 차이가 있음을 발견하였다. 첫째, 다른 계통에 존재하는 -1350에서 -1297 사이의 53 bp가 세 계통에서는 결실되어 있고, 둘째, -198과 -196 위치에 ATT 대신에 AATA가 존재하였으며, 셋째, -191 부근에 3 염기 GTA가 첨가되어 있음을 확인하였다. 흥미롭게도, SICIPK24의 발현량이 가장 높았던 1172 계통의 경우에는 -234와 -233위치에 TT 대신 AA 염기서열을 유일하게 보유하고 있었다.

[0098] SICIPK24 프로모터의 53 bp (-1350 ~ -1297) 부위와 SICIPK24 mRNA 발현 수준과의 상관관계를 입증하기 위해

53 bp 부위가 없는 세 계통(1172, 1206, 1222)과 53 bp를 소유한 두 계통(1204와 1357)을 선발하여 도 5와 같은 실험을 다시 수행하였다. 한 가지 차이점은 토마토 조직을 염 처리 후 4시간 간격으로 12시간까지 채취하여 분석한 것이다 (도 8). 그 결과 53 bp 부위가 결여된 SICIPK24 프로모터가 염해에 반응하여 월등하게 더 높은 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0099] 토마토 내염성 표현형의 재검증하기 위해, 염해 처리 시에 SICIPK24 유전자의 발현이 현저히 높은 토마토 3 계통(1172, 1206, 1222)을 대상으로 내염성 정도를 1357 계통과 비교하여 다시 한 번 조사하였다. 이를 위해 상기 토마토 종자를 MS agar 배지에서 발아시켰다. 발아 후 4일 동안 자란 유묘(seedling)를 0 mM 또는 25 mM NaCl 이 첨가된 MS agar 배지에 각각 옮겨 growth chamber(25 °C, 16/8 h light/dark cycle)에서 5일 동안 키웠다 (도 9). 25 mM NaCl을 함유한 MS 배지에서 SICIPK24 프로모터에 53 bp 부위가 없는 3 계통(1172, 1206, 1222)이 모두 1357 계통에 비해 매우 우수한 뿌리 성장과 발달(lateral root 형성)을 보였다. 하지만 NaCl이 첨가되지 않은 MS control 배지에서 상기 4 계통은 비슷한 성장 모습을 보였다.

[0100] 또한, SICIPK24 유전자의 발현이 상대적으로 가장 높았던 1172와 1206 토마토 계통을 이용하여 토양에서도 내염성 조사를 수행하였다 (도 10). MS 배지에서의 실험 결과처럼 1172와 1206 계통이 Heinz와 1357에 비해 상대적으로 우수한 내염성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 흥미롭게도 SICIPK24 유전자의 발현이 가장 높았던 1172 계통이 가장 우수한 내염성을 보였다. 이러한 결과는 SICIPK24 프로모터의 활성이 토마토의 내염성과 밀접한 연관이 있음을 보여주고, SICIPK24 프로모터의 염기서열 차이는 내염성 분자표지로 이용될 수 있음을 의미한다.

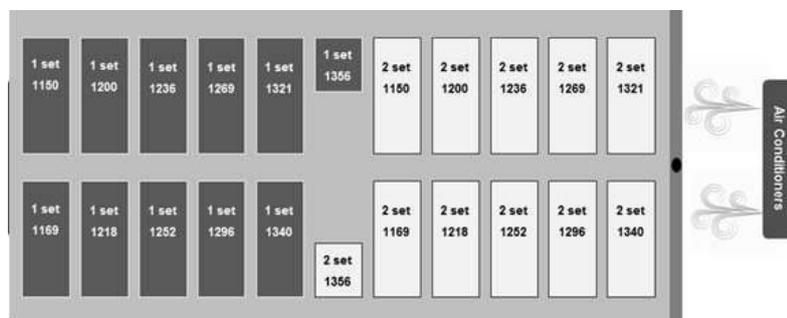
[0102] **(3) 염해 민감성 및 저항성 토마토 계통의 염기서열 차이를 이용한 내염성 (공동)우성 분자마커 개발**

[0103] 상기 결과는 SICIPK24 프로모터의 53 bp 존재 유무가 내염성 분자표지로 사용될 수 있음을 나타낸다. 따라서 해당 부위를 포함하는 프라이머 세트 (SICIPK24-pro-mar3: 5'-TTGTTTGATTGTCGGTGTGATGGG-3' (서열번호 8)와 SICIPK24-pro-mar4: 5'-TGGTCGTTATCGATTAAGTTATTGA-3' (서열번호 9)를 제작하여 PCR을 수행하면 내염성 계통을 선별할 수 있다 (도 11a). 내염성 계통은 513 bp PCR 산물을 생산하므로 566 bp의 PCR 산물을 생산하는 감수성 계통과 분별이 가능하다.

[0104] 또한, 토마토 계통번호 1172는 염해 처리 시 다른 계통보다 SICIPK24 유전자의 발현이 현저히 높았으며 내염성도 뛰어났다. 따라서 해당 대립형질(allele)을 찾을 수 있는 우성 마커를 개발하였다 (도 11b). 프라이머 세트 (SICIPK24-pro-mar1: 5'-TTTTACTTAAACAGAAATAATTTTTTTTAA-3' (서열번호 10)와 SICIPK24-pro-mar2: 5'-CGCTTGCTTACTTACTTTTTTAAT-3' (서열번호 11))를 제작하여 PCR을 수행하면 1172 계통만 89 bp의 PCR 산물을 생산하게 된다.

도면

도면1



도면2

SET 1



SET 2



도면3

A.



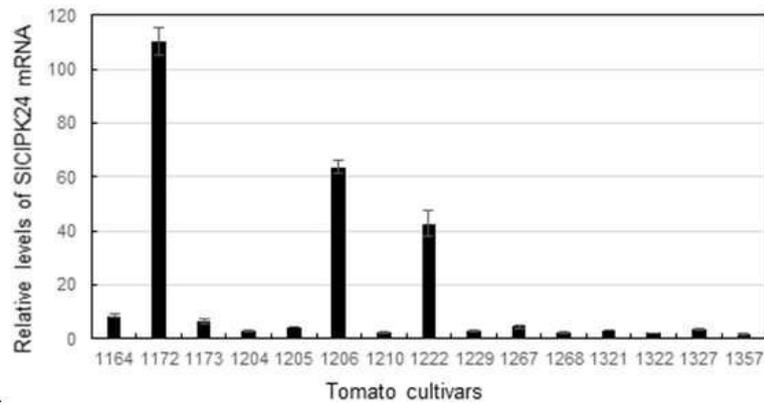
B.



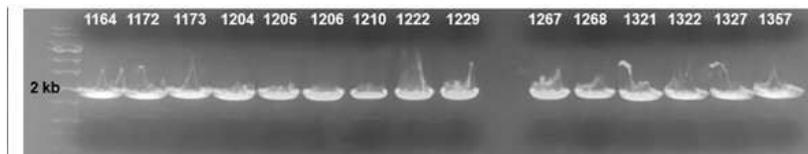
도면4



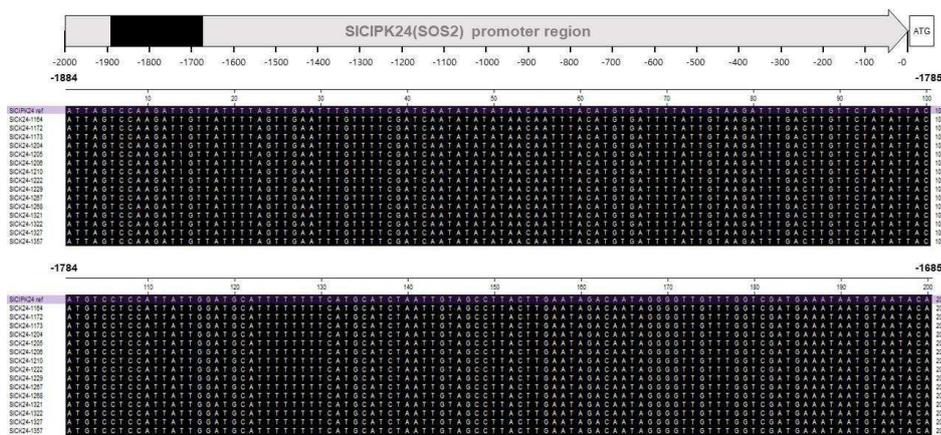
도면5



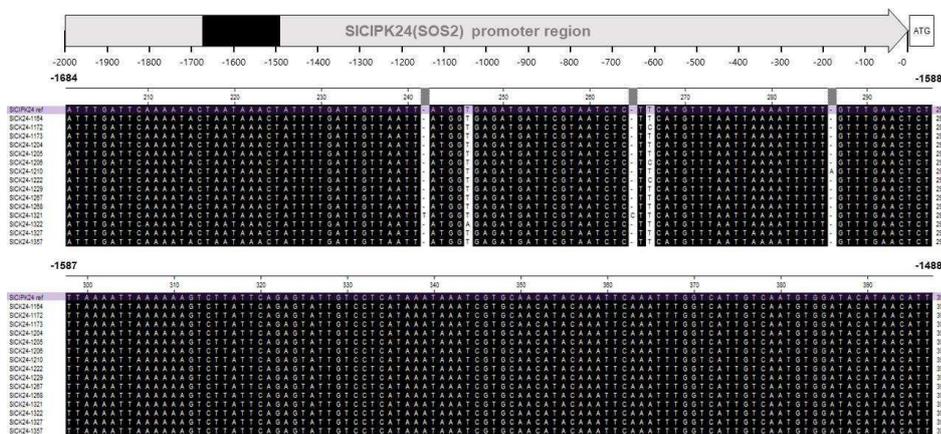
도면6



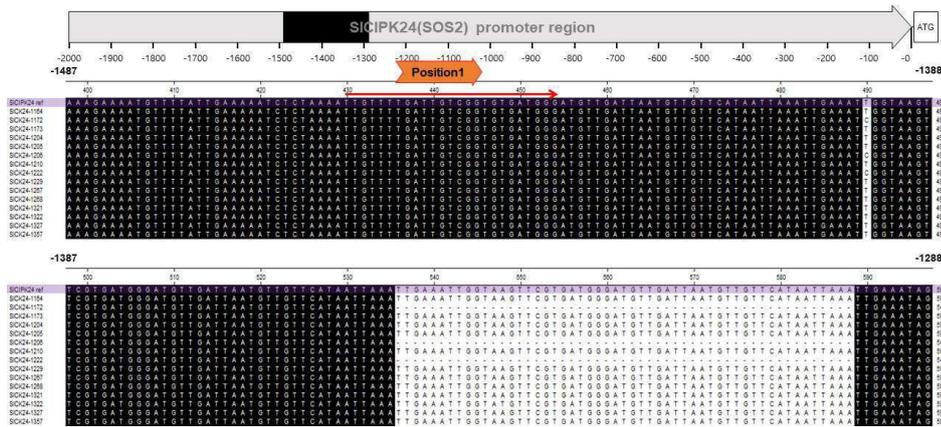
도면7a



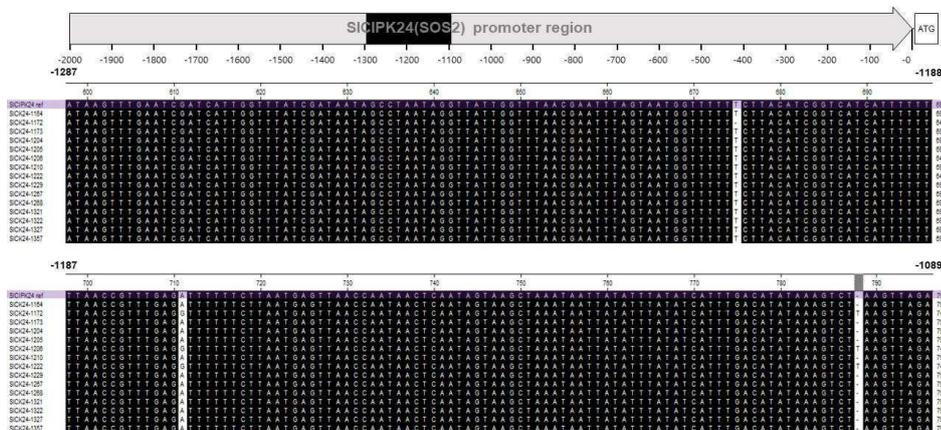
도면7b



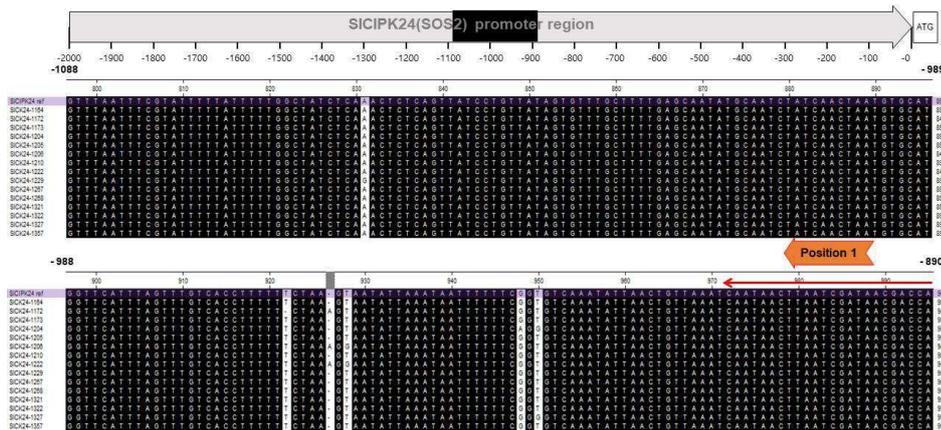
도면7c



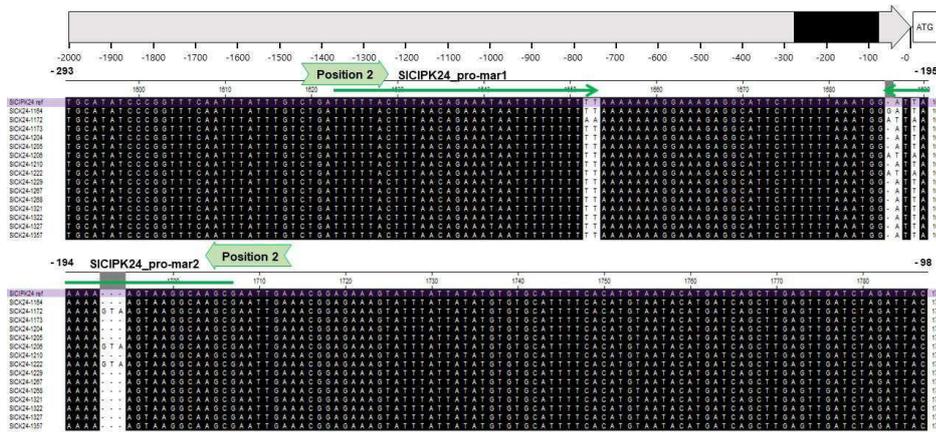
도면7d



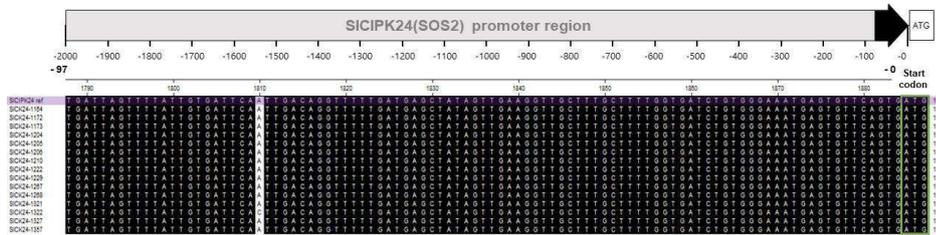
도면7e



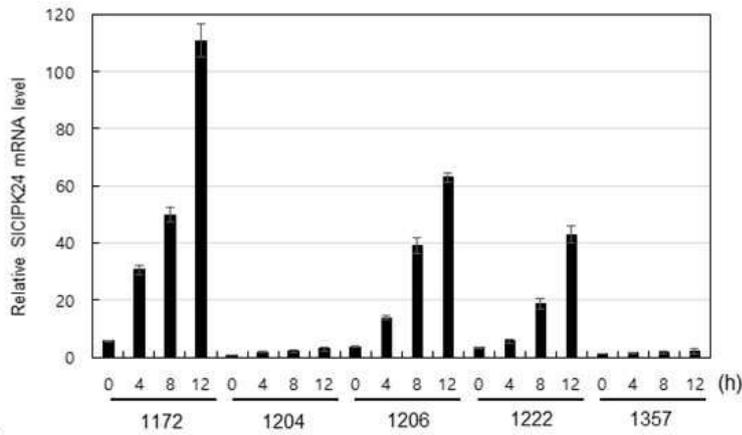
도면7i



도면7j



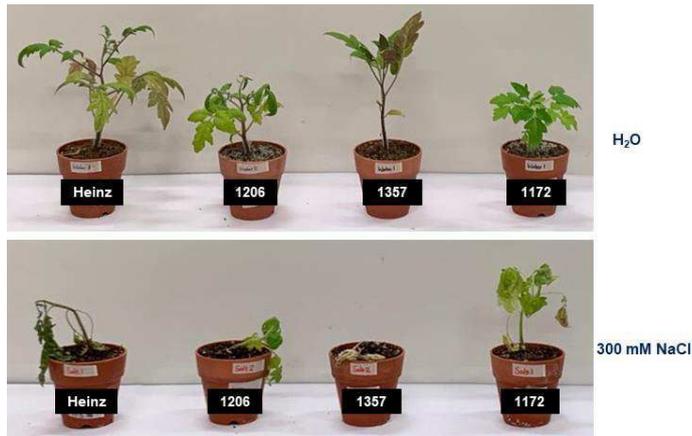
도면8



도면9

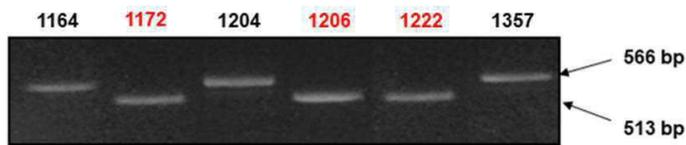


도면10

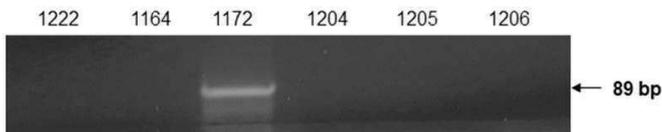


도면11

A. SICIPK24-pro-mar3 : 5'-TTGTTTTGATTGTCGGTGTGATGGG-3'
 SICIPK24-pro-mar4 : 5'-TGGTCGTTATCGATTAAGTTATTGA-3'



B. SICIPK24-pro-mar1 : 5'-TTTTTACTTTAACAGAAATAATTT TTT TTA A-3'
 SICIPK24-pro-mar2 : 5'-CGCTTGCCTTACTTACTTTTTTAAT-3'



서열목록

- <110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
- <120> Molecular marker for identification of tomatoes with salt tolerance and selection method of the tomatoes using the same
- <130> 21P06001
- <160> 11
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1887
- <212> DNA
- <213> Unknown
- <220><223> Solanum lycopersicum

<400> 1

atagtc	caagattg	tattgtaaga	tttgactt	gt tctatatt	ac atgtcctcca	ttattggatg	60
catgtg	atgtaata	atgtaata	atgtaata	atgtaata	atgtaata	atgtaata	120
catttttt	catgcatc	ta	ttgtagcct	tacttgaata	gacaatagg	gttgtttgg	180
cgatgaa	atgtaata	atgtaata	atgtaata	atgtaata	atgtaata	atgtaata	240
tatgg	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	300
aaattaaa	agcttatt	agcttatt	agcttatt	agcttatt	agcttatt	agcttatt	360
tcaaatt	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	420
tctctaaa	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	480
aattgaa	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	540
atggta	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	600
agtttga	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	660
tagta	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	720
aatgag	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	780
taaagt	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	840
tatcct	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	900
catttag	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	960
aactgt	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	1020
ggttata	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	1080
tctaa	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	1140
aat	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	1200
tcca	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	1260
tccatt	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	1320
attatt	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	1380
agg	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	1440
ttcc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	1500
atgg	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	1560
at	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	1620
gatt	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	1680
aat	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	tgattc	1740

gcattttcac atgtaataca tgatcagcctt gagttgatct agattactga ttagttttat 1800

tgtgattcaa ttgacaggtt tttgatgagc tatagttgaa ggttgctttg cttttggtga 1860

tctgtgggaa atgagtgttc agtgatg 1887

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SICIPK23-RT1

<400> 2

taagcataga atggttgaac agatc 25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SICIPK24-RT2

<400> 3

taagcataga atggttgaac agatc 25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SIACTIN7-RT_F

<400> 4

tgctagcggg cgtaccactg gtatt 25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SIACTIN7-RT_R

<400> 5

tacaatttcc cgttcagcag tagtg 25

<210> 6

<211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SICIPK24 P_F
 <400> 6
 gcggatcaat ttatctagaa agg 23

<210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SICIPK24 P_R
 <400> 7
 acttccaag ctttctcttc ac 22

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SICIPK24-pro-mar3
 <400> 8
 ttgttttgat tgtcgggtg atggg 25

<210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SICIPK24-pro-mar4
 <400> 9
 tggtcggttat cgattaagtt attga 25

<210> 10
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SICIPK24-pro-mar1
 <400> 10
 tttttacttt aacagaaata attttttta a 31

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SICIPK24-pro-mar2

<400> 11

cgcttgccctt acttactttt ttaat

25