

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245910 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **442118**

(22) Data zgłoszenia: **2022.08.27**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.03.04 BUP 10/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.10.28 WUP 44/2024**

(51) MKP:

C12Q 1/6895 (2018.01)

- | |
|--|
| (73) Uprawniony z patentu:
UNIwersytet Śląski w Katowicach,
Katowice, PL |
| (72) Twórca(-y) wynalazku:
MAREK MARZEC, Katowice, PL |
| (74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Mariusz Grzesiczak,
Dąbrowa Górnicza, PL |

(54) Tytuł:

**Sekwencje starterów pozwalające na analizę poziomu ekspresji genów w liściach i korzeniach
jęczmienia oraz sposób identyfikacji genotypów jęczmienia o podwyższonej tolerancji
na cynk i kadm**

PL 245910 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są sekwencje starterów pozwalające na analizę poziomu ekspresji genów w liściach i korzeniach jęczmienia oraz sposób identyfikacji genotypów jęczmienia o podwyższonej tolerancji na cynk i kadm. Bardziej szczegółowo zgłoszenie dotyczy starterów do identyfikacji genów o identyfikatorach HORVU.MOREX.r2.5HG0446210, HORVU.MOREX.r2.6HG0449830 kodujących odpowiednio beta-fruktofuranosylazę oraz 4,5-dioksygenazę. Dla każdego z genów zaprojektowano startery pozwalające na określenie ich poziomu ekspresji w liściach i korzeniach jęczmienia z użyciem zaproponowanego systemu badania poziomu ekspresji genów.

Metale ciężkie, do których zaliczane są między innymi ołów (Pb), kadm (Cd), cynk (Zn), rtęć (Hg), arsen (As), srebro (Ag), chrom (Cr), miedź (Cu) czy żelazo (Fe) wykazują działanie toksyczne już w niewielkich dawkach [1, 2]. Związki te nie ulegają biodegradacji, przez co obserwuje się u nich zjawisko bioakumulacji i biomagnifikacji. O ile niektóre z metali ciężkich, w ściśle określonych dawkach, niezbędne są do prawidłowego funkcjonowania organizmów roślinnych i zwierzęcych, to już nadmierna ich koncentracja wywołuje efekt toksyczny. Obecność wspomnianych metali ciężkich w glebie bądź wodzie, która dostępna jest dla roślin prowadzi do ich kumulowania w organizmie rośliny, a następnie w organizmach roślinożerców, gdzie stężenie metali ciężkich może osiągnąć jeszcze wyższe koncentracje [3]. Prezentowany wynalazek pozwoli na selekcję odmian roślin pod kątem tolerancji na stres cynku i kadmu, przez co możliwe będzie wykorzystanie w hodowli takich form, które nie będą akumulowały w swoich tkankach metali ciężkich.

Spośród metali ciężkich jedne z najwyższych wskaźników akumulacji w organizmach roślinnych wykazują Cd, Zn oraz Pb [4], a w Polsce największe zagrożenie skażeniem występuje w przypadku Cd i Pb. Wpływ tych metali ciężkich na wzrost między innymi jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare*) było już badane przez zespoły badaczy [5]. W ramach prowadzonych badań, które dostarczyły wyników dla prezentowanego zgłoszenia patentowego prowadzono hodowlę hydroponiczną roślin jęczmienia z dodatkiem cynku i kadmu. Do badań wykorzystano dwa genotypy jęczmienia, Sebastian oraz mutantu hvd14.d [6], które wykazały zróżnicowaną odpowiedź na traktowanie metalem ciężkim. Odmiana Sebastian była bardziej tolerancyjna na badaną dawkę cynku i kadmu niż mutant hvd14.d, co zostało potwierdzone przez słabsze zahamowanie wzrostu oraz słabsze uszkodzenie aparatu fotosyntetycznego w odmianie Sebastian w porównaniu do mutantu. Analizy poziomu ekspresji genów w liściach i korzeniach obu form pozwoliły na wytypowanie genów zaangażowanych w odpowiedź jęczmienia na traktowanie cynkiem oraz kadmem, i wskazanie tych, które mogą różnicować genotypy jęczmienia tolerancyjne i wrażliwe na cynk i kadm.

Wyróżnić można dwa główne nurty badań związanych z wpływem cynku i kadmu na rozwój i wzrost roślin, związane z 1) niedoborem bądź 2) ekspozycją na toksyczne dawki tego pierwiastka. Między innymi wykazano, że cynk w koncentracji 1, 5 oraz 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ działa hamująco na wzrost jęczmienia, podczas gdy koncentracja 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ pobudza wzrost siewek jęczmienia. Dodatkowo autorzy badania wskazują, że zastosowanie kwasu askorbinowego może zniwelować negatywny wpływ wyższych koncentracji cynku na wzrost jęczmienia [9]. Z kolei w innym badaniu wykazano, że każda z zastosowanych dawek cynku (10, 50, 250, 1250, 6250 $\mu\text{g/g}$ suchej gleby) hamuje rozwój części nadziemnej i podziemnej jęczmienia, a efekt ten jest zależny od podanej dawki cynku [10]. W literaturze brakuje informacji odnośnie odpowiedzi globalnego transkryptomu na wyższe, toksyczne, dawki cynku. Znaleźć natomiast można opracowania dotyczące ekspresji wybranych genów na niedobór tego pierwiastka [11], czy ekspresję wybranych genów w sytuacji, gdy badano antagonistyczne działanie cynku i żelaza na jęczmień [12, 13].

Z dotychczasowego stanu techniki znane jest rozwiązanie dotyczące podniesienia tolerancji przedstawiciela zbóż (kukurydzy) na toksyczne dawki cynku. W opisie patentowym CN104212815A autorzy ujawniają gen *ZmITR1* kodujący transporter regulowany cynkowo-żelazowo, który może pełnić ważną funkcję przy pobieraniu cynku z podłoża u kukurydzy. Niemniej należy podkreślić, że liczne zgłoszenia patentowe dotyczą innego z metali ciężkich – kadmu. Na przykład w opisie patentowym CN102085527A autorzy opisują możliwość wykorzystania roślin z gatunku *Lantana pospolita* (*Lantana camara*), do usuwania kadmu z podłoża. Rośliny te są hiperakumulatorami kadmu i nawet w podłożu skażonym dawką 50 mg/kg są w stanie rozwijać się w prawidłowy sposób. Podczas wzrostu pobierają kadm za pomocą systemu korzeniowego i transportują go do części nadziemnej. Stąd koncentracja kadmu w glebie ulega obniżeniu.

Zgłoszenie EP12191891 opisuje możliwość obniżenia ekspresji genów kodujących transportery z rodziny ATPazę typu P, które zaangażowane są między innymi w transport kadmu. Dzięki temu możliwe jest ograniczenie transportu tego metalu do części nadziemnej rośliny co ogranicza jego akumulację w tkankach rośliny.

Autorzy zgłoszenia CN109880829A wskazują, że wprowadzenie dodatkowej kopii genu HvPAA1 (kodującego ATPazę typu P) pod kontrolą konstytutywnego promotora zwiększa tolerancję roślin jęczmienia na traktowanie kadmem. Podobny efekt, według zgłoszenia o numerze CN113584047A, można osiągnąć wykorzystując inżynierię genetyczną w celu wprowadzenia dodatkowej kopii genu HvNAT2, kodującego transporter nukleozasady-kwasu askorbinowego.

Z kolei zgłoszenie o numerze CN107326032A prezentuje gen MNB1 kodujący lektynę wiążącą mannozę 1, którego nadekspresja może zwiększać tolerancję roślin *Arabidopsis thaliana* na obecność kadmu w podłożu.

Pośród zgłoszeń patentowych dotyczących wpływu metali ciężkich na rośliny oraz selekcji form odpornych na metale ciężkie nie znaleziono takich, które opierałyby się o informacje odnośnie poziomu ekspresji genów jęczmienia.

Celem twórców niniejszego wynalazku było opracowanie sekwencji starterów pozwalających na analizę poziomu ekspresji w liściach i korzeniach jęczmienia, dwóch genów kodujących beta-fruktofuranozydazę oraz 4,5-dioksygenazę. Dzięki wykorzystaniu tych starterów możliwa jest analiza odpowiedzi roślin na stres przez pryzmat różnych mechanizmów związanych z odpowiedzią w liściach i korzeniach rośliny jęczmienia na traktowanie cynkiem i kadmem. Kolejnym celem twórców było opracowanie sposobu identyfikacji genotypów jęczmienia o podwyższonej tolerancji na cynk i kadm, w którym kluczowym etapem jest analiza poziomu ekspresji genów w liściach i korzeniach jęczmienia bazująca na ww. sekwencjach starterów.

Istotę wynalazku stanowią sekwencje starterów pozwalające na analizę poziomu ekspresji genów jęczmienia HORVU.MOREX.r2.5HG0446210, HORVU.MOREX.r2.6HG0449830, których ekspresja w liściach i korzeniach wskazuje na podwyższoną tolerancję na cynk i kadm, przedstawione w wykazie sekwencji:

- a. dla genu HORVU.MOREX.r2.5HG0446210 – sekwencje nukleotydowe 1 i 2,
- b. dla genu HORVU.MOREX.r2.6HG0449830 – sekwencje nukleotydowe 3 i 4.

Ponadto istotę wynalazku stanowi sposób identyfikacji genotypów jęczmienia o podwyższonej tolerancji na cynk i kadm, pozwalający na selekcję odmian jęczmienia o zwiększonej tolerancji na cynk i kadm, obejmujący następujące etapy:

- a. prowadzi się wzrost siewek jęczmienia w warunkach hydroponiki przez czas co najmniej 15 dni, korzystnie 24 dni, przy czym jedną grupę stanowią siewki kontrolne, których wzrost prowadzi się w warunkach zapewniających brak kontaktu roślin z cynkiem i kadmem, natomiast drugą grupę stanowią siewki badane pod kątem ich tolerancji na cynk i kadm, których wzrost przez co najmniej 10 dni, korzystnie 14 dni, prowadzi się w takich samych warunkach jak siewki kontrolne, po czym na czas co najmniej 5 dni, korzystnie 10 dni, poddaje się je stresowi przez dodanie od 35 μM do 75 μM cynku, korzystnie 50 μM cynku oraz 3 μM do 10 μM kadmu, korzystnie 5 μM kadmu,
- b. izoluje się RNA z liści i korzeni jęczmienia roślin kontrolnych oraz roślin badanych,
- c. przeprowadza się syntezę cDNA,
- d. analizuje się poziom ekspresji genów HORVU.MOREX.r2.5HG0446210, HORVU.MOREX.r2.6HG0449830 metodą qPCR u roślin kontrolnych i badanych,

charakteryzujący się tym, że do analizy poziomu ekspresji genów stosuje się sekwencje starterów przedstawione w wykazie sekwencji:

- i. dla genu HORVU.MOREX.r2.5HG0446210 – sekwencje nukleotydowe 1 i 2,
- ii. dla genu HORVU.MOREX.r2.6HG0449830 – sekwencje nukleotydowe 3 i 4,
- e. oblicza się relatywny poziom ekspresji genów HORVU.MOREX.r2.5HG0446210, HORVU.MOREX.r2.6HG0449830 w oparciu o poziomy ekspresji genów referencyjnych, przy czym poziomy ekspresji genów porównuje się pomiędzy roślinami kontrolnymi oraz roślinami badanymi traktowanymi cynkiem i kadmem,
- f. identyfikuje się genotypy jęczmienia wykazujące wyższy w porównaniu do genotypów analogicznych hodowanych w warunkach kontrolnych, poziom ekspresji genów HORVU.MOREX.r2.5HG0446210, HORVU.MOREX.r2.6HG0449830 wskazujący na podwyższoną tolerancję na cynk i kadm.

Korzystnie, jako rośliny kontrolne stosuje się tę samą odmianę jęczmienia co rośliny badane pod kątem tolerancji na cynk i kadm.

Korzystnie jako geny referencyjne stosuje się geny: EF1 (Elongation factor 1- α) i/lub GPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) [7].

Korzystnie, wzrost roślin kontrolnych jęczmienia w hodowli hydroponicznej odbywa się w pożywce Hoaglanda.

Korzystnie, wzrost roślin jęczmienia prowadzi się w następujących warunkach: temperatura powietrza od 18 do 22°C, najkorzystniej 20°C, fotoperiod od 14/10 do 20/4, najkorzystniej 16/8, intensywność świetlna od 750 do 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, najkorzystniej 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Proponowane rozwiązanie techniczne dotyczące analizy poziomów ekspresji dwóch genów w liściach i korzeniach jęczmienia (HORVU.MOREX.r2.5HG0446210, HORVU.MOREX.r2.6HG0449830) jest metodą pozwalającą na selekcję odmian jęczmienia tolerancyjnych na kontakt z cynkiem i kadmem. Poprzez analizę profili ekspresji z użyciem przedstawionych starterów możliwe jest porównanie genotypów jęczmienia między sobą i wybranie tych, które będą lepiej adaptowały się do traktowania cynkiem i kadmem.

Przedmiot wynalazku przedstawiony został w przykładach wykonania oraz na rysunku, na którym: fig. 1 przedstawia wynik analizy poziomów ekspresji genów u dwóch genotypów po traktowaniu cynkiem i kadmem. Odmiana wyjściowa Sebastian jest tolerancyjna na cynk i kadm, w porównaniu do mutantu hvd14.d, który jest nadwrażliwy na cynk i kadm. Ekspresja genów badana była przez porównanie każdego z genotypów, który rósł w warunkach kontrolnych do roślin traktowanych cynkiem (10-dniowe traktowanie dawką 50 μM cynku oraz 5 μM kadmu). Analizę poziomu ekspresji prowadzono metodą qPCR, a na fig. 1 zobrazowano względny poziom ekspresji wspomnianych genów, w liściach i korzeniach badanych roślin, po traktowaniu cynkiem i kadmem w odniesieniu do warunków kontrolnych, dla których poziom ekspresji przyjęto jako wartość 1. Przykłady wykonania, nie mają charakteru ograniczającego.

Dzięki zastosowaniu rozwiązań przedstawionych w zgłoszeniu możliwe jest przeprowadzenie selekcji genotypów jęczmienia pod kątem tolerancji na obecność cynku i kadmu, a wykorzystanie ich w programach hodowlanych może pozwolić na otrzymanie odmian, które mogą być uprawiane na skażonych glebach.

Przykład 1.

Sekwencje starterów według wynalazku oraz analiza poziomu ekspresji genów HORVU.MOREX.r2.5HG0446210, HORVU.MOREX.r2.6HG0449830 z wykorzystaniem tych sekwencji starterów.

RNA wyizolowano z liści i korzeni 24-dniowych roślin jęczmienia, które rosły w warunkach kontrolnych (hodowla hydroponiczna w pożywce Hoaglanda, temperatura powietrza 20°C; fotoperiod 16/8; intensywność światła 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) oraz tych traktowanych cynkiem i kadmem (przez pierwsze 14 dni hodowla prowadzona jak dla roślin kontrolnych, przez kolejne 10 dni dodano do pożywki 50 μM cynku oraz 5 μM kadmu), z użyciem mirVana™ miRNA Isolation Kit (ThermoScientific, Waltham, MA, USA, numer katalogowy AM1560). Do syntezy cDNA użyto zestawu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, Waltham, MA, USA, numer katalogowy K1622) oraz 1 μg RNA. Otrzymane cDNA rozcieńczono 4-krotnie wodą oraz wykorzystano w reakcji qPCR, którą przeprowadzono z użyciem zestawu LightCycler 480 SYBR Green I Master (LifeScience Roche, Indianapolis, IN, USA, numer katalogowy 04707516001) dla każdej z par starterów:

- a) dla genu HORVU.MOREX.r2.5HG0446210:
 - sekwencja nukleotydowa 1,
 - sekwencja nukleotydowa 2,
- b) dla genu HORVU.MOREX.r2.6HG0449830:
 - sekwencja nukleotydowa 3,
 - sekwencja nukleotydowa 4.

Jako geny referencyjne w tej reakcji wykorzystano EF1 (Elongation factor 1- α) oraz GPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) [7]. W odpowiedzi na traktowanie cynkiem i kadmem zaobserwowano wzrost poziomów ekspresji badanych genów.

Przykład 2.

Sposób identyfikacji genotypów jęczmienia o podwyższonej tolerancji na cynk i kadm w oparciu o analizę poziomów ekspresji genów HORVU.MOREX.r2.5HG0446210, HORVU.MOREX.r2.6HG0449830 w liściach i korzeniach jęczmienia obejmujący następujące etapy:

1. prowadzi się wzrost siewek kontrolnych jęczmienia przez 24 dni w warunkach kontrolnych (temperatura powietrza 20°C; fotoperiod 16/8; intensywność światła 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na pożywce Hoaglanda [8], natomiast wzrost roślin mających kontakt z cynkiem i kadmem prowadzi się przez 14 dni w tych samych warunkach kontrolnych, po czym dodaje się do pożywki 50 μM cynku oraz 5 μM kadmu na 10 kolejnych dni,
2. izoluje się RNA z liści i korzeni jęczmienia, przy czym ten etap przeprowadza się z użyciem mirVana™ miRNA Isolation Kit (ThermoScientific, Waltham, MA, USA, numer katalogowy AM1560) lub MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit (ThermoScientific, Waltham, MA, USA, numer katalogowy AM1830) pozwalający na otrzymanie czystego chemicznie ekstraktu RNA przy zachowaniu jego integralności,
3. prowadzi się syntezę jednoniciowego cDNA, z użyciem zestawu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, Waltham, MA, USA, numer katalogowy K1622) lub równoważnego oraz 1 μg RNA,
4. analizuje się poziom ekspresji genów u roślin kontrolnych oraz badanych, prowadząc reakcje qPCR z użyciem otrzymanego cDNA (rozcieńczonego 4-krotnie wodą), starterów specyficznych dla genów HORVU.MOREX.r2.5HG0446210, HORVU.MOREX.r2.6HG0449830 oraz zestawu LightCycler 480 SYBR Green I Master (LifeScience Roche, Indianapolis, IN, USA, numer katalogowy 04707516001) lub równoważnego pozwalającego na analizę amplifikacji DNA w czasie rzeczywistym, przy czym do analizy poziomu ekspresji genów stosuje się sekwencje starterów przedstawione w wykazie sekwencji:
 - a) dla genu HORVU.MOREX.r2.5HG0446210:
 - sekwencja nukleotydowa 1,
 - sekwencja nukleotydowa 2,
 - b) dla genu HORVU.MOREX.r2.6HG0449830:
 - sekwencja nukleotydowa 3,
 - sekwencja nukleotydowa 4.
5. prowadzi się reakcję qPCR z użyciem starterów genów referencyjnych EF1 (Elongation factor 1- α) oraz GPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) [7] dla każdej próby cDNA,
6. bazując na kinetyce reakcji amplifikacji każdego z genów HORVU.MOREX.r2.5HG0446210, HORVU.MOREX.r2.6HG0449830 oraz genów referencyjnych oblicza się względny poziom ekspresji badanych genów; poziomy ekspresji genów porównuje się pomiędzy roślinami rosnącymi w warunkach kontrolnych oraz roślinami narażonymi na 10-dniowy stres traktowania cynkiem i kadmem, dla każdego z genotypów,
7. identyfikuje się genotypy jęczmienia o podwyższonej tolerancji na cynk i kadm, na podstawie podwyższonego poziomu ekspresji genów HORVU.MOREX.r2.5HG0446210, HORVU.MOREX.r2.6HG0449830; dla każdego z genotypów porównuje się poziom ekspresji każdego z badanych genów pomiędzy kontrolą a roślinami traktowanymi cynkiem i kadmem; im wyższa ekspresja genów u roślin stresowanych tym wyższą tolerancję na cynk i kadm wykazuje roślina.

Przedstawiona procedura powinna być przeprowadzona dla wszystkich analizowanych genotypów, a wartością użytą do porównania ich tolerancji na cynk i kadm jest krotność wzrostu ekspresji u roślin stresowanych. Rośliny o najwyższych wskaźnikach są najbardziej tolerancyjne.

Otrzymane wyniki porównuje się pomiędzy dwiema bądź większą liczbą odmian. Im wyższy poziom ekspresji tym większa tolerancja na cynk i kadm. Wynik porównania dwóch odmian o zróżnicowanej tolerancji na cynk i kadm przedstawiono na fig. 1 rysunku.

U 24-dniowych roślin jęczmienia, tolerancyjnych na cynk i kadm, które zostały potraktowane cynkiem (dawka od 35 do 75 μM , najkorzystniej 50 μM ; traktowanie od 5 do 15 dni, najkorzystniej 10) oraz kadmem (dawka od 3 do 10 μM , najkorzystniej 5 μM ; traktowanie od 5 do 15 dni, najkorzystniej 10), w porównaniu do roślin rosnących w warunkach kontrolnych (temperatura powietrza od 18 do 22°C, najkorzystniej 20°C; fotoperiod od 14/10 do 20/4, najkorzystniej 16/8; intensywność światła od 100 do 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, najkorzystniej 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), wykazano podwyższoną ekspresję wspomnianych genów. Ekspresja genów HORVU.MOREX.r2.5HG0446210, HORVU.MOREX.r2.6HG0449830, nie ulegała zmianie w takich samych warunkach traktowania u roślin jęczmienia wrażliwych na cynk i kadm. Stąd rośliny wykazujące podwyższoną ekspresję wymienionych genów w odpowiedzi na traktowanie cynkiem i kadmem zaliczone mogą być do genotypów tolerancyjnych na cynk i kadm.

Literatura:

- [1] Hawkes J.S. 1997. What is a heavy metal? J. Chem. Educat. 74. 1374–1378.
- [2] Duruibe J.O., Ogwuegbu M.O.C., Egwurugwu J.N. 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. Int. J. Phys. Sci. 2. 112–118.
- [3] Asati, A., Pichhode, M., & Nikhil, K. 2016. Effect of heavy metals on plants: an overview. IJAEM, 5(3), 56–66.
- [4] Kabata-Pendias A., Piotrowska M. 1984. Zanieczyszczenia gleb i roślin uprawnych pierwiastkami śladowymi. Wyd. CBR Warszawa, 1–28.
- [5] Nowakowski, W. Podgórski, M. 1989. Tolerancja siewek jęczmienia jarego na Cd i Pb w warunkach kwaśnego odczynu. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 380.
- [6] Marzec, M., Gruszka, D., Tylec, P., Szarejko, I. 2016. Identification and functional analysis of the HvD14 gene involved in strigolactone signaling in *Hordeum vulgare*. Physiologia Plantarum, 158(3), 341–355.
- [7] Rapacz, M., Stępień, A., & Skorupa, K. (2012). Internal standards for quantitative RT-PCR studies of gene expression under drought treatment in barley (*Hordeum vulgare* L.): the effects of developmental stage and leaf age. Acta Physiologiae Plantarum, 34(5), 1723–1733.
- [8] Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California agricultural experiment station, 347(2nd edit).
- [9] Wu, F., Zhang, G. (2002). Alleviation of cadmium-toxicity by application of zinc and ascorbic acid in barley. Journal of Plant Nutrition, 25(12), 2745–2761.
- [10] Aery, N. C., Jagetiya, B. L. (1997). Relative toxicity of cadmium, lead, and zinc on barley. Communications in soil science and plant analysis, 28(11–12), 949–960.
- [11] Huang, C., Barker, S. J., Langridge, P., Smith, F. W., & Graham, R. D. (2000). Zinc deficiency up-regulates expression of high-affinity phosphate transporter genes in both phosphate-sufficient and-deficient barley roots. Plant Physiology, 124(1), 415–422.
- [12] Hodoshima, H., Enomoto, Y., Shoji, K., Shimada, H., Goto, F., & Yoshihara, T. (2007). Differential regulation of cadmium-inducible expression of iron-deficiency-responsive genes in tobacco and barley. Physiologia Plantarum, 129(3), 622–634.
- [13] Sharma, S. S., Kaul, S., Metwally, A., Goyal, K. C., Finkemeier, I., Dietz, K. J. (2004). Cadmium toxicity to barley (*Hordeum vulgare*) as affected by varying Fe nutritional status. Plant science, 166(5), 1287–1295.

Wykaz sekwencji starterów

Sekwencja nukleotydowa 1 startera: 5' TCACGGCCAGAGTTTATCCG 3'

Sekwencja nukleotydowa 2 startera: 5' CCTTAGTTGCGGCACTCTGA 3'

Sekwencja nukleotydowa 3 startera: 5' TCCTTTCCTTGACGATGGGC 3'

Sekwencja nukleotydowa 4 startera: 5' TCCCACGACTTGAGGAAGTG 3'

Zastrzeżenia patentowe

1. Sekwencje starterów pozwalające na analizę poziomów ekspresji genów jęczmienia, których ekspresja w liściach i korzeniach wskazuje na podwyższoną tolerancję na cynk i kadm, przedstawione w wykazie sekwencji:
 - a) dla genu HORVU.MOREX.r2.5HG0446210 – sekwencje nukleotydowe 1 i 2,
 - b) dla genu HORVU.MOREX.r2.6HG0449830 – sekwencje nukleotydowe 3 i 4.
2. Sposób identyfikacji genotypów jęczmienia o podwyższonej tolerancji na cynk i kadm, obejmujący następujące etapy:
 - a. prowadzi się wzrost siewek jęczmienia w warunkach hydroponiki przez czas co najmniej 15 dni, korzystnie 24 dni, przy czym jedną grupę stanowią siewki kontrolne, których wzrost

proceedzi się w warunkach zapewniających brak kontaktu roślin z cynkiem i kadmem, natomiast drugą grupę stanowią siewki badane pod kątem ich tolerancji na cynk i kadm, których wzrost przez co najmniej 10 dni, korzystnie 14 dni, prowadzi się w takich samych warunkach jak siewki kontrolne, po czym na czas co najmniej 5 dni, korzystnie 10 dni, poddaje się je stresowi przez dodanie od 35 μM do 75 μM cynku, korzystnie 50 μM cynku oraz od 3 μM do 10 μM kadmu, korzystnie 5 μM kadmu,

- b. izoluje się RNA z liści i korzeni jęczmienia roślin kontrolnych oraz roślin badanych,
- c. przeprowadza się syntezę cDNA,
- d. analizuje się poziom ekspresji genów HORVU.MOREX.r2.5HG0446210, HORVU.MOREX.r2.6HG0449830 metodą qPCR, u roślin kontrolnych i badanych,

znamienny tym, że do analizy poziomu ekspresji genów stosuje się sekwencje starterów przedstawione w wykazie sekwencji:

- i. dla genu HORVU.MOREX.r2.5HG0446210 – sekwencje nukleotydowe 1 i 2,
 - ii. dla genu HORVU.MOREX.r2.6HG0449830 – sekwencje nukleotydowe 3 i 4,
- e. oblicza się relatywny poziom ekspresji genów HORVU.MOREX.r2.5HG0446210, HORVU.MOREX.r2.6HG0449830, w oparciu o poziomy ekspresji genów referencyjnych, przy czym poziomy ekspresji genów porównuje się pomiędzy roślinami kontrolnymi oraz roślinami badanymi,
 - f. identyfikuje się genotypy jęczmienia wykazujące wyższy w porównaniu do genotypów analogicznych hodowanych w warunkach kontrolnych, poziom ekspresji genów HORVU.MOREX.r2.5HG0446210, HORVU.MOREX.r2.6HG0449830 wskazujący na podwyższoną tolerancję na cynk i kadm.
3. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że jako rośliny kontrolne stosuje się tę samą odmianę jęczmienia co rośliny badane pod kątem tolerancji na cynk i kadm.
 4. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że jako geny referencyjne stosuje się geny: EF1 (Elongation factor 1- α) i/lub GPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).
 5. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że wzrost roślin kontrolnych jęczmienia w hodowli hydroponicznej odbywa się w pożywce Hoaglanda.
 6. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że wzrost roślin jęczmienia prowadzi się w następujących warunkach: temperatura powietrza od 18 do 22°C, najkorzystniej 20°C, fotoperiod od 14/10 do 20/4, najkorzystniej 16/8, intensywność świetlna od 750 do 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, najkorzystniej 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Rysunek

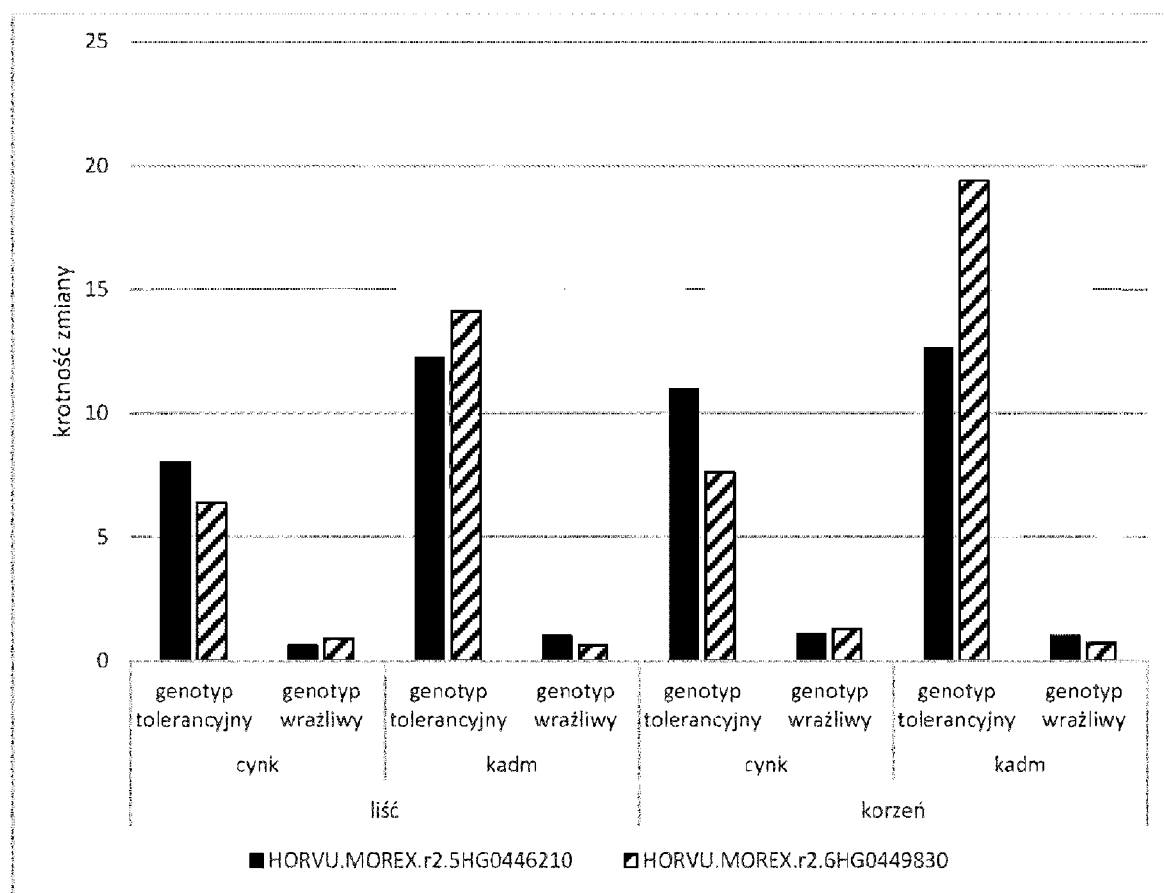


Fig. 1