(19) URZĄD PATENTOWY RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

(10) **PL 245913 B1**

(12) # Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **442124**
(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 jęczmienia, który miał kontakt z cynkiem

PL 245913 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są sekwencje starterów pozwalające na analizę poziomu ekspresji genów w liściach i korzeniach jęczmienia oraz sposób identyfikacji jęczmienia, który miał kontakt z cynkiem, w oparciu o analizę poziomów ekspresji tych genów. Bardziej szczegółowo zgłoszenie dotyczy starterów do identyfikacji genów o identyfikatorach HORVU.MOREX.r2.5HG0411410, HORVU.MOREX.r2.7HG0528920 kodujących odpowiednio białko zawierające domenę żelaza i siarki oraz poligalakturonazę. 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 może osiągnąć jeszcze wyższe koncentracje [3]. Rozwiązania stanowiące istotę niniejszego wynalazku umożliwiają wskazanie czy dana roślina miała kontakt z metalem ciężkim i jej ewentualne wykluczenie z dalszych procesów przetwórczych.

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) był już badany przez zespoły badaczy [5]. W ramach badań prowadzących do opracowania niniejszego wynalazku prowadzono hodowlę hydroponiczną roślin jęczmienia z dodatkiem cynku. Do badań wykorzystano dwa genotypy jęczmienia, odmianę wyjściową Sebastian oraz wyprowadzonego z niej mutanta hvd14.d [6], które wykazały zróżnicowaną odpowiedź na traktowanie metalem ciężkim. Odmiana Sebastian była bardziej tolerancyjna na badaną dawkę cynku niż mutant hvd14.d, co zostało potwierdzone przez słabsze zahamowanie wzrostu oraz słabsze uszkodzenie aparatu fotosyntetycznego u odmiany Sebastian w porównaniu do mutanta. Analizy poziomu ekspresji genów w liściach i korzeniach obu form pozwoliły na wytypowanie genów zaangażowanych w odpowiedź jęczmienia na traktowanie cynkiem, i wskazanie tych, które ulegają zwiększonej ekspresji zarówno u genotypów wrażliwych, jak i tolerancyjnych na cynk.

Wyróżnić można dwa główne nurty badań związanych z wpływem cynku 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 µmol L^{-1} działa hamująco na wzrost jęczmienia, podczas gdy koncentracja 0,1 µmol 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 µg/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. W zgłoszeniu 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 wstanie 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 ATPaz 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 aku-

mulację 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 do roślin jęczmienia, 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.

Warto podkreślić, że pośród zgłoszeń patentowych dotyczących wpływu metali ciężkich na rośliny 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 genów w liściach i korzeniach jęczmienia.

Kolejnym celem twórców było opracowanie sposobu identyfikacji jęczmienia mającego wcześniejszy kontakt z cynkiem bazujący na analizie profili ekspresji z użyciem przedstawionych starterów i porównaniu ich poziomu ekspresji z tym dla roślin kontrolnych a w efekcie wskazanie czy badane próbki miały wcześniejszy kontakt z cynkiem.

Istotę wynalazku stanowią sekwencje starterów pozwalające na analizę poziomu ekspresji genów jęczmienia, których ekspresja w liściach i korzeniach wskazuje na wcześniejszy kontakt jęczmienia z cynkiem, przedstawione w wykazie sekwencji:

a) dla genu HORVU.MOREX.r2.5HG0411410 – sekwencje nukleotydowe 1 i 2,
b) dla genu HORVU.MOREX.r2.7HG0528920 – sekwencje nukleotydowe 3 i 4.

Ponadto istotę wynalazku stanowi sposób identyfikacji jęczmienia mającego wcześniejszy kontakt z cynkiem, obejmujący następujące etapy:

a. prowadzi się wzrost roślin kontrolnych jęczmienia w hodowli hydroponicznej, w warunkach zapewniających brak kontaktu roślin z cynkiem, przez czas co najmniej 15 dni, korzystnie 24 dni,
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.r2.5HG0411410, HORVU.MOREX.r2.7HG0528920 metodą qPCR, u roślin kontrolnych oraz badanych,

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

i. dla genu HORVU.MOREX.r2.5HG0411410 – sekwencje nukleotydowe 1 i 2,
ii. dla genu HORVU.MOREX.r2.7HG0528920 – sekwencje nukleotydowe 3 i 4,

e. oblicza się relatywny poziom ekspresji genów HORVU.MOREX.r2.5HG0411410, HORVEI.MOREX.r2.7HG0528920, w oparciu o poziomy ekspresji genów referencyjnych, przy czym poziomy ekspresji genów porównuje się pomiędzy roślinami kontrolnymi oraz badanymi,

f. identyfikuje się jęczmień, który miał kontakt z cynkiem, wykazujący wyższy w porównaniu do roślin, tego samego genotypu, hodowanych w warunkach kontrolnych, poziom ekspresji genów HORVEI.MOREX.r2.5HG0411410, HORVU.MOREX.r2.7HG0528920.

Korzystnie, jako rośliny kontrolne stosuje się tą samą odmianę jęczmienia co rośliny badane pod kątem kontaktu z cynkiem. Korzystnie, aby rośliny badane, były w zbliżonym wieku do roślin kontrolnych.

Korzystnie, jako geny referencyjne stosuje się geny: EF1 (Elongation factor 1-α) i/lub GPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) [8].

Korzystnie, wzrost roślin kontrolnych jęczmienia w hodowli hydroponicznej odbywa się w pożywce Hoaglanda [7].

Korzystnie, wzrost roślin kontrolnych 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 światła od 750 do 1000 µmol m^{-2} s^{-1}, najkorzystniej 900 µmol m^{-2} s^{-1}.

Przedmiot wynalazku przedstawiony został w przykładach wykonania oraz na rysunku, na którym: fig. 1 przedstawia wynik analizy poziomów ekspresji genów u dwóch genotypów jęczmienia po traktowaniu cynkiem (50 µM). Odmiana wyjściowa Sebastian jest tolerancyjna na cynk, w porównaniu do mutanta hvd14.d, który jest nadwrażliwy na cynk. 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). 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 w odniesieniu do warunków kontrolnych, dla których poziom ekspresji przyjęto jako wartość 1. Przykłady realizacji nie mają charakteru ograniczającego.

Dzięki zastosowaniu rozwiązań według niniejszego wynalazku możliwe jest przeprowadzenie selekcji materiału roślinnego pod kątem wcześniejszego kontaktu z toksycznymi dawkami cynku i wykluczenie takich produktów roślinnych z dalszych etapów przetwórczych związanych z przygotowaniem żywności.

Przykład 1

Sekwencje starterów według wynalazku oraz analiza poziomu ekspresji genów jęczmienia HORVU.MOREX.r2.5HG0411410, HORVU.MOREX.r2.7HG0528920.

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 µmol m^{-2} s^{-1}) oraz tych traktowanych cynkiem (przez pierwsze 14 dni hodowla prowadzona jak dla roślin kontrolnych, przez kolejne 10 dni dodano do pożywki 50 µM cynku), 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.r2.5HG0411410:
   - sekwencja nukleotydowa 1
   - sekwencja nukleotydowa 2
b) dla genu HORVU.MOREX.r2.7HG0528920:
   - sekwencja nukleotydowa 3
   - sekwencja nukleotydowa 4

Jako geny referencyjne w tej reakcji wykorzystano EF1 (Elongation factor 1-α) oraz GPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) [8]. U roślin traktowanych cynkiem zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji badanych genów.

Przykład 2

Sposób identyfikacji jęczmienia mającego wcześniejszy kontakt z cynkiem w oparciu o analizę poziomów ekspresji genów HORVU.MOREX.r2.5HG0411410, HORVU.MOREX.r2.7HG0528920 w liściach i korzeniach obejmujący następujące etapy:

a. prowadzi się wzrost siewek kontrolnych jęczmienia przez 24 dni w warunkach kontrolnych (temperatura powietrza 20°C; fotoperiod 16/8; intensywność światła 900 µmol m^{-2} s^{-1}) w pożywce Hoaglanda [7] w warunkach zapewniających brak kontaktu roślin kontrolnych z cynkiem, natomiast wzrost roślin badanych pod kątem wcześniejszego kontaktu z cynkiem prowadzi się przez 14 dni w takich samych warunkach kontrolnych, po czym dodaje się do pożywki 50 µM cynku na 10 kolejnych dni,
b. izoluje się RNA z liści i korzeni jęczmienia roślin kontrolnych oraz roślin badanych, 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), pozwalającym na otrzymanie czystego chemicznie ekstraktu RNA przy zachowaniu jego integralności,
c. 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,
d. 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.r2.5HG0411410, HORVU.MOREX.r2.7HG0528920 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.r2.5HG0411410:
      - sekwencja nukleotydowa 1
      - sekwencja nukleotydowa 2

b) dla genu HORVU.MOREX.r2.7HG0528920:
- sekwencja nukleotydowa 3
- sekwencja nukleotydowa 4

e. prowadzi się reakcję qPCR z użyciem starterów genów referencyjnych EF1 (Elongation factor 1-α) oraz GPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) [8] dla każdej próby cDNA,

f. bazując na kinetyce reakcji amplifikacji każdego z genów HORVU.MOREX.r2.5HG0411410, HORVU.MOREX.r2.7HG0528920 oraz genów referencyjnych oblicza się względny poziom ekspresji badanych genów; poziomy ekspresji genów porównuje się pomiędzy roślinami rosnącymi w warunkach kontrolnych oraz roślin badanych pod kątem wcześniejszego kontaktu z cynkiem, dla każdego z genotypów,

g. identyfikuje się jęczmień, który miał kontakt z cynkiem, wykazujący w liściach i korzeniach wyższy w porównaniu do roślin kontrolnych, poziom ekspresji genów HORVU.MOREX.r2.5HG0411410, HORVU.MOREX.r2.7HG0528920; dla każdego z genotypów porównuje się poziom ekspresji każdego z badanych genów pomiędzy rośliną kontrolną a rośliną badaną, a rośliny z podwyższonym poziomem ekspresji genów są roślinami, które miały wcześniej kontakt z cynkiem.

Przedstawiona procedura powinna być przeprowadzona dla wszystkich analizowanych genotypów, a wartością użytą do oceny wcześniejszego kontaktu z cynkiem jest krotność wzrostu ekspresji u roślin badanych. Rośliny o podwyższonych wskaźnikach miały wcześniejszy kontakt z cynkiem. Wynik porównania dla roślin rosnących bez kontaktu z cynkiem oraz tych mających kontakt z cynkiem przedstawiono na fig. 1 rysunku, przy czym dla roślin rosnących w warunkach kontrolnych poziom ekspresji każdego z genów wynosi 1.

U 24-dniowych roślin jęczmienia, nadwrażliwych i tolerancyjnych na cynk, które zostały potraktowane cynkiem (dawka od 35 do 75 µM, najkorzystniej 50 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 750 do 1000 µmol m^{-2} s^{-1}, najkorzystniej 900 µmol m^{-2} s^{-1}), wykazano podwyższony poziom ekspresji genów: HORVU.MOREX.r2.5HG0411410, HORVU.MOREX.r2.7HG0528920. Stąd podwyższony poziom ekspresji wspomnianych genów może być wykorzystany jako marker kontaktu roślin z cynkiem. Porównując ekspresję tych genów w liściach oraz korzeniach badanej rośliny i liściach oraz korzeniach roślin kontrolnych możliwe jest wskazanie, czy badana roślina miała kontakt z cynkiem. Rośliny wykazujące podwyższoną ekspresję wymienionych genów, w porównaniu do roślin kontrolnych mogły mieć kontakt z wysokimi dawkami cynku w glebie bądź wodzie, która była wykorzystana do ich podlewania.

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. IJAIEM, 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] Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California agricultural experiment station, 347(2nd edit).
[8] 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.
[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' TCGGGAACATTTCCACTGTGT 3'

Sekwencja nukleotydowa 2 startera: 5' AAGCAAGGGGCCCACATTAT 3'

Sekwencja nukleotydowa 3 startera: 5' GATGACCGGCGACTACAAGT 3'

Sekwencja nukleotydowa 4 startera: 5' AGCTGATGTTCTCCACGACG 3'

Zastrzeżenia patentowe

1. Sekwencje starterów pozwalające na analizę poziomów ekspresji genów jęczmienia, których ekspresja w liściach i korzeniach wskazuje na wcześniejszy kontakt jęczmienia z cynkiem, przedstawione w wykazie sekwencji:
   a) dla genu HORVU.MOREX.r2.5HG0411410 – sekwencje nukleotydowe 1 i 2,
   b) dla genu HORVU.MOREX.r2.7HG0528920 – sekwencje nukleotydowe 3 i 4.
2. Sposób identyfikacji jęczmienia mającego wcześniejszy kontakt z cynkiem, obejmujący następujące etapy:
   a. prowadzi się wzrost roślin kontrolnych jęczmienia w hodowli hydroponicznej, w warunkach zapewniających brak kontaktu roślin z cynkiem, przez czas co najmniej 15 dni, korzystnie 24 dni,
   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.r2.5HG0411410, HORVU.MOREX.r2.7HG0528920 metodą qPCR, u roślin kontrolnych oraz badanych,

   znamienny tym, że do analizy poziomu ekspresji genów stosuje się sekwencje starterów przedstawione w wykazie sekwencji:
      i. dla genu HORVU.MOREX.r2.5HG0411410 – sekwencje nukleotydowe 1 i 2,
      ii. dla genu HORVU.MOREX.r2.7HG0528920 – sekwencje nukleotydowe 3 i 4,

   e. oblicza się relatywny poziom ekspresji genów HORVU.MOREX.r2.5HG0411410, HORVU.MOREX.r2.7HG0528920 w oparciu o poziomy ekspresji genów referencyjnych, przy czym poziomy ekspresji genów porównuje się pomiędzy roślinami kontrolnymi oraz badanymi,
   f. identyfikuje się jęczmień, który miał kontakt z cynkiem, wykazujący w liściach i korzeniach wyższy w porównaniu do roślin, tego samego genotypu, hodowanych w warunkach kontrolnych, poziom ekspresji genów HORVU.MOREX.r2.5HG0411410, HORVU.MOREX.r2.7HG0528920.
3. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że jako rośliny kontrolne stosuje się tą samą odmianę jęczmienia co rośliny badane pod kątem kontaktu z cynkiem.
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 kontrolnych 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 światła od 750 do 1000 µmol m^{-2} s^{-1} , najkorzystniej 900 µmol m^{-2} s^{-1}.

Rysunek

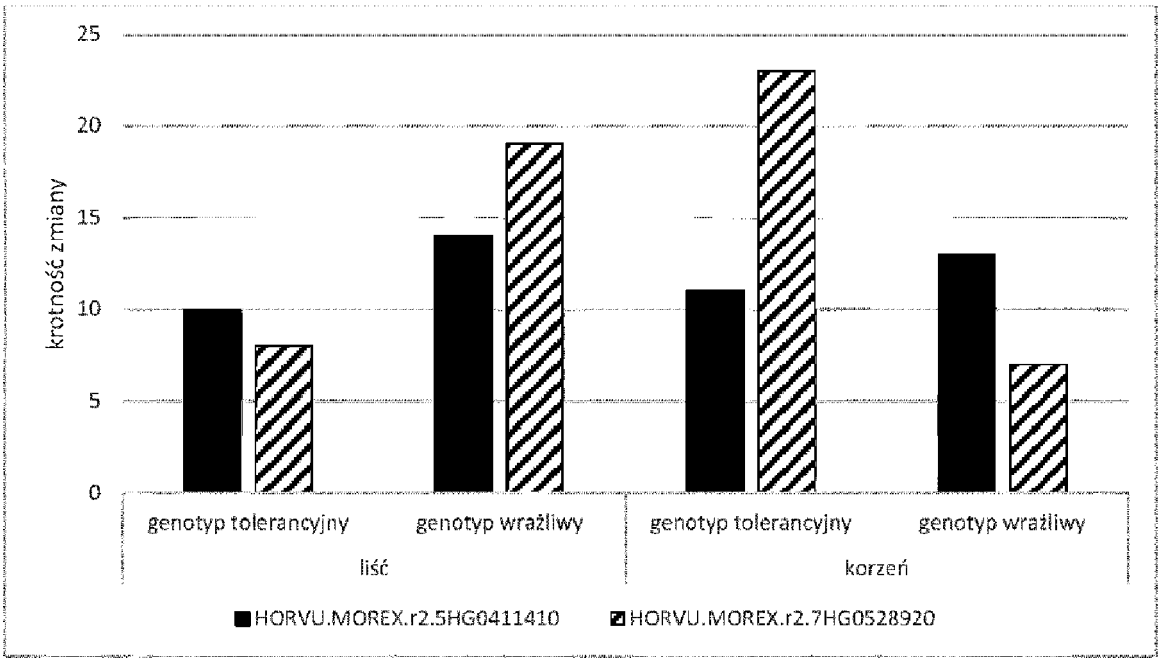

Fig. 1