

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242331 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437298**

(22) Data zgłoszenia: **2021.03.15**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.09.19 BUP 38/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.02.13 WUP 07/2023**

(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
AGATA DASZKOWSKA-GOLEC, Katowice, PL**

(74) Pełnomocnik:

Katarzyna Paprzycka, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sekwencje starterów do identyfikacji genów jęczmienia, sposób analizy ekspresji genów jęczmienia oraz sposób identyfikacji pozwalający na selekcję odmian jęczmienia o zwiększonej tolerancji na suszę

PL 242331 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są sekwencje starterów pozwalających na analizę ekspresji pięciu genów jęczmienia i sposób analizy ekspresji tych genów z użyciem wspomnianych starterów pozwalający na selekcję odmian jęczmienia pod kątem tolerancji na stres suszy. Bardziej szczegółowo ogłoszenie dotyczy starterów do identyfikacji genów identyfikatorach HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090, kodujących odpowiednio lipoksygenazę 1, dehydrynę 1, białko indukowane jasmonianami, reduktazę monodehydroaskorbinianową oraz dekarboksylazę argininy. Dla każdego z genów zaprojektowano startery pozwalające na określenie ich poziomu ekspresji z użyciem zaproponowanego systemu badania ekspresji genów.

Narastający problem suszy oraz straty w plonach, które są nim wywołane stanowią jedno z najważniejszych wyzwań stojących przed nowoczesnym rolnictwem. W Polsce 45% gleb kwalifikuje się jako optymalnie uwilgocone, natomiast około 38% jest okresowo lub trwale suchych i 17% jedynie okresowo mokrych. Zgodnie z raportami Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowego Instytutu Badawczego (IUNG-PIB 7/2019) susza rolnicza wystąpiła we wszystkich województwach naszego kraju, a w niektórych z nich (lubuskim, łódzkim, opolskim, wielkopolskim i zachodniopomorskim) zagrożonych suszą było 100% gmin. Susza została odnotowana dla wszystkich upraw, które są monitorowane przez IUNG-PIB. Najbardziej objęte suszą były uprawy kukurydzy na ziarno oraz na kiszonkę (68,31% wszystkich gmin). Następnie krzewy owocowe (65,68%), rośliny strączkowe (62,58%), zboża jare (60,44%) i ozime (53,05%) oraz warzywa gruntowe (50,59%). Wpłynęło to na zbiory i obserwuje się ich zauważalny spadek względem okresu 2013–2017. Głębokie susze powodują znaczne straty materialne. Susza w roku 1992 spowodowała wyraźny spadek plonów, problemy z zaopatrzeniem w wodę i duże straty środowiskowe. Podobnie było w przypadku dotkliwego niedoboru opadów od połowy czerwca do końca lipca 2006 r. Szacuje się, że wysoki wzrost temperatury powietrza spowoduje więcej niż dwukrotny wzrost ewapotranspiracji w okresie zimowym brak odbudowania retencji glebowej w tym okresie, natomiast niewielki wzrost opadów w okresie letnim, przy silnym wzroście ewapotranspiracji spowoduje wzrost potrzeb wodnych w rolnictwie (Ryszkowski i Kędziora 1993, Kędziora 1993). Dlatego też zagrożenie suszą wzrasta i będzie stanowiło coraz poważniejsze wyzwanie dla hodowców roślin uprawnych. Stąd od wielu już lat trwają intensywne prace nad poznaniem mechanizmów, które rośliny aktywują w odpowiedzi na stres suszy, a także wyprowadzaniem nowych odmian roślin uprawnych, które na ten stres mają być bardziej tolerancyjne. Poprzez analizę profili ekspresji genów i ich porównanie pomiędzy roślinami rosnącymi w warunkach optymalnych i w warunkach stresu możliwe jest poznanie molekularnych podstaw mechanizmów prowadzących od adaptacji roślin do zmieniających się warunków środowiska (Daszkowska i inni, 2019). Porównując profile ekspresji genów u dwóch genotypów jęczmienia: formy dzikiej Sebastian oraz mutantu hvd14.d, który jest nadwrażliwy na suszę (Marzec i inni, 2020), zidentyfikowano geny, których podwyższona ekspresja świadczy o lepszym przystosowaniu do stresu suszy. Informacje pochodzące z badań związanych ze zmianami ekspresji genów w odpowiedzi na stresy były wykorzystywane wcześniej w zgłoszeniach patentowych dotyczących różnych gatunków.

W zgłoszeniu patentowym AU2020103038 A4 autorzy opisują sekwencję białka, która może zostać wykorzystana do transformacji roślin, co powinno skutkować zwiększeniem ich tolerancji na stres suszy.

W amerykańskim zgłoszeniu patentowym US2020347394 A1 ujawniono roślinne czynniki transkrypcyjne i geny kodujące czynniki transkrypcyjne. Ujawniono również metody wzmacniania cech rośliny poprzez regulację w dół genów kodujących czynniki transkrypcyjne. Ulepszone właściwości mogą obejmować wyższe wskaźniki fotosyntezy, zmniejszone wskaźniki fotooddychania, wyższy plon lub zawartość biomasy, wyższy plon nasion, lepszy wskaźnik plonów, wyższą zawartość oleju, lepszy skład odżywczy, lepszą efektywność wykorzystania azotu, odporność na suszę, odporność na powódzie, odporność na choroby, szybciej kiełkowanie nasion i wschody roślin, zwiększona żywotność sadzonek, tolerancja na sól, wyższy współczynnik asymilacji CO₂ i niższy wskaźnik transpiracji. Ujawniono również zmodyfikowane rośliny, w których geny kodujące czynniki transkrypcyjne są obniżone. Kompozycje według wynalazku obejmują sekwencje polinukleotydowe, sekwencje polipeptydowe, warianty, ortologi i ich fragmenty. Metody obejmują wprowadzanie do roślin systemów zmniejszających lub eliminujących ekspresję czynników transkrypcyjnych.

Międzynarodowe zgłoszenie patentowe WO2020185849 A1 przedstawia sposób na zwiększenie ekspresji białka z rodziny kinaz MAPKK (mitogen activated protein kinase kinase), co prowadzi do poprawienia tolerancji na stres suszy u roślin i drzew.

Natomiast w zgłoszeniu CN111593058 A autorzy przedstawiają sposób na kontrolę ekspresji genów przez manipulację cząsteczkami miRNA, które regulują ekspresję innych genów, na przykładzie rzepaku (*Brassica napus*).

W polskim opisie patentowym PL233338 B1 ujawniono dwa geny jęczmienia kodujące dehydryny (HvDHN4 i HvDHN7) oraz dwa geny jęczmienia kodujące peroksydazy (HvPRX6 i HvPRX10), dla których opracowano sekwencje starterów dedykowanych do określania poziomu ekspresji tych genów. W/w opis dotyczy także sposobu analizy poziomu ekspresji genów HvDHN4, HvDHN7, HvPRX6 i HvPRX10 przy zastosowaniu opracowanych par starterów, sposobu identyfikacji odmian jęczmienia tolerancyjnych na suszę, na podstawie analiz poziomu ekspresji wymienionych genów, oraz zastosowanie wspomnianych genów do selekcji odmian tolerancyjnych na suszę.

Z polskiego opisu patentowego PL 233518 B1 znany jest sposób selekcji genotypów jęczmienia jarego tolerancyjnych względem suszy wiosennej, który polega na tym, że trzy polimorficzne fragmenty DNA sprzężone z rejonami chromosomowymi związanymi z tolerancją suszy amplifikowane są w reakcji PCR, przy czym wykorzystuje się do tego odpowiednie sekwencje starterów.

Polskie zgłoszenie patentowe P.412994 A1 dotyczy sekwencji starterów, sposobu identyfikacji ekspresji genu HvZIP1, sposobu identyfikacji odmian jęczmienia odpornych na warunki deficytu wodnego, zastosowania genu HvZIP1 oraz zestawu testowego do identyfikacji odmian jęczmienia o podwyższonej ekspresji genu HvZIP1. Wynalazek dotyczy dwóch opracowanych par starterów, sposobu identyfikacji ekspresji genu HvZIP1 przy zastosowaniu opracowanych par starterów, sposobu identyfikacji odmian jęczmienia odpornych na warunki deficytu wodnego przy użyciu sposobu wspomnianego powyżej, zastosowania genu HvZIP1 do selekcji odmian jęczmienia charakteryzujących się zwiększoną zdolnością adaptacyjną do warunków braku wody oraz zestawu testowego do identyfikacji odmian jęczmienia o podwyższonej ekspresji genu HvZIP1.

Celem wynalazku było opracowanie nowych sekwencji starterów pozwalających na analizę ekspresji pięciu genów kodujących białka z pięciu różnych rodzin białek: lipoksygenazę, dehydrynę, białko indukowane jasmonianami, reduktazę monodehydroaskorbinianową oraz dekarboksylazę argininy. Dzięki wykorzystaniu tych genów możliwa jest analiza odpowiedzi roślin na stres przez pryzmat różnych mechanizmów związanych z adaptacją rośliny do stresu suszy, stąd metoda ta wydaje się bardziej uniwersalna.

Proponowane rozwiązanie techniczne dotyczące analizy poziomów ekspresji pięciu genów jęczmienia (HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090) jest metodą pozwalającą na selekcję odmian jęczmienia tolerancyjnych na stres suszy. Poprzez analizę profili ekspresji z użyciem przedstawionych starterów możliwe jest porównanie odmian jęczmienia między sobą i wybranie tych, które będą lepiej adaptowały się do stresu suszy. Podstawa wynalazku to informacje o poziomie ekspresji pięciu genów jęczmienia (HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090), w odpowiedzi na stres suszy. Informacje te mogą być wykorzystane do oceny odmian jęczmienia pod kątem tolerancji na stres suszy.

Istotą wynalazku są sekwencje starterów do identyfikacji genów jęczmienia, specyficznych dla genów HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090 umożliwiające analizę poziomu ekspresji tych genów charakteryzujące się tym, że mają sekwencję nukleotydową:

- a. Dla genu HORVU5Hr1G093700
starter F – sekwencja nr 1
starter R – sekwencja nr 2
- b. Dla genu HORVU5Hr1G092120
starter F – sekwencja nr 3
starter R – sekwencja nr 4
- c. Dla genu HORVU4Hr1G087430
starter F – sekwencja nr 5
starter R – sekwencja nr 6
- d. Dla genu HORVU7Hr1G117880
starter F – sekwencja nr 7
starter R – sekwencja nr 8

- e. Dla genu HORVU1Hr1G002090
starter F – sekwencja nr 9
starter R – sekwencja nr 10

Drugim przedmiotem wynalazku jest sposób analizy poziomu ekspresji genów HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090 metodą qPCR, charakteryzujący się tym, że stosuje się sekwencje starterów opisane powyżej.

Istotę wynalazku stanowi również sposób identyfikacji pozwalający na selekcję odmian jęczmienia o zwiększonej tolerancji na suszę obejmujący następujące etapy:

- a. Prowadzi się wzrost siewek jęczmienia, przy czym dla siewek kontrolnych prowadzi się wzrost w warunkach optymalnego nawodnienia, natomiast siewki narażone na stres suszy wzrastają w warunkach optymalnego nawodnienia, po czym zostają poddane stresowi niedoboru wody,
- b. Izoluje się RNA z liści siewek jęczmienia,
- c. Przeprowadza się syntezę cDNA,
- d. Analizuje się poziom ekspresji genów HORVU5Hr1G093700, HORVU5Hr1G092120, HORVU4Hr1G087430, HORVU7Hr1G117880, HORVU1Hr1G002090 metodą qPCR, charakteryzujący się tym, że do analizy poziomu ekspresji genów stosuje się sekwencje starterów określone powyżej,
- e. oblicza się relatywny poziom ekspresji genów HORVU5Hr1G093700, HORVU5Hr1G092120, HORVU4Hr1G087430, HORVU7Hr1G117880, HORVU1Hr1G002090, w oparciu o poziomy ekspresji genów referencyjnych, przy czym poziomy ekspresji genów porównuje się pomiędzy siewkami kontrolnymi rosnącymi w warunkach optymalnego nawodnienia oraz siewkami narażonymi na stres suszy dla każdego z genotypów.
- f. Wybiera się genotypy jęczmienia wykazujące wyższy w porównaniu do genotypów analogicznych, hodowanych w warunkach optymalnego nawodnienia, poziom ekspresji genów HORVU5Hr1G093700, HORVU5Hr1G092120, HORVU4Hr1G087430, HORVU7Hr1G117880, HORVU1Hr1G002090, wskazujący na podwyższoną tolerancję na stres suszy.

Korzystnie, jako geny referencyjne stosuje się geny: EF1 i/lub GPDH.

Korzystnie, wzrost siewek narażonych na stres suszy prowadzi się przez 11 dni w warunkach optymalnego nawodnienia, po czym zostają poddane stresowi niedoboru wody na 10 kolejnych dni, co prowadzi do spadku OZW poniżej 4%.

Korzystnie, wzrost siewek kontrolnych prowadzi się przez 21 dni.

Korzystnie, hodowla w warunkach optymalnego nawodnienia występuje przy wilgotności od 16 do 20% OZW, najkorzystniej 18% OZW.

Korzystnie, etap poddawania siewek stresowi suszy prowadzi się przy wilgotności $\leq 4\%$ OZW.

Przedmiot wynalazku przedstawiony został w przykładach wykonania oraz na rysunku który:

przedstawia przykładową analizę ekspresji genów u dwóch genotypów po stresie suszy. Odmiana wyjściowa Sebastian jest tolerancyjna na stres suszy, w porównaniu do mutantu hvd14.d, który jest nadwrażliwy na suszę. Ekspresja genów badana była przez porównanie każdego z genotypów, który rósł w warunkach optymalnego nawodnienia (18% OZW) do roślin narażonych na niedobór wody (10-dniowy wzrost w glebie o wilgotności mniejszej niż 4% OZW). Analizę poziomu ekspresji prowadzono metodą qPCR, a na figurze zobrazowano względny poziom ekspresji wspomnianych genów pod wpływem suszy w odniesieniu do warunków kontrolnych, dla których poziom ekspresji przyjęto jako wartość 1.

Wynalazek został przedstawiony w przykładach wykonania, które nie mają charakteru ograniczającego. Jak wynika z uzyskanych przez Twórców wyników, dla celów wynalazku identyfikację odmian jęczmienia o lepszej tolerancji na stres suszy w oparciu o analizę poziomu ekspresji genów HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090 można przeprowadzić na trzytygodniowych siewkach jęczmienia, które rosną w warunkach optymalnego nawodnienia oraz tych poddanych stresowi suszy. Przez optymalne warunki nawodnienia rozumie się poziom wilgotności na poziomie 18% OZW, natomiast niedobór wody otrzymuje się przez zaprzestanie podlewania na 10 dni, co prowadzi do spadku wilgotności gleby poniżej 4% OZW. Selekcję odmian o podwyższonej tolerancji na stres suszy prowadzi się w oparciu o analizę poziomu ekspresji genów HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090 w tkankach liści trzytygodniowych siewek jęczmienia.

Przykład 1. Analiza poziomu ekspresji genów HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090.

RNA wyizolowano z liści 3-tygodniowych siewek jęczmienia, które rosły w warunkach optymalnego nawodnienia (18% OZW) oraz narażonych na 10-dniowy stres suszy (zaprzestanie podlewania na 10 dni, co prowadzi do spadku wilgotności gleby poniżej 4% OZW), 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:

1. Dla genu HORVU5Hr1G093700
starter F – sekwencja nr 1
starter R – sekwencja nr 2
2. Dla genu HORVU5Hr1G092120
starter F – sekwencja nr 3
starter R – sekwencja nr 4
3. Dla genu HORVU4Hr1G087430
starter F – sekwencja nr 5
starter R – sekwencja nr 6
4. Dla genu HORVU7Hr1G117880
starter F – sekwencja nr 7
starter R – sekwencja nr 8
5. Dla genu HORVU1Hr1G002090
starter F – sekwencja nr 9
starter R – sekwencja nr 10

Jako geny referencyjne w tej reakcji wykorzystano EF1 (Elongation factor 1- α) oraz GPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (Rapacz et al., 2012).

Przykład 2. Metoda selekcji odmian jęczmienia tolerancyjnych na stres suszy w oparciu o analizę poziomu ekspresji genów HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090.

Metoda selekcji odmian jęczmienia tolerancyjnych na stres suszy opiera się na porównaniu poziomów ekspresji genów HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090, z użyciem wspomnianych starterów. Ocena poziomu ekspresji genów wykonywana jest z użyciem reakcji qPCR i obejmuje:

1. Wzrost siewek kontrolnych jęczmienia prowadzi się przez 3-tygodnie w warunkach optymalnego nawodnienia (wilgotność 18% OZW), natomiast wzrost siewek narażonych na stres suszy prowadzi się przez 11 dni w warunkach optymalnego nawodnienia, po czym zostają poddane stresowi niedoboru wody na 10 kolejnych dni, co prowadzi do spadku OZW poniżej 4%.
2. Izolację RNA z liści jęczmienia, z użyciem mirVana™ miRNA Isolation Kit (ThermoScientific, Waltham, MA, USA, numer katalogowy AM1560) lub innym, pozwalającym na otrzymanie czystego chemicznie ekstraktu RNA przy zachowaniu jego integralności.
3. 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. Reakcje qPCR z użyciem otrzymanego cDNA (rozcieńczonego 4-krotnie wodą), starterów specyficznych dla genów HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090 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.
5. Reakcję qPCR z użyciem starterów genów referencyjnych EF1 (Elongation factor 1- α) oraz GPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (Rapacz et al., 2012) dla każdej próby cDNA.
6. Bazując na kinetyce reakcji amplifikacji każdego z genów HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090 oraz genów referencyjnych oblicza się względny poziom ekspresji badanych genów wykorzystu-

jąc zwyczajowo przyjęte metody obliczeniowe. Poziomy ekspresji genów porównuje się pomiędzy roślinami rosnącymi w warunkach optymalnego nawodnienia (18% OZW) oraz roślin narażonych na 10-dniowy stres suszy (wilgotność gleby poniżej 4% OZW), dla każdego z genotypów.

7. Genotypy z najwyższym poziomem ekspresji genów HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G1178809; HORVU1Hr1G002090 są genotypami o podwyższonej tolerancji na stres suszy. Stąd dla każdego z genotypów porównuje się poziom ekspresji każdego z badanych genów pomiędzy kontrolą a roślinami narażonymi na stres suszy. Im wyższa ekspresja genów u roślin stresowanych tym silniejsza odpowiedź na stres, co przekłada się na wyższą tolerancję rośliny na stres suszy. Przedstawiona procedura powinna być przeprowadzona dla wszystkich analizowanych genotypów, a wartością użytą do porównania ich wrażliwości na stres suszy jest krotność wzrostu ekspresji u roślin stresowanych. Rośliny o najwyższych wskaźnikach są najbardziej tolerancyjne.

Otrzymane wyniki porównuje się pomiędzy dwiema bądź większą liczbą genotypów. Im wyższy poziom ekspresji tym większa tolerancja na stres suszy. Wynik porównania dwóch genotypów o zróżnicowanej tolerancji na stres suszy przedstawiono na Figurze 2.

Literatura:

Daszkowska-Golec, A., Collin, A., Sitko, K., Janiak, A., Kalaji, H. M., & Szarejko, I. (2019). Genetic and physiological dissection of photosynthesis in barley exposed to drought stress. *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6341.

IUNG-PIB (2019) Komunikat odośnie wystąpienia warunków suszy w Polsce, Rok: 2019; okres: 07 (21.V – 20.VII).

Kędziora A. 1993. Klimat a stosunki wodne w środowisku przyrodniczym Wielkopolski. *Kronika Wielkopolski*, Nr 1(64), str. 46–54.

Marzec, M., Daszkowska-Golec, A., Collin, A., Melzer, M., Eggert, K., & Szarejko, I. (2020). Barley strigolactone signalling mutant hvd14.d reveals the role of strigolactones in abscisic acid-dependent response to drought. *Plant, Cell & Environment*, 43(9), 2239–2253.

OECD/FAO (2019), *OECD-FAO Agricultural Outlook 2019–2028*, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2019-en.

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.

Ryszkowski L., Kędziora A. 1993. Rolnictwo a efekt szklarniowy. *Kosmos*, 42(1), str. 123–149.

Wykaz sekwencji:

<110> Uniwersytet Śląski w Katowicach

<120> Sekwencje starterów do identyfikacji genów jęczmienia, sposób analizy ekspresji genów jęczmienia oraz sposób identyfikacji pozwalający na selekcję odmian jęczmienia o zwiększonej tolerancji na suszę

<130> 593

<140> P.437298

<141> 2022-11-05

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 1

gtgatcttca gtttgggcgt tgc

23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 2

tgagcttgac ccagaaacag agg 23

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 3

tcgcaacaga tcagcacact tcc 23

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 4

tgtggtgcta cgaagtacga acag 24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 5

acgtcttggt ggtgtcaatg atgc 24

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 6
tcacatgggt gtctaccaag gg 22

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare

<400> 7
agtgcgacga ggggtgcatt tg 22

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare

<400> 8
aagcttcacc tggtcacteg ac 22

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare

<400> 9
aagcactct tccgatgat gc 22

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare

<400> 10
atgagcgtgc ccatttgagt cg 22

Zastrzeżenia patentowe

1. Sekwencje starterów do identyfikacji genów jęczmienia, specyficznych dla genów HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090 umożliwiające analizę poziomu ekspresji tych genów **znamiennie tym**, że mają sekwencję nukleotydową:
 - a. Dla genu HORVU5Hr1G093700
starter F – sekwencja nr 1
starter R – sekwencja nr 2
 - b. Dla genu HORVU5Hr1G092120
starter F – sekwencja nr 3
starter R – sekwencja nr 4
 - c. Dla genu HORVU4Hr1G087430
starter F – sekwencja nr 5
starter R – sekwencja nr 6
 - d. Dla genu HORVU7Hr1G117880
starter F – sekwencja nr 7
starter R – sekwencja nr 8
 - e. Dla genu HORVU1Hr1G002090
starter F – sekwencja nr 9
starter R – sekwencja nr 10
2. Sposób analizy poziomu ekspresji genów HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090 metodą qPCR, **znamienny tym**, że stosuje się startery:
 - a. Dla genu HORVU5Hr1G093700
starter F – sekwencja nr 1
starter R – sekwencja nr 2
 - b. Dla genu HORVU5Hr1G092120
starter F – sekwencja nr 3
starter R – sekwencja nr 4
 - c. Dla genu HORVU4Hr1G087430
starter F – sekwencja nr 5
starter R – sekwencja nr 6
 - d. Dla genu HORVU7Hr1G117880
starter F – sekwencja nr 7
starter R – sekwencja nr 8
 - e. Dla genu HORVU1Hr1G002090
starter F – sekwencja nr 9
starter R – sekwencja nr 10
3. Sposób selekcji odmian jęczmienia o podwyższonej tolerancji na stres suszy, obejmujący następujące etapy:
 - a. Prowadzi się wzrost siewek jęczmienia, przy czym dla siewek kontrolnych prowadzi się wzrost w warunkach optymalnego nawodnienia, natomiast siewki narażone na stres suszy wzrastają w warunkach optymalnego nawodnienia, po czym zostają poddane stresowi niedoboru wody,
 - b. Izoluje się RNA z liści siewek jęczmienia,
 - c. Przeprowadza się syntezę cDNA,
 - d. Analizuje się poziom ekspresji genów HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090 metodą qPCR, **znamienny tym**, że do analizy poziomu ekspresji genów stosuje się startery:
 - i. Dla genu HORVU5Hr1G093700
starter F – sekwencja nr 1
starter R – sekwencja nr 2
 - ii. Dla genu HORVU5Hr1G092120
starter F – sekwencja nr 3
starter R – sekwencja nr 4

- iii. Dla genu HORVU4Hr1G087430
starter F – sekwencja nr 5
starter R – sekwencja nr 6
 - iv. Dla genu HORVU7Hr1G117880
starter F – sekwencja nr 7
starter R – sekwencja nr 8
 - v. Dla genu HORVU1Hr1G002090
starter F – sekwencja nr 9
starter R – sekwencja nr 10
 - e. oblicza się relatywny poziom ekspresji genów HORVU5Hr1G093700, HORVU5Hr1G092120, HORVU4Hr1G087430, HORVU7Hr1G117880, HORVU1Hr1G002090, w oparciu o poziomy ekspresji genów referencyjnych, przy czym poziomy ekspresji genów porównuje się pomiędzy siewkami kontrolnymi rosnącymi w warunkach optymalnego nawodnienia oraz siewkami narażonymi stres suszy dla każdego z genotypów,
 - f. Wybiera się genotypy jęczmienia wykazujące wyższy, w porównaniu do genotypów analogicznych, hodowanych w warunkach optymalnego nawodnienia, poziom ekspresji genów HORVU5Hr1G093700; HORVU5Hr1G092120; HORVU4Hr1G087430; HORVU7Hr1G117880; HORVU1Hr1G002090 wskazujący na podwyższoną tolerancję na stres suszy.
- 4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jako geny referencyjne stosuje się geny: EF1 i/lub GPDH.
 - 5. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że wzrost siewek narażonych na stres suszy prowadzi się przez 11 dni w warunkach optymalnego nawodnienia, po czym zostają poddane stresowi niedoboru wody na 10 kolejnych dni, co prowadzi do spadku OZW poniżej 4%.
 - 6. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że wzrost siewek kontrolnych prowadzi się przez 21 dni.
 - 7. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że hodowla w warunkach optymalnego nawodnienia występuje przy wilgotności od 16 do 20% OZW.
 - 8. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że hodowla w warunkach optymalnego nawodnienia występuje przy wilgotności 18% OZW.
 - 9. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że etap poddawania siewek stresowi suszy prowadzi się przy wilgotności $\leq 4\%$ OZW.

Rysunek

