

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242225 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437300**

(22) Data zgłoszenia: **2021.03.15**

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

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.01.30 WUP 05/2023**

(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

(74) Pełnomocnik:

Mariusz Grzesiczak, Dąbrowa Górnicza, PL

(54) Tytuł:

Sekwencje starterów do identyfikacji genów rzodkiewnika pospolitego, sposób analizy ekspresji genów rzodkiewnika pospolitego oraz sposób identyfikacji genotypów rzodkiewnika pospolitego z uszkodzeniem w szlaku biosyntezy lub sygnalizacji strigolaktonów

PL 242225 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są sekwencje starterów pozwalających na analizę ekspresji trzech genów rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) i sposób analizy ekspresji tych genów z użyciem wspomnianych starterów pozwalający na selekcję mutantów strigolaktonowych rzodkiewnika pospolitego z uszkodzeniem w szlaku biosyntezy bądź sygnalizacji strigolaktonów. Bardziej szczegółowo wynalazek dotyczy genów o identyfikatorach AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380 kodujących odpowiednio białko bogate w glicynę, dioksygenazę karotenoidów oraz endoglukanazę. Dla każdego z genów zaprojektowano startery pozwalające na określenie ich poziomu ekspresji z użyciem zaproponowanego systemu badania ekspresji genów.

Strigolaktony to grupa hormonów roślinnych opisanych w 2008 r (Gomez-Roldan i inni, 2008; Umehara i inni, 2008). Pierwotnie wskazano ich udział w procesie regulacji rozkrzewiania części nadziemnej pędu, jednak w kolejnych latach wykazano, że są również zaangażowane w rozwój systemu korzeniowego, starzenie się roślin czy odpowiedź roślin na stropy biotyczne i abiotyczne (Marzec i Muszyńska, 2015; Marzec 2016; Marzec i Alqudah, 2018). Do tej pory opisano szereg mutantów z uszkodzeniem w szlaku biosyntezy oraz sygnalizacji strigolaktonów u różnych gatunków roślin, w tym rzodkiewnika pospolitego. Wszystkie do tej pory opisane mutanty wykazują fenotyp charakterystyczny dla mutantów strigolaktonowych – są formami półkarłowatymi z większą liczbą rozgałęzień pędu. Fenotyp ten jest dobrze widoczny w późniejszych etapach rozwoju rośliny, natomiast w stadium siewki, zanim zaczęną pojawiać się dodatkowe rozgałęzienia pędów, brak jest widocznych cech pozwalających na rozróżnienie mutantów strigolaktonowych od innych genotypów. Często do selekcji form z uszkodzeniem w szlakach biosyntezy strigolaktonów wykorzystuje się traktowanie syntetycznymi strigolaktonami, które są w stanie odwrócić fenotyp mutantów biosyntezy oraz nie wpływają na fenotyp mutantów sygnalizacji. Jednak w tym wypadku wiąże się to z dodatkowymi kosztami zakupu syntetycznych strigolaktonów i taka selekcja również może zostać przeprowadzona w późniejszych etapach rozwoju rośliny, gdy obecna jest większa liczba rozgałęzień pędu.

W niniejszym zgłoszeniu przedstawiono metodę analizy ekspresji trzech genów rzodkiewnika pospolitego, która może posłużyć do selekcji mutantów strigolaktonowych rzodkiewnika pospolitego, zarówno z uszkodzeniem w szlaku sygnalizacji strigolaktonów (mutanty sygnalizacji), jak i uszkodzeniem w szlaku biosyntezy strigolaktonów (mutanty biosyntezy) na wczesnym etapie rozwoju (4-tygodniowe siewki), gdy brak jeszcze rozgałęzień pędu.

Dotychczas ujawnione zgłoszenia patentowe związane ze strigolaktonami dotyczyły głównie syntezy ich analogów (RO31928 A2; US2015250170 A1; US2015141255 A1; WO2013050325A1) bądź też ich wykorzystania do zwiększenia interakcji pomiędzy roślinami a mikroorganizmami (RO131930 A2) czy metod badania ich bioaktywności (RO131933 A2). W zgłoszeniu o numerze CN109940031 A wykazano, że wykorzystanie syntetycznego strigolaktonu GR24 może zmniejszyć akumulację kadmu u jęczmienia. Natomiast w zgłoszeniu JP2020083853 A opisano substancję hamującą produkcję strigolaktonów u roślin. Ponadto wykazano, że strigolaktony bądź ich analogi mogą też być wykorzystane do kontroli kiełkowania nasion roślin pasożytniczych (CZ2017660 A3) czy nawożenia upraw ryżu (CN108623397 A).

Celem twórców niniejszego wynalazku było opracowanie nowych sekwencji starterów pozwalających na identyfikację mutantów strigolaktonowych rzodkiewnika pospolitego w oparciu o analizę poziomu ekspresji genów AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380. U mutantów strigolaktonowych rzodkiewnika pospolitego, 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 świetlna 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 genów AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380, w porównaniu do odmiany wyjściowej.

Proponowane rozwiązanie dotyczące analizy poziomów ekspresji trzech genów rzodkiewnika pospolitego (AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380) jest metodą pozwalającą na selekcję mutantów strigolaktonowych rzodkiewnika pospolitego. Poprzez analizę profili ekspresji z użyciem przedstawionych starterów możliwe jest porównanie genotypów rzodkiewnika pospolitego między sobą i wybranie tych, które niosą uszkodzenie w szlaku biosyntezy bądź sygnalizacji strigolaktonów. Podstawa wynalazku to informacje o poziomie ekspresji trzech genów rzodkiewnika pospolitego (AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380) w siewkach, korzystnie czterotygodniowych, rzodkiewnika pospolitego, rosnących w optymalnych warunkach (temperatura powietrza od 18 do 22°C, najkorzystniej 20°C, foto-

period od 14/10 do 20/4, najkorzystniej 16/8, intensywność świetlna od 100 do 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, najkorzystniej 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Informacje te mogą być wykorzystane do oceny genotypów rzodkiewnika pospolitego pod kątem identyfikacji mutantów strigolaktonowych.

Istotę wynalazku stanowią sekwencje starterów do identyfikacji genów rzodkiewnika pospolitego, specyficznych dla genów AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380, umożliwiające analizę poziomu ekspresji tych genów przedstawione w wykazie sekwencji:

- a) dla genu AT1G73890:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 1
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 2
- b) dla genu AT4G32810:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 3
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 4
- c) dla genu AT1G71380:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 5
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 6.

Istotę wynalazku stanowi również sposób analizy poziomu ekspresji genów rzodkiewnika pospolitego AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380 metodą qPCR, charakteryzujący się tym, że stosuje się sekwencje starterów przedstawione w wykazie sekwencji:

- a) dla genu AT1G73890:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 1
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 2
- b) dla genu AT4G32810:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 3
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 4
- c) dla genu AT1G71380:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 5
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 6.

Kolejną istotę wynalazku stanowi sposób identyfikacji genotypów rzodkiewnika pospolitego z uszkodzeniem w szlaku biosyntezy lub sygnalizacji strigolaktonów, obejmujący następujące etapy:

- a. prowadzi się wzrost siewek rzodkiewnika pospolitego w optymalnych warunkach,
- b. izoluje się RNA z siewek rzodkiewnika pospolitego,
- c. przeprowadza się syntezę cDNA,
- d. analizuje się poziom ekspresji genów AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380 metodą qPCR,

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

- i. dla genu AT1G73890:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 1
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 2
- ii. dla genu AT4G32810:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 3
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 4
- iii. dla genu AT1G71380:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 5
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 6,
- e. oblicza się relatywny poziom ekspresji genów AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380, w oparciu o poziom ekspresji genów referencyjnych, korzystnie genów: GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) i/lub ACT1 (Actin 1) (Jin i inni, 2019) dla każdej próby cDNA,
- f. wybiera się genotypy rzodkiewnika pospolitego wykazujące podwyższony poziom ekspresji genów AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380, w odniesieniu do innych genotypów analizowanych w tym samym procesie, wskazujący na obniżoną wrażliwość na strigolaktony (mutant sygnalizacji strigolaktonów) bądź obniżoną produkcję strigolaktonów (mutant biosyntezy strigolaktonów).

Korzystnie, wzrost siewek rzodkiewnika pospolitego prowadzi się przez 4 tygodnie i takie poddaje się dalszym procesom.

Korzystnie, optymalne warunki w jakich prowadzi się wzrost siewek rzodkiewnika pospolitego oznaczają temperaturę powietrza od 18 do 22°C, najkorzystniej 20°C, fotoperiod od 14/10 do 20/4, najkorzystniej 16/8, intensywność świetlną od 100 do 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ najkorzystniej 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Przedmiot wynalazku przedstawiony został w przykładach wykonania oraz na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia przykładową analizę ekspresji genów u trzech genotypów rzodkiewnika pospolitego: odmiany wyjściowej, mutantu sygnalizacji strigolaktonów oraz mutantu biosyntezy strigolaktonów. Ekspresja genów badana była przez porównanie ekspresji genów u genotypów, które rosły w takich samych, optymalnych warunkach. Analizę poziomu ekspresji prowadzono metodą qPCR, a na figurze 1 zobrazowano względny poziom ekspresji wspomnianych genów u badanych genotypów.

Wynalazek został przedstawiony w przykładach wykonania, które nie mają charakteru ograniczającego. Jak wynika z uzyskanych wyników, dla celów wynalazku identyfikację mutantów strigolaktonowych rzodkiewnika pospolitego w oparciu o analizę poziomu ekspresji genów AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380 można przeprowadzić najkorzystniej na czterotygodniowych siewkach rzodkiewnika pospolitego, które rosną w optymalnych warunkach. Przez optymalne warunki rozumie się temperaturę powietrza od 18 do 22°C, najkorzystniej 20°C, fotoperiod od 14/10 do 20/4, najkorzystniej 16/8, intensywność świetlną od 100 do 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, najkorzystniej 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Selekcję odmian o obniżonej wrażliwości na strigolaktony bądź o zmniejszonej produkcji strigolaktonów prowadzi się w oparciu o przeprowadzoną wcześniej analizę poziomu ekspresji genów AT3G59845, AT1G06260 lub AT1G73890 w tkankach całych siewek rzodkiewnika pospolitego.

Przykład 1. Analiza poziomu ekspresji genów AT1G73890, AT4G32810 oraz AT1G71380.

RNA wyizolowano z 4-tygodniowych siewek rzodkiewnika pospolitego, które rosły w optymalnych warunkach (temperatura powietrza 20°C, fotoperiod 16/8, intensywność świetlna 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) z użyciem mirVana™ miRNA Isolation Kit (ThermoScientific, Waltham, MA, USA, numer katalogowy AM 1560). 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 AT1G73890:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 1
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 2
- b) dla genu AT4G32810:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 3
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 4
- c) dla genu AT1G71380:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 5
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 6.

Jako geny referencyjne w tej reakcji wykorzystano GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) oraz ACT1 (Actin1) (Jin i inni, 2019) dla każdej próby cDNA.

Przykład 2. Metoda selekcji mutantów strigolaktonowych rzodkiewnika pospolitego w oparciu o analizę poziomów ekspresji genów AT1G73890, AT4G32810 oraz AT1G71380.

Istotą metody selekcji mutantów strigolaktonowych rzodkiewnika pospolitego jest porównanie poziomów ekspresji genów AT1G73890, AT4G32810 oraz AT1G71380, z użyciem odpowiednio dobranych starterów. Przykładowy sposób selekcji mutantów strigolaktonowych rzodkiewnika pospolitego obejmuje następujące etapy:

1. wzrost siewek rzodkiewnika pospolitego prowadzi się przez 4 tygodnie w optymalnych warunkach (temp. powietrza 20°C, fotoperiod 16/8, intensywność świetlna 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$),
2. izolację RNA z siewek rzodkiewnika pospolitego, 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 wyizolowanego wcześniej,

4. reakcję qPCR z użyciem otrzymanego cDNA (rozcieńczonego 4-krotnie wodą), starterów specyficznych dla genów AT1G73890, AT4G32810 oraz AT1G71380:
 - a) dla genu AT1G73890:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 1
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 2
 - b) dla genu AT4G32810:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 3
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 4
 - c) dla genu AT1G71380:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 5
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 6oraz 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 GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) oraz ACT1 (Actin1) (Jin i inni, 2019) dla każdej próby cDNA,
6. obliczenie – bazując na kinetyce reakcji amplifikacji każdego z genów AT1G73890, AT4G32810 oraz AT1G71380 oraz genów referencyjnych – względnego poziomu ekspresji badanych genów wykorzystując zwyczajowo przyjęte metody obliczeniowe, oraz porównanie poziomów ekspresji genów pomiędzy badanymi roślinami,
7. wybór genotypów rzodkiewnika pospolitego wykazujących podwyższony poziom ekspresji genów AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380, w odniesieniu do innych genotypów analizowanych w tym samym procesie, gdzie genotypy z podwyższonym poziomem ekspresji genów AT1G73890, AT4G32810 oraz AT1G71380 w porównaniu do pozostałych badanych genotypów są mutantami strigolaktonowymi z uszkodzeniami w szlaku biosyntezy bądź sygnalizacji. Specyficzność podwyższonej ekspresji u mutantów strigolaktonów udowodniono sprawdzając poziom ekspresji genów AT3G59845, AT1G06260 oraz AT1G73890 u odmiany wyjściowej, znanego mutantu biosyntezy strigolaktonów oraz znanego mutantu sygnalizacji strigolaktonów (Fig. 1).

Literatura:

- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J. P., & Bouwmeester, H. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455(7210), 189–194.
- Jin, Y., Liu, F., Huang, W., Sun, Q., & Huang, X. (2019). Identification of reliable reference genes for qRT-PCR in the ephemeral plant *Arabidopsis pumila* based on full-length transcriptome data. *Scientific reports*, 9(1), 1–11.
- Marzec M. (2016). Perception and signaling of strigolactones. *Front Plant Sci*, 7, 1260.
- Marzec M, Alqudah AM. (2018). Key hormonal components regulate agronomically important traits in barley. *IJMS*, 19, 795.
- Marzec M, Gruszka D, Tylec P, Szarejko I. (2016). Identification and functional analysis of the HvD14 gene involved in strigolactone signaling in *Hordeum vulgare*. *Physiol Plant* 158(3), 341–355.
- Marzec M, Muszyńska A. (2015). In silico analysis of the genes encoding proteins that are involved in the biosynthesis of the RMS/MAX/D pathway revealed new roles of strigolactones in plants. *IJMS*, 16(4), 6757–6782.
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., ... & Koyazuka, J. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455(7210), 195–200.

Wykaz sekwencji starterów

<110> Uniwersytet Śląski w Katowicach

<120> Sekwencje starterów do identyfikacji genów rzodkiewnika
pospolitego, sposób analizy ekspresji genów rzodkiewnika
pospolitego oraz sposób identyfikacji genotypów rzodkiewnika
pospolitego z uszkodzeniem w szlaku biosyntezy lub sygnalizacji
strigolaktonów

<130> 595

<140> P.437300

<141> 2022-11-05

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

gcctagtgat tcctcctctg ttgc

24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

ccatttgagc cactggagta gcag

24

<210> 3	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 3	
gtgcaacca tgaggatgat ggag	24
<210> 4	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 4	
accatgcaag ccataaggaa ggc	23
<210> 5	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 5	
tgctcctact ctggttaca ggac	24
<210> 6	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 6	
gttgccttta gcagccatga cg	22

Zastrzeżenia patentowe

1. Sekwencje starterów do identyfikacji genów rzodkiewnika pospolitego, specyficznych dla genów AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380, umożliwiające analizę poziomu ekspresji tych genów przedstawione w wykazie sekwencji:
 - a) dla genu AT1G73890:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 1
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 2
 - b) dla genu AT4G32810:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 3
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 4
 - c) dla genu AT1G71380:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 5
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 6.
2. Sposób analizy poziomu ekspresji genów rzodkiewnika pospolitego AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380 metodą qPCR, **znamienny tym**, że stosuje się sekwencje starterów przedstawione w wykazie sekwencji:
 - a) dla genu AT1G73890:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 1
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 2
 - b) dla genu AT4G32810:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 3
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 4
 - c) dla genu AT1G71380:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 5
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 6.
3. Sposób identyfikacji genotypów rzodkiewnika pospolitego z uszkodzeniem w szlaku biosyntezy lub sygnalizacji strigolaktonów, obejmujący następujące etapy:
 - a. prowadzi się wzrost siewek rzodkiewnika pospolitego w optymalnych warunkach,
 - b. izoluje się RNA z siewek rzodkiewnika pospolitego,
 - c. przeprowadza się syntezę cDNA,
 - d. analizuje się poziom ekspresji genów AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380 metodą qPCR

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

 - i. dla genu AT1G73890:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 1
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 2
 - ii. dla genu AT4G32810:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 3
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 4
 - iii. dla genu AT1G71380:
 - starter F – sekwencja nukleotydowa 5
 - starter R – sekwencja nukleotydowa 6,
 - e. oblicza się relatywny poziom ekspresji genów AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380, w oparciu o poziomy ekspresji genów referencyjnych, dla każdej próby cDNA,
 - f. wybiera się genotypy rzodkiewnika pospolitego wykazujące podwyższony poziom ekspresji genów AT1G73890, AT4G32810 lub AT1G71380, w odniesieniu do innych genotypów analizowanych w tym samym procesie, wskazujący na obniżoną wrażliwość na strigolaktony bądź obniżoną produkcję strigolaktonów.
4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że wzrost siewek rzodkiewnika pospolitego prowadzi się przez 4 tygodnie.
5. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że optymalne warunki oznaczają temperaturę powietrza od 18 do 22°C, fotoperiod od 14/10 do 20/4, intensywność świetlną od 100 do 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

6. Sposób według zastrz. 3 i 5, **znamienny tym**, że optymalne warunki oznaczają temperaturę powietrza 20°C, fotoperiod 16/8, intensywność świetlną 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
7. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jako geny referencyjne stosuje się geny: GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) i/lub ACT1 (Actin1).

Rysunek

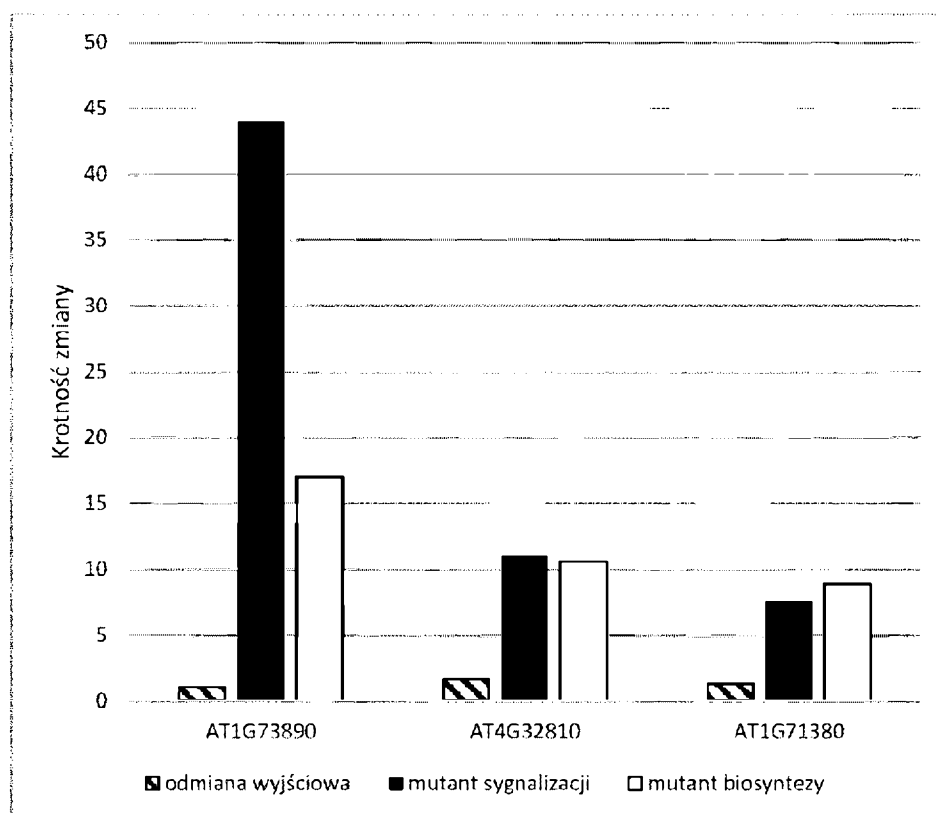


Fig. 1.