(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) **1-0038157**

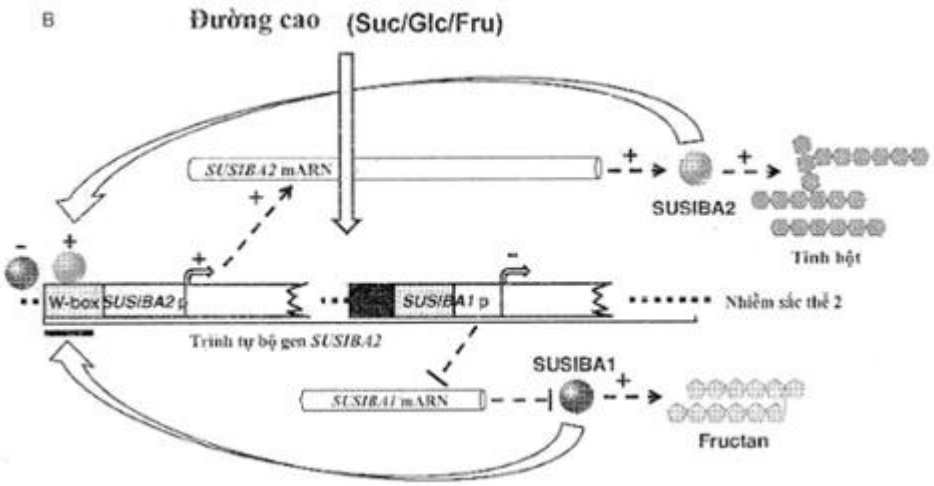
(51)[2006.01] **C12N 15/82**; C07K 14/415

(13) **B**

(21) 1-2019-05974 (22) 28/03/2018
(86) PCT/SE2018/050335 28/03/2018 (87) WO2018/182493 A1 04/10/2018
(30) 62/479,374 31/03/2017 US; 2962852 31/03/2017 CA
(45) 25/01/2024 430 (43) 25/03/2020 384ASC
(73) GREEN RICE SWEDEN AB (SE)
c/o SLU Holding AB Almas Allée 7 756 51 Uppsala, Sweden
(72) SUN, Chuanxin (SE); ANDERSSON, Roger (SE); JANSSON, Christer (SE); ÅMAN, Per (SE).
(74) Công ty TNHH Quốc tế D &N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) NGUYÊN LIỆU THỰC VẬT SẢN XUẤT HYDRAT CACBON

(57)
Nguyên liệu thực vật chứa trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 chịu sự kiểm soát phiên mã của trình tự khởi động hoạt động ở nguyên liệu thực vật này. Trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 thiếu ít nhất một phần của vùng hoạt hóa của trình tự khởi động SUSIBA1 hoặc trình tự khởi động giống SUSIBA1 có mặt trong intron của phiên bản kiểu dại của trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2. Nguyên liệu thực vật có khả năng sản xuất hydrat cacbon kiểm soát được, cụ thể là tinh bột hoặc tinh bột và fructan. Cụ thể là, nguyên liệu thực vật có thể được thiết kế để sản sinh hydrat cacbon ở các mức độ được tăng cường.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Các phương án của sáng chế đề cập chung đến các nguyên liệu thực vật, và cụ thể là đến nguyên liệu thực vật có khả năng sản xuất hydrat cacbon kiểm soát được.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đường là các chất mang năng lượng chính trong quá trình chuyển năng lượng mặt trời thành năng lượng hóa học thiết yếu cho sự sống trên Trái đất bằng quá trình quang hợp. Ở thực vật bậc cao, đường không chỉ là nguyên liệu cơ chất cơ bản để tổng hợp sinh khối , mà còn là các phân tử truyền tín hiệu cho nhiều con đường chuyển hóa. Quá trình tổng hợp hydrat cacbon thường được gây ra bởi các đường. Tùy theo mức nồng độ đường và sự sẵn có của đường, các thực vật bậc cao sử dụng các chiến lược khác nhau để tổng hợp các hydrat cacbon khác nhau trong việc dự trữ năng lượng để cung cấp năng lượng ngay (vài phút), trung hạn (vài giờ) và dài hạn (vài ngày đến vài năm) để đáp ứng các nhu cầu năng lượng của sự sinh trưởng, phát triển và sinh sản.

Fructan, tinh bột chuyển tiếp và tinh bột dự trữ là các ví dụ về các hydrat cacbon liên quan đến các dạng cung cấp năng lượng khác nhau. Chúng được tạo ra ở một số lượng lớn các thực vật có hoa bao gồm *Gramineae* ôn đới như đại mạch, lúa mì, yến mạch, và nhiều loại cỏ nuôi gia súc.

Tài liệu [1] mô tả yếu tố phiên mã (TF) truyền tín hiệu đường ở đại mạch 2 (SUSIBA2), thuộc các protein WRKY. SUSIBA2 TF liên kết với các yếu tố đáp ứng đường (SURE) và yếu tố W-bow nhưng không liên kết với yếu tố SP8a trong trình tự khởi động *ISO1*. Sự phiên mã của *SUSIBA2* có thể cảm ứng được bởi đường và là yếu tố phiên mã điều hòa trong quá trình tổng hợp tinh bột.

Tài liệu [3] mô tả sự biểu hiện của SUSIBA2 TF đại mạch ở cây lúa, tạo ra cây lúa chuyển gen có sản lượng tinh bột cao và metan thấp.

Tài liệu [17] mô tả thực vật chuyển gen chứa trình tự axit nucleic mã hóa TF truyền tín hiệu đường, như SUSIBA2 TF, mà có khả năng hoạt hóa trình tự khởi động của gen mã hóa enzym tham gia vào quá trình tổng hợp tinh bột.

Vẫn có nhu cầu về nguyên liệu thực vật có khả năng sản xuất hydrat cacbon kiểm soát được.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích chung của sáng chế là đề xuất nguyên liệu thực vật có khả năng sản xuất hydrat cacbon kiểm soát được.

Mục đích này và các mục đích khác của sáng chế đạt được nhờ các phương án được mô tả ở đây.

Sáng chế được xác định trong điểm yêu cầu bảo hộ độc lập. Các phương án khác được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ phụ thuộc.

Nguyên liệu thực vật chứa trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã truyền tín hiệu đường ở đại mạch 2 (SUSIBA2) hoặc yếu tố phiên mã giống SUSIBA2 chịu sự kiểm soát phiên mã của trình tự khởi động hoạt động ở nguyên liệu thực vật này. Trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc yếu tố phiên mã giống SUSIBA2 thiếu ít nhất một phần của vùng hoạt hóa của trình tự khởi động *SUSIBA1* hoặc trình tự khởi động giống *SUSIBA1*(*SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p) Fagrocó mặt ở intron của phiên bản kiểu dại của trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc yếu tố phiên mã giống SUSIBA2.

Nguyên liệu thực vật theo các phương án của sáng chế có khả năng sản xuất hydrat cacbon kiểm soát được, cụ thể là tinh bột hoặc tinh bột và fructan. Cụ thể là, nguyên liệu thực vật theo các phương án của sáng chế có thể được thiết kế để sản xuất hydrat cacbon ở các mức độ được tăng cường. Nguyên liệu thực vật theo các phương án của sáng chế cũng có thể làm giảm sự thải metan, và do đó có thể là nguyên liệu thực vật có sản lượng tinh bột cao và thải metan thấp, hoặc nguyên liệu thực vật có sản lượng tinh bột cao, fructan cao và thải metan thấp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các phương án này, cùng với các mục đích và các ưu điểm khác nữa của chúng, có thể được hiểu rõ nhất bằng cách tham khảo phần mô tả sau đây cùng với các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1. Nhận diện *SUSIBA1* cADN có độ dài đầy đủ (số truy cập Ngân hàng Gen KT290558) và phát hiện các sản phẩm phiên mã và protein được biểu hiện từ *SUSIBA1* và *SUSIBA2* ở đại mạch. (A) Khuếch đại các đầu 5' của các *SUSIBA1* cADN bằng 5'-RACE tạo ra ba amplicon (Dải 1-3). (B) Kết quả giải trình tự (SEQ ID NO: 114) chỉ ra là các amplicon 1-3 là giống với trình tự *SUSIBA2* cADN (số truy cập Ngân hàng Gen

AY323206). Dải dài nhất 3 bắt đầu từ nt 907 như được chỉ ra bởi mũi tên màu đen. Trình tự *SUSIBA1* cADN được in nghiêng. Các trình tự codon khởi đầu và dừng của SUSIBA2 và SUSIBA1 được gạch chân. Các đoạn mồi được sử dụng cho khuếch đại 5'-RACE là bằng các mũi tên (đoạn mồi lồng). (C) Phân tích thấm tách Northern của các sản phẩm phiên mã *SUSIBA1* và *SUSIBA2* ở lá cây đại mạch và các hạt đang phát triển. (D) Phân tích thấm tách Western của SUSIBA1 và SUSIBA2 ở lá đại mạch và các hạt đang phát triển, daf, số ngày sau khi ra hoa.

Fig.2. Thể hiện bằng sơ đồ trình tự khởi động *SUSIBA1* và *SUSIBA2* (số truy cập Ngân hàng Gen lần lượt là KT290559, KT290560 và AC269483). Trình tự khởi động *SUSIBA1* bao gồm *SUSIBA2* intron 2 và 5'-exon 3. Trình tự khởi động *SUSIBA1* (SEQ ID NO: 115) được chỉ ra và trình tự này bao gồm intron 2 (chữ thường) và đầu 5'của exon 3 (in nghiêng và in đậm) của *SUSIBA2* được thể hiện. Sự khởi đầu phiên mã (tương ứng với *SUSIBA1* dải 3 cADN) được chỉ ra bằng mũi tên. Trình tự mã hóa NLS (tín hiệu định vị nhân) và các trình tự mã hóa các miền WRKY axit amin được chỉ ra.

Fig.3. Phân tích hoạt tính trình tự khởi động *SUSIBA1*. Các cấu trúc khác nhau ở vi khuẩn agrobacterium được cho thâm nhập. (A) Huỳnh quang được kiểm tra dưới đèn UV. (B) Các vùng huỳnh quang của ba lá giống nhau bị thâm nhập được kiểm tra dưới kính hiển vi. (C) Cường độ huỳnh quang tương đối được định lượng từ ba lá giống nhau này. Các khác biệt đáng kể của hai *SUSIBA2* intron 2-5'-exon 3 bị cắt, *p35S:GFP, GUS-GFP* và AGL1 của vi khuẩn agrobacterium được so sánh với độ dài đầy đủ của *SUSIBA2* intron 2-5'-exon 3, và được chỉ ra bằng dấu hoa thị (**$p \leq 0,01$). ANOVA một chiều được sử dụng (Các vạch sai số thể hiện s.d.). Các vạch trong (A) = 7 mm và trong (B) = 100 μm.

Fig.4. Hàm lượng fructan và tinh bột trong lá đại mạch đáp ứng với việc sucroza (Suc) bị cung cấp lạc chỗ ở các nồng độ khác nhau. Sự thay đổi về hàm lượng fructan (A) và tinh bột (B) được thể hiện. Ba thử nghiệm độc lập (n = 3; hai lá mỗi thử nghiệm) được thực hiện và các bộ đôi kỹ thuật được sử dụng cho các phân tích fructan và tinh bột trong mỗi thử nghiệm. Các thay đổi về mức fructan và tinh bột được phát hiện lần lượt ở 50 mM và 85 mM Suc. Ngưỡng cảm ứng cho sự tổng hợp fructan và tinh bột ở lá đại mạch được xác định lần lượt là 40-50 mM và 75-85 mM sucroza. Các vạch độ lệch chuẩn là nhỏ, như được chỉ ra. Các khác biệt đáng kể giữa các mẫu được xử lý bằng sucroza và đối chứng sorbitol (Sorb) được chỉ ra bằng dấu hoa thị (**$p \leq 0,01$). ANOVA một chiều được sử dụng (Các vạch sai số thể hiện s.d.).

Fig.5. Hoạt tính nhạy với đường của các SUSIBA1 và SUSIBA2 TF trong việc điều hòa quá trình tổng hợp tinh bột và fructan ở đại mạch. (A) Hai trình tự khởi động luân phiên của trình tự *SUSIBA*, trình tự khởi động *SUSIBA1* (*SUSIBA1* p) và trình tự khởi động *SUSIBA2* (*SUSIBA2* p) ở nhiễm sắc thể đại mạch 2, đáp ứng khác nhau với các nồng độ sucroza (Suc). Với nồng độ Suc cao hơn 25 mM, sự giảm hoạt tính *SUSIBA1* p xảy ra và ở 40 mM Suc *SUSIBA2* p được hoạt hóa. Sự biểu hiện hoạt tính *SUSIBA1* p và *SUSIBA2* p cuối cùng tạo ra SUSIBA2 (62 kD) và SUSIBA1 (30 kD) TF, tương ứng. SUSIBA1 liên kết như là tác nhân ức chế với các gen tham gia vào quá trình tổng hợp fructan, và SUSIBA2 liên kết như là tác nhân hoạt hóa với các gen tham gia vào quá trình tổng hợp tinh bột. Việc giải phóng tác dụng ức chế của SUSIBA1 ở ≥ 50 mM Suc khởi động quá trình tổng hợp fructan, và sự liên kết của SUSIBA2 với các yếu tố cis cùng gốc ở ≥ 85 mM Suc kích thích sự tổng hợp tinh bột. (B) Hoạt tính *SUSIBA1* p và *SUSIBA2* p đáp ứng với mức nồng độ Suc. *SUSIBA1* p và *SUSIBA2* p lần lượt được dung hợp với các gen chỉ thị *GFP* và *BFP*. Vi khuẩn Agrobacterium mang các cấu trúc này được thâm nhập vào các lá đại mạch, mà sau đó được ủ ở các nồng độ Suc khác nhau. Huỳnh quang của *SUSIBA1* p*:GFP* được kiểm tra bằng ánh sáng kích thích ở 460-500 nm và huỳnh quang của *SUSIBA2* p*:BFP* ở 340-380 nm. Trình tự dung hợp (*GUS:GFP*) của *GUS* và *GFP* được sử dụng làm đối chứng âm. Các vạch = 100 μm.

Fig.6. Hàm lượng fructan và tinh bột, và các mức nồng độ sản phẩm phiên mã và protein của *SUSIBA1, SUSIBA2, 6-SFT* và *SBEIIb* trong lá đại mạch đáp ứng với các nồng độ khác nhau của sucroza (Suc), fructoza (Fru) và glucoza (Glc). (A) Hàm lượng fructan. (B) Hàm lượng tinh bột. (C) Phân tích qPCR về các mức biểu hiện gen. (D) Phân tích thấm tách Western về các mức protein tương ứng. Ba thử nghiệm độc lập (n = 3) được thực hiện cho các phân tích về fructan, tinh bột và qPCR và hai thử nghiệm cho phân tích thấm tách Western. ANOVA một chiều được sử dụng (*$p \leq 0,05$ hoặc **$p \leq 0,01$ giữa các mẫu được xử lý bằng đường và các đối chứng sorbitol và các vạch sai số thể hiện s.d. và là nhỏ trong (A) và (B)).

Fig.7. Các thay đổi về mức nội sinh của glucoza (Glc) và fructoza (Fru) và xác định hoạt tính trehaloza 6-phopsphat synthaza (TPS) và các mức biểu hiện *giống TPS* ở lá sau các lần xử lý đường khác nhau. (A) Glc nội sinh. (B) Fru nội sinh. (C) Các mức biểu hiện gen của protein *giống TPS* ở đại mạch trong các mẫu tương ứng. (D) Tổng hoạt tính của TPS. Dịch chiết protein *Arabidopsis* từ các mẫu lá được xử lý bằng Suc (85 mM) và ánh

sáng được sử dụng làm đối chứng dương cho thử nghiệm enzym. Các bộ ba sinh học (A, B, D) và ba thử nghiệm độc lập (C) được thực hiện (n = 3). ANOVA một chiều được sử dụng (*p ≤ 0,05 và **p ≤ 0,01 cho sự gia tăng của các mẫu được xử lý bằng đường so với các đối chứng sorbitol (Sorb) và các vạch sai số thể hiện s.d.).

Fig.8. Tác dụng ức chế hoạt tính của trình tự khởi động *6-SFT* bởi SUSIBA1. (A-D) Sự định vị nhân của SUSIBA1 ở tế bào đại mạch. *SUSIBA1* cADN được dung hợp với *GFP*. Vi khuẩn Agrobacterium có một mình *GFP* (A, B) hoặc *SUSIBA1.GFP* (C, D) được điều khiển bởi trình tự khởi động *35S* được cho thâm nhập. (E-J) Hoạt tính liên kết của SUSIBA1 với SUREa, các yếu tố W-box và trình tự khởi động SP8a của *6-SFT*. Các đoạn dò đoạn ADN được đánh dấu đầu cùng bằng [γ^{32}P]-ATP với T_4 polynucleotit kinaza. Đối với các đoạn dò oligo, một sợi được đánh dấu đầu cùng bằng [γ^{32}P]-ATP với T_4 polynucleotit kinaza và được gắn mồi với sợi oligo bổ sung. (E) Các yếu tố khác nhau trong trình tự khởi động *6-SFT*. (F) Hoạt tính liên kết SUSIBA1 với năm đoạn trong (E). SUSIBA1 được biểu hiện quá mức và được tinh chế từ *E. coli*. Hoạt tính liên kết được thể hiện bằng sự dịch chuyển dải được chỉ ra bằng các mũi tên. (G) Trình tự của các yếu tố trong trình tự khởi động *6-SFT* (SEQ ID NO: 78, 79, 62-67). Các trình tự liên ứng đối với SP8a và W-Box được gạch chân. (H) EMSA của các yếu tố trong (G) khi có mặt (+) hoặc vắng mặt (-) SUSIBA1. Vị trí của đoạn dò ADN tự do được chỉ ra. (I) Các trình tự của từng yếu tố được thao tác di truyền (SEQ ID NO: 68-79). Đoạn A (được gạch chân) được thiết kế để thay thế các trình tự liên ứng. (J) EMSA của các yếu tố được thao tác di truyền khi có mặt (+) hoặc vắng mặt (-) SUSIBA1. (K-O) Sự đồng thâm nhập của vi khuẩn agrobacterium với các cấu trúc *6-SFT* p*:GFP* và *p35S:SUSIBA1*. (K) Vi khuẩn Agrobacterium chứa *6-SFT* p*:GFP*. (L) Hỗn hợp của vi khuẩn agrobacterium chứa *6-SFT* p*:GFP* và *p35S:WRI1*. *WRI1* là gen TF không liên quan đến SUSIBA từ *Arabidopsis* với số truy cập Ngân hàng Gen NM_202701. (M) Hỗn hợp các vi khuẩn agrobacterium chứa *6-SFT* p*:GFP* và *p35S:SUSIBA1*. (N) Các mức nồng độ protein và sản phẩm phiên mã *SUSIBA1* trong vùng bị thâm nhập. Phần lồng vào thể hiện phân tích thấm tách Western của các mức nồng độ protein trong vùng bị thâm nhập với vi khuẩn agrobacterium sống (làn trái) hoặc vi khuẩn agrobacterum nền bị giết bằng nhiệt (làn phải). (O) Các mức sản phẩm phiên mã *WRI1* trong vùng bị thâm nhập. Ba thử nghiệm độc lập (n = 3) được thực hiện cho phân tích qPCR và hai thử nghiệm cho phân tích thấm tách Western. Các vạch trong (A-D) = 5 μm và trong (K-M) = 100 μm. ANOVA một chiều được sử dụng (Các

vạch sai số thể hiện s.d. và **p ≤ 0,01 giữa vi khuẩn agrobacterium nền bị giết bằng nhiệt và vi khuẩn agrobacterium sống).

Fig.9. Tác dụng ức chế asODN của *SUSIBA1*. (A) Sắp xếp thẳng hàng trình tự của năm asODN đã chọn, một dựa vào một vùng của *SUSIBA2* cADN chồng lên một phần của trình tự khởi động *SUSIBA1* (asODN 1), và dựa vào các vùng của *SUSIBA1* và *SUSIBA2* cADN (asODN 2-5) (SEQ ID NO: 32-37,116-119). (B) Phân tích thấm tách Western các mức nồng độ SUSIBA1 và SUSIBA2 sau khi ức chế asODN với năm asODN đã chọn (panen trên) và các mức nồng độ 6-SFT sau khi ức chế *SUSIBA1* với asODN 1 hoặc 5 (panen dưới). (C) Phân tích hoạt tính trình tự khởi động *SUSIBA1* sau khi ức chế với asODN 1 kháng lại vùng trình tự khởi động *SUSIBA1*. Hiệu quả ức chế với asODN 1 được so sánh với tác dụng ức chế hoạt tính trình tự khởi động *SUSIBA1* bởi 100 mM sucroza (Suc; panen trên và dưới về bên phải). Các đối chứng với 50 mM Suc và ODN có nghĩa (sODN) trong 50 mM Suc được đưa vào (panen trên và dưới về bên trái). (D) Hấp thụ ODN đã gắn nhãn huỳnh quang trong 50 mM Suc vào các tế bào lá đại mạch. Sự tự phát huỳnh quang được chỉ ra (panen trái) và ODN đã được đánh dấu huỳnh quang (mũi tên màu trắng) là khả kiến trong tế bào lá (panen bên phải) sau khi ủ 24 giờ. Các vạch trong (C) = 100μm, và trong (D) = 50 μm.

Fig.10. Các thay đổi về hàm lượng fructan và tinh bột trong lá đại mạch do tác dụng ức chế oligodeoxynucleotit đối nghĩa (asODN) của *SUSIBA1* và *SUSIBA2* ở ngưỡng cảm ứng sucroza đối với sự tổng hợp fructan và tinh bột. (A) Hàm lượng fructan trong lá với sự ức chế *SUSIBA1* ở 40 mM sucroza (Suc; panen trái) và với tác dụng ức chế *SUSIBA2* ở 50 mM (panen phải). (B) Hàm lượng tinh bột trong lá có sự ức chế *SUSIBA1* ở 75 mM Suc (panel trái) và với sự ức chế *SUSIBA2* ở 85 mM (panen phải). Việc xử lý bằng các ODN có nghĩa tương ứng cho *SUSIBA1* và *SUSIBA2* được sử dụng làm đối chứng cho các phân tích thống kê. Ba thử nghiệm độc lập (n = 3) được thực hiện. Sorb, sorbitol. ANOVA một chiều được sử dụng (*p ≤ 0,05 hoặc **p ≤ 0,01 và các vạch sai số thể hiện s.d.).

Fig.11. Các thay đổi về mức nồng độ sản phẩm phiên mã và protein của *SUSIBA1, SUSIBA2* và *6-SFT* trong lá đại mạch sau khi ức chế hoạt tính *SUSIBA1* và *SUSIBA2* bằng asODN. (A) Phân tích qPCR về các mức biểu hiện gen tương đối của *SUSIBA1, SUSIBA2* và *6-SFT* ở các nồng độ sucroza (Suc) đã chỉ ra với sự ức chế *SUSIBA1* (panen trái) hoặc *SUSIBA2* (panen phải) bởi asODN. (B) Phân tích thấm tách Western về các mức nồng độ protein tương ứng sau khi ức chế bằng asODN. Các khác biệt đáng kể sau khi ức chế được

chỉ ra bằng các dấu hoa thị so với đối chứng là các ODN có nghĩa (sODN) trong sucroza (Suc). Ba thử nghiệm độc lập được thực hiện để ức chế asODN và phân tích qPCR (n = 3), và hai cho phân tích thấm tách Western. ANOVA một chiều được sử dụng (Các vạch sai số thể hiện s.d. và **p≤ 0,01). Sorb, sorbitol.

Fig.12. Các thay đổi về mức nồng độ sản phẩm phiên mã và protein của *SUSIBA1, SUSIBA2* và *SBEIIb* trong lá đại mạch sau khi ức chế hoạt tính *SUSIBA1* và *SUSIBA2* bằng asODN. (A) Phân tích qPCR về các mức biểu hiện gen tương đối của *SUSIBA1, SUSIBA2* và *SBEIIb* ở các nồng độ sucroza (Suc) đã chỉ ra với sự ức chế *SUSIBA1* (panen trái) hoặc *SUSIBA2* (panen phải) bởi asODN. (B) Phân tích thấm tách Western về các mức nồng độ protein tương ứng sau khi ức chế bằng asODN. Các khác biệt đáng kể sau khi ức chế được chỉ ra bằng các dấu hoa thị so với đối chứng là các ODN có nghĩa (sODN) trong sucroza (Suc). Ba thử nghiệm độc lập được thực hiện cho việc ức chế asODN và phân tích qPCR (n = 3), và hai thử nghiệm độc lập cho phân tích thấm tách Western. ANOVA một chiều được sử dụng (Các vạch sai số thể hiện s.d. và **p≤ 0,01). Sorb, sorbitol.

Fig.13. Phân tích các giống đại mạch có hàm lượng fructan trong hạt cao và thấp. (A) Phân tích qPCR về các mức biểu hiện gen *SUSIBA1, SUSIBA2, 6-SFT* và *SBEIIb* ở các giống cho hàm lượng fructan cao (giống 155) và cho hàm lượng fructan thấp (giống 181) ở thời điểm 9 ngày sau khi ra hoa (daf; các panen trái), ở các giai đoạn phát triển khác nhau của giống 155 (các panen giữa), và ở nhiệt độ sinh trưởng khác nhau cho giống 155 ở 24/16°C (d/n) hoặc 18/10°C (d/n) (các panen phải). (B) Phân tích thấm tách Western về các mức nồng độ protein SUSIBA1, SUSIBA2, 6-SFT và SBEIIb cho các giống tương ứng, các giai đoạn phát triển (giai đoạn Dev) và các nhiệt độ sinh trưởng (Growth temp: nhiệt độ sinh trưởng). (C) Phân tích hàm lượng fructan và tinh bột trong các mẫu tương ứng. Các khác biệt đáng kể được chỉ ra bằng các dấu hoa thị giữa hai mẫu trong mỗi panen. ANOVA một chiều được sử dụng (Các vạch sai số thể hiện s.d. và *P≤0,05 hoặc **P≤ 0,01). Các giai đoạn Dev gồm 9 và 12 ngày sau khi ra hoa (9daf; 12daf) tương ứng với Z73-Z75 trên thang Zadoks trong phát triển cây ngũ cốc. Các bộ ba sinh học (n = 3) với 10 hạt trong mỗi lần lặp lại sinh học được sử dụng cho các phân tích về hàm lượng fructan và tinh bột và qPCR. Hai thử nghiệm độc lập được thực hiện cho phân tích thấm tách Western.

Fig.14. Đáp ứng của mức nồng độ sản phẩm phiên mã và protein của các gen *SUSIBA1, SUSIBA2* và fructan (*6-SFT)* và tinh bột (*SBEIIb*) với nồng độ sucroza. (A) Phân tích qPCR về các mức biểu hiện *SUSIBA1, SUSIBA2, 6-SFT*và *SBEIIb* tương đối đáp lại

các nồng độ sucroza (Suc). (B) Phân tích thấm tách Western về các mức nồng độ protein SUSIBA1, SUSIBA2, 6-SFT và SBEIIb đáp ứng với các nồng độ sucroza. Daf, số ngày sau khi ra hoa; ANOVA một chiều được sử dụng (các vạch sai số thể hiện s.d.). *p ≤ 0,05 và **p ≤ 0,01 được thể hiện khi các khác biệt đáng kể xuất hiện giữa các mẫu được xử lý bằng sucroza và đối chứng là 100 mM sorbitol (Sorb). Ba thử nghiệm độc lập được thực hiện cho việc cảm ứng đường và phân tích qPCR (n = 3), và hai thử nghiệm độc lập cho phân tích thấm tách Western.

Fig.15. Hàm lượng tinh bột và các mức biểu hiện trong một ngày của các gen *SUSIBA1, SUSIBA2,* và các gen chuyển hóa tinh bột và fructan trong lá tích trữ (sink) của đại mạch. (A) Phân tích qPCR về các mức biểu hiện tương đối của *SUSIBA1, SUSIBA2, SBEIIb, 6-SFT, 6-FEH* và *1-FEH* trong lá tích trữ của đại mạch. (B) Hàm lượng tinh bột và fructan trong các mẫu tương ứng. Các thời điểm thu hoạch mẫu được chỉ ra và các điều kiện sáng và tối được thể hiện bằng các ô chữ nhật đặc và rỗng với biểu tượng mặt trời và mặt trăng, tương ứng. ANOVA một chiều được sử dụng (Các vạch sai số thể hiện s.d. và *p≤ 0,05 hoặc **p≤ 0,01 so với 05:00 giờ sáng). Ba thử nghiệm độc lập được thực hiện (n = 3).

Fig.16. Nhận diện vùng 5' xa trong trình tự khởi động *SUSIBA2* mà kết nối hoạt tính ức chế SUSIBA1 với hoạt tính đáp ứng đường *SUSIBA2*. (A) Các cấu trúc có độ dài khác nhau của trình tự khởi động *SUSIBA2* và cấu trúc để biểu hiện quá mức *SUSIBA1* được sử dụng cho phương pháp agroinfiltration (phương pháp biểu hiện gen tạm thời nhờ *Agrobacterium tumefaciens*) trong phân tích hoạt tính trình tự khởi động *SUSIBA2*. (B) Hoạt tính trình tự khởi động *SUSIBA2*. Các cấu trúc được biến nạp vào vi khuẩn agrobacterium và được thâm nhập vào lá đại mạch. Lá đại mạch đã thâm nhiễm được ủ ở các nồng độ sucroza khác nhau. Huỳnh quang được kiểm tra ba ngày sau khi thâm nhập dưới kính hiển vi ở bước sóng từ 460 đến 500 nm. (C) Cường độ huỳnh quang tương đối được định lượng ba lần. Các khác biệt đáng kể giữa cấu trúc 1 và cấu trúc 1 + cấu trúc 3 và giữa cấu trúc 2 và cấu trúc 2 + cấu trúc 3 được phân tích thống kê và được chỉ ra bằng dấu hoa thị (**p ≤ 0,01 hoặc *p ≤ 0,05). ANOVA một chiều được sử dụng (Các vạch sai số thể hiện s.d.). Các vạch = 100 μm. Ba thử nghiệm độc lập được thực hiện (n = 3).

Fig.17. Hoạt tính ức chế SUSIBA1 trên trình tự khởi động *SUSIBA2* cản trở hoạt tính tự tăng cường SUSIBA2. (A, B) Tác dụng ức chế SUSIBA1 của ODN đối nghĩa gần bằng mức ngưỡng cảm ứng sucroza cho sự biểu hiện *SUSIBA2* (25 mM/40 mM) hoặc biểu

hiện quá mức/cung cấp SUSIBA1 ở các nồng độ Suc khác nhau. Các thay đổi về mức phiên mã *SUSIBA2* khi ức chế SUSIBA1 bởi asODN (A) hoặc sự biểu hiện quá mức *SUSIBA1* (B) được phân tích bằng qPCR. (C) Hoạt tính tự tăng cường của SUSIBA2 khi ức chế *SUSIBA1* bằng asODN. Các thay đổi về mức phiên mã *SUSIBA2* khi biểu hiện quá mức SUSIBA2 sau khi ức chế *SUSIBA1* bằng asODN được phân tích bằng qPCR. Các khác biệt đáng kể được chỉ ra bằng dấu hoa thị (**p ≤ 0,01) giữa *asSUSIBA1* và *sODN trong* (A), giữa *p35S:SUSIBA1* và các đối chứng vi khuẩn agrobacterium tương ứng ở các nồng độ sucroza khác nhau trong (B), và giữa AGL1 vi khuẩn agrobacterium ở 40 mM Suc và các lần xử lý tương ứng ở 40 mM Suc trong (C). ANOVA một chiều được sử dụng (Các vạch sai số thể hiện s.d.). Ba thử nghiệm độc lập được thực hiện (n = 3).

Fig.18. Sự liên kết cạnh tranh SUSIBA1/SUSIBA2 trên W-box trong trình tự khởi động *SUSIBA2* điều khiển sự biểu hiện *SUSIBA2*. (A) Trình tự oligo ngắn được chọn từ vùng đáp ứng đường 5' xa của trình tự khởi động *SUSIBA2* bao gồm W-box (được gạch chân) trong vùng này và trình tự oligo đối chứng có cùng chiều dài nhưng không có W-box bất kỳ được chọn ngẫu nhiên từ trình tự khởi động *SUSIBA2* (SEQ ID NO: 108-111). Cả hai trình tự oligo được sử dụng làm các oligonucleotit sợi kép cho thử nghiệm bẫy mồi và EMSA. Các vị trí oligo là như được chỉ ra trong trình tự khởi động *SUSIBA2*. (B) Các mức phiên mã của *SUSIBA2* được phân tích bằng qPCR sau khi đồng thâm nhập vi khuẩn agrobacterium chứa *p35S:SUSIBA1* cùng với các oligo mồi chuỗi kép ở 40 mM Suc. Các lá đã được thâm nhập được ủ ở 40 mM Suc. Hai ngày sau khi thâm nhập và ủ, phân tích qPCR được thực hiện. (C) Các mức phiên mã của *SUSIBA2* sau khi đồng thâm nhập vi khuẩn agrobacterium chứa *p35S:SUSIBA2* cùng với oligo mồi sợi kép trong khi ức chế đối nghĩa *SUSIBA1*. (D) Các mức phiên mã của *SUSIBA2* sau khi thâm nhập một mình vi khuẩn agrobacterium chứa *p35S:SUSIBA2* hoặc một mình các oligo mồi sợi kép ở 100 mM Suc. Các lá đã được thâm nhập được ủ ở 100 mM Suc trong hai ngày trước khi phân tích. Các khác biệt đáng kể được phân tích thống kê giữa *p35S:SUSIBA1* và các oligo mồi, và được chỉ ra bằng các dấu hoa thị (**p ≤ 0,01) trong (B), và giữa *p35:SUSIBA2* và các oligo mồi trong (C), và giữa *p35:SUSIBA2* và các oligo mồi trong (D). ANOVA một chiều được sử dụng (Các vạch sai số thể hiện s.d.). Ba thử nghiệm độc lập được thực hiện (n = 3). (E) Phân tích EMSA về hoạt tính cạnh tranh đối với W-box trong trình tự khởi động *SUSIBA2* giữa SUSIBA2 và SUSIBA1. Phân tích EMSA về hoạt tính cạnh tranh đối với W-box của SUSIBA2 (panen trái) và SUSIBA1 (panen giữa) và SUSIBA2 và SUSIBA1 khi cạnh tranh

(panen phải). SUSIBA2 và SUSIBA1 được biểu hiện quá mức và được tinh chế từ *E. coli* và được thử bằng hai oligo. Phân tích EMSA được thực hiện khi có mặt (+) hoặc vắng mặt (-) SUSIBA2 (0,2 μg) và SUSIBA1 (0,2 μg) hoặc khi có mặt SUSIBA2 (0,2 μg) với sự gia tăng của SUSIBA1 (0,0125, 0,025, 0,05, 0,1 và 0,2 μg) đối với thử nghiệm hoạt tính cạnh tranh. Vị trí của đoạn dò ADN tự do được chỉ ra.

Fig.19. Phân tích huỳnh quang về hoạt tính tự tăng cường SUSIBA2/*SUSIBA2* khi ức chế *SUSIBA1* bằng asODN sử dụng cấu trúc *SUSIBA2* p:GFP. (A) Cấu trúc *SUSIBA2* p:GFP được đồng thâm nhập cùng với các tổ hợp trong Fig.17C để theo dõi hoạt tính của trình tự khởi động *SUSIBA2*. Ba ngày sau khi thâm nhập, huỳnh quang được kiểm tra dưới kính hiển vi ở bước sóng 460-500 nm. (B) Cường độ huỳnh quang tương đối được định lượng. Các khác biệt đáng kể được chỉ ra bằng các dấu hoa thị (*$p \leq 0,05$) giữa AGL1 agrobacterium ở 40 mM Suc và các trường hợp xử lý tương ứng ở 40 mM Suc. ANOVA một chiều được sử dụng (Các vạch sai số thể hiện s.d.). Ba thử nghiệm độc lập được thực hiện (n = 3). Các vạch = 100 μm.

Fig.20. Phân tích huỳnh quang về vai trò của W-box trong hoạt tính ức chế SUSIBA1 đối với hoạt tính trình tự khởi động *SUSIBA2* sử dụng cấu trúc *SUSIBA2* p:*GFP*. (A) Cấu trúc *SUSIBA2* p:*GFP* được đồng thâm nhiễm cùng với các tổ hợp trong Fig.18B để theo dõi hoạt tính trình tự khởi động *SUSIBA2*. Ba ngày sau khi thâm nhập, huỳnh quang được kiểm tra dưới kính hiển vi ở bước sóng 460-500 nm. (B) Cường độ huỳnh quang tương đối được định lượng. Các khác biệt đáng kể được phân tích thống kê giữa *p35S:SUSIBA1* và các oligo mồi, và được chỉ ra bằng các dấu hoa thị (**$p \leq 0,01$). ANOVA một chiều được sử dụng (Các vạch sai số thể hiện s.d.). Ba thử nghiệm độc lập được thực hiện (n = 3). Các vạch = 100 μm.

Fig. 21. Phân tích huỳnh quang về vai trò của W-box trong hoạt tính tự tăng cường SUSIBA2/*SUSIBA2* sử dụng cấu trúc *SUSIBA2* p:*GFP* khi *SUSIBA1* bị ức chế. (A) Cấu trúc *SUSIBA2* p:*GFP* được đồng thâm nhiễm cùng với các tổ hợp trong Fig. 18C để theo dõi hoạt tính trình tự khởi động *SUSIBA2*. Ba ngày sau khi thâm nhập, huỳnh quang được kiểm tra dưới kính hiển vi ở bước sóng 460-500 nm. (B) Cường độ huỳnh quang tương đối được định lượng. Các khác biệt đáng kể được phân tích thống kê giữa *p35S:SUSIBA2* và các oligo mồi, và được chỉ ra bằng các dấu hoa thị (**$p \leq 0,01$). ANOVA một chiều được sử dụng (Các vạch sai số thể hiện s.d.). Ba thử nghiệm độc lập được thực hiện (n = 3). Các vạch = 100 μm.

Fig. 22. Phân tích hoạt tính trình tự khởi động *SUSIBA1*. (A) Các cấu trúc có độ dài khác nhau của trình tự khởi động *SUSIBA1* để thực hiện phương pháp agroinfiltration trong phân tích hoạt tính trình tự khởi động *SUSIBA1*. (B) Hoạt tính trình tự khởi động *SUSIBA1*. Các cấu trúc được biến nạp vào vi khuẩn agrobacterium và được thâm nhập vào lá đại mạch. Lá đại mạch đã thâm nhiễm được ủ ở các nồng độ sucroza khác nhau. Huỳnh quang được kiểm tra ba ngày sau khi thâm nhập dưới kính hiển vi ở bước sóng từ 460 đến 500 nm. (C) Cường độ huỳnh quang tương đối được định lượng ba lần . Các khác biệt đáng kể giữa cấu trúc 1 và cấu trúc 3 và giữa cấu trúc 2 và cấu trúc 3 được phân tích thống kê và được chỉ ra bằng dấu hoa thị (**$p \leq 0,01$). ANOVA một chiều được sử dụng (Các vạch sai số thể hiện s.d.). Ba thử nghiệm độc lập được thực hiện (n = 3). Các vạch = 100 µm .

Fig. 23. Nhận diện trình tự *cis* đáp ứng đường và hoạt tính *trans* tương ứng trên trình tự khởi động *SUSIBA1*. (A) Chiến lực nhận diện các trình tự *cis* đáp ứng đường và hoạt tính *trans* tiềm năng. Vùng đáp ứng đường đã nhận diện trong trình tự khởi động *SUSIBA1* được sử dụng để thiết kế 6 trình tự oligo mồi. Một đoạn ADN (Đoạn 1) bao gồm các mồi 1-3 và đoạn ADN đối chứng (Đoạn 2) bao gồm vùng không đáp ứng đường được tạo ra bằng enzym giới hạn, Xbal và BstXI để phân tích. (B) Các trình tự đơn lẻ của 6 oligo mồi (SEQ ID NO: 80-91). (C) Các mức phiên mã của *SUSIBA1* sau khi thâm nhập với các oligo mồi khác nhau và ủ ở các nồng độ sucroza khác nhau. (D) Phân tích EMSA dịch chiết protein nhân từ lá đã xử lý ở các nồng độ đường khác nhau. Các đoạn 1 và 2 (panen trái) và các oligo mồi 2 và 3 (panen phải) được sử dụng trong phân tích EMSA. Phân tích EMSA được thực hiện khi vắng mặt (-) hoặc có mặt (+) các dịch chiết protein nhân. Vị trí của đoạn dò tự do được chỉ ra. Hoạt tính liên kết được thể hiện bằng sự dịch chuyển dải được chỉ ra bằng các mũi tên. Các khác biệt đáng kể được chỉ ra bằng các dấu hoa thị (**$p < 0,01$) giữa các oligo mồi và H2O, 50 mM Suc hoặc 100 mM Suc trong (C). ANOVA một chiều được sử dụng (Các vạch sai số thể hiện s.d.). Ba thử nghiệm độc lập được thực hiện để bẫy oligo mồi và cho phân tích qPCR (n = 3).

Fig. 24. Phân tích huỳnh quang về các tác động của các oligo mồi 2, 3 và 6 đối với hoạt tính đáp ứng đường *SUSIBA1* sử dụng cấu trúc *SUSIBA1* p:*GFP*. (A-C) Cấu trúc *SUSIBA1* p:GFP được đồng thâm nhập cùng với các oligo mồi 2, 3 và 6 như trong Fig.23C để theo dõi hoạt tính trình tự khởi động *SUSIBA1*. Các lá đã thâm nhập được ủ ở các nồng độ Suc khác nhau. Ba ngày sau khi thâm nhập và ủ, huỳnh quang được kiểm tra dưới kính hiển vi ở bước sóng 460-500 nm. (D) Cường độ huỳnh quang tương đối được định lượng.

Các khác biệt đáng kể được phân tích thống kê và được chỉ ra bằng các dấu hoa thị (**p ≤ 0,01) cho *SUSIBA1* p:*GFP,* mồi 2 và mồi 6 so với mồi 3. ANOVA một chiều được sử dụng (Các vạch sai số thể hiện s.d.). Các vạch = 100 μm.

Fig. 25. Phân tích các trình tự khởi động *SUSIBA1* và hoạt tính *trans* đã được xác định giữa các giống cho hàm lượng fructan cao (giống 155) và thấp (giống 181). (A) Thể hiện bằng sơ đồ hai trình tự khởi động *SUSIBA1* đã được giải trình tự được phân lập bằng PCR từ các giống đại mạch 155 (giống cho hàm lượng fructan cao) và 181 (giống cho hàm lượng fructan thấp). (B) Một đoạn (Đoạn 1; cũng xem Fig.23A) từ vùng đáp ứng đường chứa trình tự *cis* đáp ứng đường đã được nhận diện và đoạn đối chứng (Đoạn 2; xem Fig.23A) được sử dụng cho phân tích EMSA. (C) Phân tích EMSA dịch chiết protein nhân được phân lập từ các hạt giống 9 ngày sau khi ra hoa của hai giống này. Phân tích EMSA được thực hiện khi vắng mặt (-) hoặc có mặt (+) các dịch chiết protein nhân. Vị trí của đoạn dò tự do được chỉ ra. Hoạt tính liên kết được thể hiện bằng sự dịch chuyển dải được chỉ ra bằng mũi tên.

Fig.26. Hệ thống liên kết yếu tố phiên mã cạnh tranh cảm biến đường điều khiển sự tổng hợp fructan và tinh bột phối hợp ở đại mạch. Bộ đôi chất hoạt hóa-chất ức chế đáp ứng đường SUSIBA2-SUSIBA1 TF điều hòa tinh bột và fructan phối hợp ở đại mạch nhờ sự truyền tín hiệu sucroza/glucoza/fructoza (Suc/Glc/Fru). Khi mức đường là thấp (A), phức hợp/yếu tố phiên mã đã huy động (hình quả bóng với dấu hỏi chấm) liên kết với trình tự đáp ứng đường trong trình tự khởi động *SUSIBA1* và hoạt hóa sự biểu hiện *SUSIBA1*. Sự biểu hiện cao của *SUSIBA1* gây ra mức nồng độ cao của SUSIBA1 mà liên kết với W-box trong trình tự khởi động *SUSIBA2* ngăn cản sự liên kết của SUSIBA2, và với các yếu tố *cis* trong trình tự khởi động gen fructan (như trình tự khởi động *6-SFT*), và ức chế sự biểu hiện của *SUSIBA2* và các gen fructan, và kết quả là, sự tổng hợp và hàm lượng của tinh bột và fructan thấp ở mức nồng độ đường thấp. Khi tăng lượng đường đến mức cao (B), mức nồng độ phức hợp/yếu tố phiên mã giảm và cuối cùng tiến đến 0 khi đường tiếp tục tăng. Khi không có sự liên kết của phức hợp/yếu tố phiên mã với trình tự đáp ứng đường trong trình tự khởi động *SUSIBA1*, sự biểu hiện của *SUSIBA1* là thấp. Sự biểu hiện thấp của *SUSIBA1* dẫn đến sự biểu hiện cao của các gen fructan và sự tăng lũy tiến sự biểu hiện *SUSIBA2*. SUSIBA2 liên kết với W-box trong trình tự khởi động của chính nó và làm tăng sự biểu hiện của chính nó. SUSIBA2 liên kết với W-box nhiều hơn và sản phẩm phiên mã *SUSIBA2* được tạo ra nhiều hơn. Sự tự điều hòa dương này sẽ dẫn đến sự biểu hiện cao của

SUSIBA2 và sự tổng hợp tinh bột cao. Do đó, ở mức đường cao, sự tổng hợp và hàm lượng tinh bột và fructan cao được tạo ra.

Fig. 27. Phân tích số liệu phát sinh loài của các intron thứ hai *SUSIBA2* (các phần chính của trình tự khởi động *SUSIBA1*) từ ba loài cây trồng, đại mạch, lúa mì và lúa. Các trình tự intron thứ hai của *SUSIBA2* đại mạch (số truy cập Ngân hàng Gen AC269483 hoặc KT290559), trình tự tương đồng (orthologue) *SUSIBA2* lúa mì (*TaSUSIBA2*, khung TGACv1_scaffold_114535_2AS: 19,457-27,625 ở http://ensembl.gramene.org/) và trình tự tương đồng *SUSIBA2* lúa (*OsSUSIBA2*, số truy cập Ngân hàng Gen AP014963.1) được sử dụng để phân tích bằng chương trình DNASTAR Lasergene phiên bản 12.

Fig. 28. Fig này so sánh các trình tự nucleotit của exon 2 (SEQ ID NO: 98) của gen *SUSIBA2* ở đại mạch và exon 2 (SEQ ID NO: 101) của gen giống SUSIBA2 ở cây lúa.

Fig. 29. Fig này so sánh các trình tự nucleotit của exon 3 (SEQ ID NO: 99) của gen *SUSIBA2* ở đại mạch và exon 3 (SEQ ID NO: 102) của gen giống SUSIBA2 ở cây lúa.

Fig. 30. Fig này so sánh các trình tự nucleotit của intron 2 (SEQ ID NO: 100) của gen *SUSIBA2* ở đại mạch và intron 2 (SEQ ID NO: 103) của gen giống SUSIBA2 ở cây lúa.

Fig. 31. Bông lúa đại mạch dài liên quan đến mức SUSIBA2 cao và bông ngắn liên quan đến SUSIBA1 cao. Fig này minh họa các bông lúa đại mạch loại ngắn (A) và loại dài (B) ở các cây con của đại mạch lai thuộc giống SLU7 (155) và KVL1113 (199).

Fig. 32. Mức biểu hiện tương đối của SUSIBA1 và SUSIBA2 ở bông lúa đang phát triển ngắn (trái) và dài (phải) ở thời điểm 2 ngày trước khi ra hoa. Các khác biệt thống kê giữa bông lúa ngắn và dài được chỉ ra bằng ** ($P < 0,01$).

Fig. 33. Hàm lượng fructan từng cây ở các cây con F_2. Các số lượng khác nhau (đến 30 hạt) của các hạt dòng con được sử dụng cho phân tích hàm lượng fructan. Năm hoặc sáu hạt dòng bố mẹ từ 155,199, 224 và 235 được sử dụng làm đối chứng. Hàm lượng fructan từng hạt thay đổi nhiều ở các hạt dòng con này. Hàm lượng fructan cao nhất trên 10% mỗi khối lượng khô (DW) được ghi lại cho ♀199x♂ 235-cây 27 và gần 10% đối với ♀224x♂155-cây 27, ♀224x♂199-cây 6, và ♀224x♂199-cây 27. Các tính trạng kiểu hình về hạt tròn và hạt dẹt ở các cây con đi kèm theo hàm lượng fructan thấp và cao được quan sát thấy một cách sơ bộ.

Fig.34. Hàm lượng fructan ở các cây con F_4 đồng hợp tử ♀224x♂155 không có vỏ (trần) và ♀224x♂199 không có vỏ (hai dòng fructan cao nhất trong phòng khí hậu thực

vật). Hàm lượng fructan cao nhất (trên 13%) có liên quan đến dòng ♀224x♂155 không có vỏ trong các điều kiện phòng khí hậu thực vật.

Fig.35. Các tính trạng kiểu hình về độ cao của cây, số bông lúa trên mỗi cây, số hạt trên mỗi cây và khối lượng của một nghìn hạt ở các cây bố mẹ và cây con F_2.

Fig.36. Hàm lượng trung bình của fructan và beta-glucan hạt ở hạt tròn và hạt dẹt của các cây con F_2. A. Tính trạng kiểu hình của các hạt dòng cha mẹ, hạt dòng con tròn (R) và hạt dòng con dẹt (F). B. Hàm lượng fructan trung bình trong hạt tròn và hạt dẹt của các cây con F_2. C. Hàm lượng beta-glucan trung bình trong hạt tròn và hạt dẹt của các cây con F_2. Hàm lượng fructan và beta-glucan cao có liên quan đến các tính trạng hạt dẹt và mối liên quan chặt chẽ giữa hàm lượng fructan và beta-glucan được quan sát thấy ở tất cả các cây con.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án của sáng chế đề cập chung đến các nguyên liệu thực vật, và cụ thể là đến nguyên liệu thực vật có khả năng sản xuất hydrat cacbon kiểm soát được.

Nguyên liệu thực vật theo các phương án này có thể được thiết kế để có khả năng sản xuất hydrat cacbon kiểm soát được, và cụ thể là được thiết kế để sản sinh ra các hydrat cacbon ở mức cao hoặc gia tăng so với nguyên liệu thực vật kiểu dại.

Đường là các chất mang năng lượng chính trong quá trình chuyển năng lượng mặt trời thành năng lượng hóa học thiết yếu cho sự sống trên Trái đất nhờ quá trình quang hợp. Ở thực vật bậc cao, đường không chỉ là nguyên liệu cơ chất cơ bản để tổng hợp sinh khối , mà còn là các phân tử truyền tín hiệu cho nhiều con đường chuyển hóa. Quá trình tổng hợp hydrat cacbon thường được gây ra bởi các đường. Tùy theo mức nồng độ đường và sự sẵn có của đường, các thực vật bậc cao sử dụng các chiến lược khác nhau để tổng hợp các hydrat cacbon khác nhau trong việc dự trữ năng lượng để cung cấp năng lượng ngay, nghĩa là trong vòng vài phút, trung hạn, nghĩa là trong vòng vài giờ, và dài hạn, nghĩa là, trong vòng vài ngày đến vài năm để đáp ứng các nhu cầu năng lượng của sự sinh trưởng, phát triển và sinh sản.

Fructan, tinh bột chuyển tiếp và tinh bột dự trữ là các ví dụ về các hydrat cacbon liên quan đến các dạng cung cấp năng lượng khác nhau. Chúng được tạo ra ở một số lượng lớn các thực vật có hoa bao gồm *Gramineae* ôn đới như đại mạch, lúa mì, yến mạch, và nhiều loại cỏ nuôi gia súc.

Sự tổng hợp fructan, polyme fructoza, và tinh bột, polyme glucoza, thường được gây ra bởi đường. Tuy nhiên, cách các thực vật cảm nhận các mức đường và điều hòa sự tổng hợp các hydrat cacbon khác nhau, như tổng hợp fructan và/hoặc tinh bột, vẫn chưa được biết rộng rãi.

Như được chỉ ra ở đây, sự tổng hợp fructan và tinh bột được điều hòa tốt bởi các mức đường ở đại mạch. Sự tổng hợp hydrat cacbon gây ra bởi đường này được kiểm soát chặt chẽ bởi hệ gen phức tạp sử dụng hai trình tự khởi động luân phiên để tạo ra hai yếu tố phiên mã có trình tự trùng nhau nhưng đối lập về chức năng, yếu tố truyền tín hiệu đường ở đại mạch 1 (SUSIBA1) và SUSIBA2, để cảm biến các mức đường và điều hòa sự tổng hợp fructan và tinh bột.

Số liệu thử nghiệm được trình bày ở đây chỉ ra rằng SUSIBA1 có hoạt tính âm hoặc ức chế, trong khi SUSIBA2 có tác dụng dương hoặc tác dụng cảm ứng. Sự biểu hiện đáp ứng đường của hai gen yếu tố phiên mã (TF) này, có trình tự tương đồng nhưng độ dài khác nhau ở đầu 5' từ hai trình tự khởi động luân phiên, trình tự khởi động *SUSIBA1* (*SUSIBA1* p) và trình tự khởi động *SUSIBA2* (*SUSIBA2* p), tạo ra hệ thống cảm biến đường, đối lập, hoặc âm-dương mà kiểm soát sự tổng hợp không gian thời gian của fructan và tinh bột ở đại mạch.

SUSIBA1 p là, như được chỉ ra thêm ở đây, trình tự khởi động bên trong nằm trong gen *SUSIBA2* trong bộ gen thực vật mà gây ra sự biểu hiện của protein, SUSIBA1, với các chức năng khác biệt với các chức năng của sản phẩm, SUSIBA2, được mã hóa bởi gen neo *SUSIBA2.*

Ở trung tâm của hệ thống âm-dương, liên kết cạnh tranh của SUSIBA1 và SUSIBA2 TF với các W-box trong vùng đáp ứng đường của *SUSIBA2* p đóng vai trò là cơ chế làm thích ứng trong mà thể hiện sự điều hòa tự động hoạt tính *SUSIBA1* và *SUSIBA2*. *SUSIBA1* p chứa vùng hoạt hóa đáp ứng đường, mà yếu tố hoạt hóa *trans* liên kết vào ở mức đường thấp, xem Fig.26A. Sự liên kết này của phức hợp hoặc yếu tố hoạt hóa *trans* và cảm ứng sự biểu hiện *SUSIBA1*. Sự biểu hiện cao của *SUSIBA1* gây ra mức nồng độ cao của SUSIBA1 mà liên kết với các W-box trong *SUSIBA2* p cạnh tranh với SUSIBA2. Điều này ngăn cản hữu hiệu sự biểu hiện của *SUSIBA2.* Khi mức đường gia tăng, mức nồng độ phức hợp hoặc yếu tố hoạt hóa *trans* bị giảm đi. Khi không có sự liên kết phức hợp hoặc yếu tố hoạt hóa *trans* với vùng hoạt hóa đáp ứng đường ở *SUSIBA1* p, sự biểu hiện của *SUSIBA1* là thấp, xem Fig.26B. Sự biểu hiện thấp của *SUSIBA1* dẫn đến SUSIBA2 cạnh tranh để

liên kết vào các W-box trong *SUSIBA2* p và do đó biểu hiện cao *SUSIBA2*. SUSIBA2 liên kết với các W-box trong trình tự khởi động của chính nó và do đó tăng cường sự biểu hiện của chính nó.

Ở đại mạch, SUSIBA1 cũng liên kết với các yếu tố *cis*, như yếu tố đáp ứng đường (SURE), W-box và/hoặc yếu tố SP8, trong trình tự khởi động gen fructan, như trình tự khởi động sucroza:fructan-6-fructosyltransferaza (*6-SFT*), trình tự khởi động sucroza:sucroza 1-fructosyltransferaza *(1-SST)*, và ngăn cản sự biểu hiện của các gen fructan, nghĩa là, SUSIBA1 là tác nhân ức chế sự tổng hợp fructan ở đại mạch. Kết quả là, ở các mức đường thấp (Fig. 26A), sự tổng hợp và hàm lượng của fructan và cả tinh bột là thấp.

SUSIBA2 hoạt động tương ứng như là tác nhân hoạt hóa sự tổng hợp tinh bột và liên kết với các yếu tố *cis*, như yếu tố đáp ứng đường (SURE), trong trình tự khởi động gen tinh bột, như trình tự khởi động isoamylaza đại mạch (*ISO1*) và trình tự khởi động enzym tạo nhánh tinh bột II (*SBEII)*. Kết quả là, ở các mức đường cao (Fig.26B), sự tổng hợp và hàm lượng của tinh bột và cả fructan là cao.

Điều này có nghĩa là để cung cấp nguyên liệu thực vật đại mạch có khả năng sản xuất tinh bột cao hoặc khả năng sản xuất tinh bột và fructan cao, nguyên liệu thực vật này nên có mức đường cao và/hoặc thiếu sự biểu hiện *SUSIBA1* hoặc sự biểu hiện *SUSIBA1* bị câm.

Các dạng tương ứng của gen *SUSIBA2* có mặt ở các thực vật không phải đại mạch, ví dụ lúa (gen giống *OsSUSIBA2*), lúa mì (gen giống *TaSUSIBA2*), yến mạch (gen giống *AsSUSIBA2*), ngô (gen giống *ZmSUSIBA2*), lúa mạch đen (gen giống *ScSUSIBA2*), *Brachypodium* và các loài cây thân cỏ khác. Sau đây, các dạng tương ứng này của *SUSIBA2* thể hiện gen giống SUSIBA2 mã hóa yếu tố phiên mã giống SUSIBA2. Trình tự nucleotit mã hóa yếu tố phiên mã giống SUSIBA2, như gen giống SUSIBA2, chịu sự kiểm soát phiên mã của trình tự khởi động, thường là trình tự khởi động giống SUSIBA2 (p giống SUSIBA2) ở đây. Trình tự nucleotit mã hóa protein giống SUSIBA2 bao gồm trình tự khởi động của trình tự nucleotit mã hóa yếu tố phiên mã giống SUSIBA1, là SUSIBA1-like p ở đây. SUSIBA1-like p tốt hơn, có mặt ít nhất một phần trong intron của gen giống SUSIBA2. Trong một phương án cụ thể, SUSIBA1-like p là trình tự khởi động intron/exon, nghĩa là, có mặt ít nhất một phần trong intron và có mặt ít nhất một phần trong exon của gen giống SUSIBA2. SUSIBA1-like p điều khiển sự phiên mã của trình tự nucleotit mã hóa yếu tố phiên mã giống SUSIBA1, như gen giống *SUSIBA1*.

Trong một phương án, gen giống SUSIBA2 tốt hơn là có sự tương đồng trình tự với gen *SUSIBA2* của đại mạch (*Hordeum vulgare)* (*HvSUSIBA2*), về trình tự mã hóa, nghĩa là, các exon, của gen này, ít nhất là 50%, tốt hơn, nếu ít nhất là 60% và tốt hơn nữa, ít nhất là 70%, như ít nhất là 75% hoặc ít nhất là 80%.

Ngoài ra, hoặc thêm vào đó, gen giống *SUSIBA1* tốt hơn là có sự tương đồng trình tự với gen *SUSIBA1* của đại mạch (*HvSUSIBA1*), về trình tự mã hóa, ít nhất là 50%, tốt hơn, nếu ít nhất là 60% và tốt hơn nữa, nếu ít nhất là 70%, như ít nhất là 75% hoặc ít nhất là 80%.

Trình tự một phần bộ gen *SUSIBA2* của đại mạch được lưu trữ trong Ngân hàng Gen với số truy cập KT290559 và KT290560 và trình tự một phần bộ gen giống SUSIBA2 của lúa được nhận diện trong Ngân hàng Gen với số truy cập AP014963.1.

Sự sắp xếp thẳng hàng trình tự của exon 2 và exon 3 của *SUSIBA2* ở đại mạch (*HvSUSIBA2*) và giống SUSIBA2 ở lúa (giống *OsSUSIBA2*) được trình bày trong các Fig. 28 và 29. Phần exon của *HvSUSIBA1* p kéo dài từ nucleotit số 1 đến nucleotit số 378 ở exon 3 của *HvSUSIBA2.* Tương ứng, phần exon của OsSUSIBA1-like p kéo dài từ nucleotit số 1 đến nucleotit số 381 ở exon 3 của gen giống *OsSUSIBA2.*

Fig.30 thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng trình tự của intron 2 của *HvSUSIBA2* và các gen giống *OsSUSIBA2*. Intron 2 của *HvSUSIBA2* chứa phần intron của *HvSUSIBA1* p với vùng ức chế đường được theo sau bởi vùng hoạt hóa. Intron 2 của gen giống *OsSUSIBA2* tương ứng chứa phần intron của *OsSUSIBA1* p với vùng ức chế đường được theo sau bởi vùng hoạt hóa. Vùng ức chế đường của *OsSUSIBA1* p dài hơn so với vùng ức chế đường của *HvSUSIBA1* p hoặc vùng ức chế đường của *OsSUSIBA1* p được dẫn trước bởi trình tự nucleotit (nucleotit số 1 đến 409 trong Fig.30) mà vắng mặt và không có sự tương ứng bất kỳ trong intron 2 của *HvSUSIBA2.*

Exon 1 của *HvSUSIBA2* và gen giống *OsSUSIBA2* có sự tương đồng trình tự là 85% như được xác định bởi phần mềm web Clustal Omega. Các giá trị tương đồng trình tự tương ứng đối với exon 2 và exon 3 của *HvSUSIBA2* và gen giống *OsSUSIBA2* lần lượt là 80% và 81%.

Sự tương đồng trình tự của vùng hoạt hóa và vùng ức chế đường của *HvSUSIBA1* p và OsSUSIBA1-like p lần lượt là 52% và 50%.

Yếu tố phiên mã HvSUSIBA2 có trình tự axit amin sau đây (SEQ ID NO: 104):

MSPARLPISRESCLTIPAGFSPSALLDSPVLLTNFKVEPSPTTGSLGMAAILHKSAHPDMLP
SPRDKSVRNAHEDRGSRDFEFKPHLNSSSQSLAPAMSDLKKHEHSMQNQSMNPSSSSSNMVN
ENRPPCSRESSLTVNVSAQNQPVGMVGLTDSMPAEVGTSEPQQMNSSDNAMQEPQSENVADK
SADDGYNWRKYGQKHVKGSENPRSYYKCTHPNCEVKKLLERAVDGLITEVVYKGRHNHPKPQ
PNRRLAGGAVPSNQGEERYDGASAADDKSSNALSNLANPVHSPGMVEPVPASVSDDDIDAGG
GRPYPGDDATEEEDLESKRRKMESAGIDAALMGKPNREPRVVVQTVSEVDILDDGYRWRKYG
QKVVKGNPNPRSYYKCTSTGCPVRKHVERASHDPKSVITTYEGKHNHEVPAARNATHEMSAP
PMKNVVHQINSNMPSSIGGMMRACEARNYTNQYSQAAETDTVSLDLGVGISPNHSDATNQMQ
SSGPDQMQYQMQTMGSMYGNMRHPSSMAAPAVQGNSAARMYGSREEKGNEGFTFRATPMDHS
ANLCYSSAGNLVMGP

Yếu tố phiên mã giống OsSUSIBA2 có trình tự axit amin sau đây (SEQ ID NO: 105):

MADSPNPSSGDHPAGVGGSPEKQPPVDRRVAALAAGAAGAGARYKAMSPARLPISREPCLTI
PAGFSPSALLESPVLLTNFKVEPSPTTGTLSMAAIMNKSANPDILPSPRDKTSGSTHEDGGS
RDFEFKPHLNSSSQSTASAINDPKKHETSMKMESLNTALSSDDMMIDNIPLCSRESTLAVNI
SSAPSQLVGMVGLTDSSPAEVGTSELHQMNSSGNAMQESQPESVAEKSAEDGYNWRKYGQKH
VKGSENPRSYYKCTHPNCDVKKLLERSLDGQITEVVYKGRHNHPKPQPNRRLSAGAVPPIQG
EERYDGVATTDDKSSNVLSILGNAVHTAGMIEPVPGSASDDDNDAGGGRPYPGDDAVEDDDL
ESKRRKMESAAIDAALMGKPNREPRVVVQTVSEVDILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYYK
CTNTGCPVRKHVERASHDPKSVITTYEGKHNHEVPASRNASHEMSTPPMKPVVHPINSNMQG
LGGMMRACEPRTFPNQYSQAAESDTISLDLGVGISPNHSDATNQLQSSVSDQMQYQMQPMGS
VYSNMGLPAMAMPTMAGNAASNIYGSREEKPSEGFTFKATPMDHSANLCYSTAGNLVMGP

Sự sắp xếp thẳng hàng trình tự của yếu tố phiên mã HvSUSIBA2 và yếu tố phiên mã giống OsSUSIBA2 được thể hiện dưới đây:

```
1   ------------------------------------------------------------MSPA     4
                                                                 ||||
1   MADSPNPSSGDHPAGVGGSPEKQPPVDRRVAALAAGAAGAGARYKAMSPA    50

3    RLPISRESCLTIPAGFSPSALLDSPVLLTNFKVEPSPTTGSLGMAAILHK    54
     ||||||||.||||||||||||||||:||||||||||||||||:|.||||::|
51   RLPISREPCLTIPAGFSPSALLESPVLLTNFKVEPSPTTGTLSMAAIMNK   100

55    SAHPDMLPSPRDKSVRNAHEDRGSRDFEFKPHLNSSSQSLAPAMSDLKKH   104
      ||:||:||||||||:..:.|||.||||||||||||||||||.|.|::|.|||
101   SANPDILPSPRDKTSGSTHEDGGSRDFEFKPHLNSSSQSTASAINDPKKH   150

105   EHSMQNQSMNPSSSSSNMVNENRPPCSRESSLTVNV-SAQNQPVGMVGLT   153
      |.||:|:|:|.:.||.:|:.:|.|.||||||:|.||: ||.:|.||||||
151   ETSMKNESLNTALSSDDMMIDNIPLCSRESTLAVNISSAPSQLVGMVGLT   200

154   DSMPAEVGTSEPQQMNSSDNAMQEPQSENVADKSADDGYNWRKYGQKHVK   203
      ||.||||||||..||||.||||.|.|:||:|||:||||||||||||||||
201   DSSPAEVGTSELHQMNSSGNAMQESQPESVAEKSAEDGYNWRKYGQKHVK   250

204   GSENPRSYYKCTHPNCEVKKLLERAVDGLITEVVYKGRHNHPKPQPNRPL   253
      ||||||||||||||||:||||||||::||.||||||||||||||||||||
251   GSENPRSYYKCTHPNCDVKKLLERSLDGQITEVVYKGRHNHPKPQPNRPL   300

254   AGGAVPSNQGEERYDGASAADDKSSNALSNLANPVHSPGMVEPVPASVSD   303
      :.||||..||||||||.:..||||||.||.|.|.||:.||:||||.|.||
301   SAGAVPPIQGEERYDGVATTDDKSSNVLSILGNAVHTAGMIEPVPGSASD   350

304   DDIDAGGGRPYPGDDATEEEDLESKRRKMESAGIDAALMGKPNREPRVVV   353
      ||.||||||||||||||.|::||||||||||||.||||||||||||||||
351   DDNDAGGGRPYPGDDAVEDDDLESKRRKMESAAIDAALMGKPNREPRVVV   400

354   QTVSEVDILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYYKCTSTGCPVRKHVERAS   403
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||:||||||||||||
401   QTVSEVDILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYYKCTNTGCPVRKHVERAS   450

404   HDPKSVITTYEGKHNHEVPAARNATHEMSAPPMKNVVHQINSNMPSSIGG   453
      ||||||||||||||||||||:|||:||||.||||.|||.||||| ..:||
451   HDPKSVITTYEGKHNHEVPASRNASHEMSTPPMKPVVHPINSNM-QGLGG   499

454   MMRACEARNYTNQYSQAAETDTVSLDLGVGISPNHSDATNQMQSSGPDQM   503
      ||||||.|.:.||||||||:||:||||||||||||||||||||:|||..|||
500   MMRACEPRTFPNQYSQAAESDTISLDLGVGISPNHSDATNQLQSSVSDQM   549

504   QYQMQTMGSMYGNMRHPSSMAAPAVQGNSAARMYGSPEEKGNEGFTFRAT   553
      |||||.|||:|.||..| :||.|.:.|:|:.:||||||.:||||||:||
550   QYQMQPMGSVYSNMGLP-AMAMPTMAGNAASNIYGSREEKPSEGFTFKAT   598

554   PMDHSANLCYSSAGNLVMGP     573
      ||||||||||||:||||||||

599   PMDHSANLCYSTAGNLVMGP     618
```

Yếu tố phiên mã HvSUSIBA1 có trình tự axit amin sau đây (SEQ ID NO: 106):

MVEPVPASVSDDDIDAGGGRPYPGDDATEEEDLESKRRKMESAGIDAALMGKPNREPRVVVQ
TVSEVDILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYYKCTSTGCPVRKHVERASHDPKSVITTYEGK
HNHEVPAARNATHEMSAPPMKNVVHQINSNMPSSIGGMMRACEARNYTNQYSQAAETDTVSL
DLGVGISPNHSDATNQMQSSGPDQMQYQMQTMGSMYGNMRHPSSMAAPAVQGNSAARMYGSR
EEKGNEGFTFRATPMDHSANLCYSSAGNLVMGP

Yếu tố phiên mã giống OsSUSIBA1 có trình tự axit amin sau đây (SEQ ID NO: 107):

MIEPVPGSASDDDNDAGGGRPYPGDDAVEDDDLESKRRKMESAAIDAALMGKPNREPRVVVQ
TVSEVDILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYYKCTNTGCPVRKHVERASHDPKSVITTYEGK
HNHEVPASRNASHEMSTPPMKPVVHPINSNMQGLGGMMRACEPRTFPNQYSQAAESDTISLD
LGVGISPNHSDATNQLQSSVSDQMQYQMQPMGSVYSNMGLPAMAMPTMAGNAASNIYGSREE
KPSEGFTFKATPMDHSANLCYSTAGNLVMGP

Sự sắp xếp thẳng hàng trình tự của yếu tố phiên mã HvSUSIBA1 và yếu tố phiên mã giống OsSUSIBA1 được thể hiện dưới đây:

```
1   MVEPVPASVSDDDIDAGGGRPYPGDDATEEEDLESKRRKMESAGIDAALM     50
    |:||||.|.||||.||||||||||||||.|::||||||||||||.||||||
1   MIEPVPGSASDDDNDAGGGRPYPGDDAVEDDDLESKRRKMESAAIDAALM     50

51  GKPNREPRVVVQTVSEVDILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYYKCTSTG     100
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||:||
51  GKPNREPRVVVQTVSEVDILDDGYRWRKYGQKVVKGNPNPRSYYKCTNTG     100

101 CPVRKHVERASHDPKSVITTYEGKHNHEVPAARNATHEMSAPPMKNVVHQ     150
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||:|||:||||.||||.|||.
101 CPVRKHVERASHDPKSVITTYEGKHNHEVPASRNASHEMSTPPMKPVVHP     150

151 INSNMPSSIGGMMRACEARNYTNQYSQAAETDTVSLDLGVGISPNHSDAT     200
    ||||| ..:||||||||.|.:.|||||||||:|||:||||||||||||||
151 INSNM-QGLGGMMRACEPRTFPNQYSQAAESDTISLDLGVGISPNHSDAT     199

201 NQMQSSGPDQMQYQMQTMGSMYGNMRHPSSMAAPAVQGNSAARMYGSREE     250
    ||:|||..||||||||.||||:|.||..| :||.|.:.||:|:.:||||||
200 NQLQSSVSDQMQYQMQPMGSVYSNMGLP-AMAMPTMAGNAASNIYGSREE     248

251 KGNEGFTFRATPMDHSANLCYSSAGNLVMGP     281
    |.:|||||:||||||||||||||:||||||||
249 KPSEGFTFKATPMDHSANLCYSTAGNLVMGP     279
```

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ trình tự nucleotit hoặc trình tự axit nucleic đề cập đến polyme hoặc trình tự nucleotit từ đầu 5' đến đầu 3' của phân tử axit nucleic và bao gồm các phân tử ADN hoặc ARN, bao gồm cADN, đoạn hoặc phần ADN, ADN bộ gen, ADN tổng hợp, ví dụ, được tổng hợp hóa học, ADN plasmit, mARN, và ARN đối nghĩa, bất kỳ trong số chúng có thể là sợi đơn hoặc sợi kép.

Trình tự khởi động là trình tự nucleotit điều khiển hoặc kiểm soát sự phiên mã của trình tự nucleotit, nghĩa là, trình tự mã hóa, mà được liên kết điều khiển với trình tự khởi động này. Trình tự mã hóa này có thể mã hóa polypeptit và/hoặc ARN chức năng. Thông thường, trình tự khởi động đề cập đến trình tự nucleotit chứa vị trí liên kết cho ARN polymeraza II và điều khiển sự khởi đầu phiên mã. Nói chung, các trình tự khởi động được tìm thấy ở đầu 5', hoặc ngược dòng, so với vị trí khởi đầu của vùng mã hóa của trình tự mã hóa tương ứng. Vùng trình tự khởi động có thể chứa các yếu tố khác mà hoạt động như các tác nhân điều hòa sự biểu hiện gen. Các trình tự khởi động có thể bao gồm, ví dụ, trình tự khởi động cơ định, cảm ứng được, được điều hòa theo thời gian, được điều hòa theo sự phát triển, được điều hòa bằng hóa học, được ưu tiên mô và/hoặc đặc hiệu mô.

Được liên kết điều khiển hoặc kết hợp điều khiển như được sử dụng ở đây có nghĩa là các dấu hiệu đã chỉ ra có liên quan về mặt chức năng với nhau, và cũng có liên quan về mặt vật lý chung. Do đó, thuật ngữ được liên kết điều khiển hoặc kết hợp điều khiển đề cập đến các trình tự nucleotit nằm trên một phân tử axit nucleic duy nhất được kết hợp với nhau về mặt chức năng. Do đó, trình tự nucleotit thứ nhất được liên kết điều khiển với trình tự nucleotit thứ hai, có nghĩa là trường hợp trong đó trình tự nucleotit thứ nhất được đặt trong mối quan hệ chức năng với trình tự nucleotit thứ hai. Ví dụ, trình tự khởi động được kết hợp điều khiển với trình tự nucleotit nếu trình tự khởi động này tác động lên sự phiên mã hoặc sự biểu hiện của trình tự nucleotit này, nghĩa là, trình tự nucleotit này chịu sự điều khiển phiên mã của trình tự khởi động. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ là các trình tự điều khiển, ví dụ, trình tự khởi động, không cần phải liền kề với trình tự nucleotit mà nó được liên kết điều khiển vào, miễn là các trình tự điều khiển này hoạt động để điều khiển sự biểu hiện của trình tự nucleotit này. Do đó, ví dụ, các trình tự xen kẽ chưa được dịch mã, vẫn chưa được sao chép có thể nằm giữa trình tự khởi động và trình tự nucleotit, và trình tự nucleotit này vẫn có thể được liên kết điều khiển và chịu sự điều khiển phiên mã của trình tự khởi động.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ nội sinh, khi được sử dụng đối với trình tự

nucleotit, đề cập đến trình tự nucleotit xuất hiện tự nhiên như một phần của bộ gen của nguyên liệu thực vật, mà nó có mặt trong đó. Trình tự nucleotit nội sinh đôi khi được gọi ở đây là trình tự nucleotit tự nhiên.

Trình tự nucleotit bộ gen đề cập đến trình tự nucleotit có mặt trong bộ gen của nguyên liệu thực vật, tốt hơn là trong nhiễm sắc thể của nguyên liệu thực vật.

Phiên bản kiểu dại của trình tự nucleotit bộ gen đề cập đến trình tự nucleotit bộ gen không được biến đổi xuất hiện tự nhiên trong nguyên liệu thực vật. Trình tự này được so sánh với trình tự nucleotit bộ gen đã được biến đổi, như bằng cách loại bỏ một phần của phiên bản kiểu dại của trình tự nucleotit bộ gen ra khỏi bộ gen của nguyên liệu thực vật.

Nguyên liệu thực vật, trong một phương án, là cây. Trong một phương án khác, nguyên liệu thực vật là tế bào thực vật, nghĩa là, tế bào của cây, bao gồm nhiều tế bào thực vật này. Nguyên liệu thực vật, trong một phương án khác nữa, là mô hoặc cơ quan thực vật, bao gồm nhưng không giới hạn ở, biểu bì; mô gốc; mô mạch, như mô gỗ hoặc libe; mô phân sinh, như mô phân sinh ngọn, mô phân sinh bên hoặc mô phân sinh lóng; mô vĩnh viễn, như mô vĩnh viễn đơn giản, bao gồm, ví dụ, nhu mô, mô giữa, mô cứng hoặc biểu bì, mô vĩnh viễn phức tạp, bao gồm, ví dụ, mô gỗ, libe, hoặc mô đặc biệt hoặc mô tiết. Nguyên liệu thực vật, trong một phương án khác nữa, là hạt của cây.

Sự tương đồng trình tự đề cập đến sự giống nhau về trình tự giữa hai trình tự nucleotit hoặc hai trình tự peptit hoặc protein. Sự tương đồng này đề cập đến mức độ mà hai trình tự nucleotit, peptit hoặc protein được sắp xếp thẳng hàng tối ưu là không thay đổi trong toàn bộ cửa sổ sắp xếp thẳng hàng của các nucleotit hoặc axit amin. Sự tương đồng có thể tính được dễ dàng bằng các phương pháp đã biết bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phương pháp được mô tả trong: *Computational Molecular Biology* (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, New York (1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (Smith, D. W., ed.) Academic Press, New York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I* (Griffin, A. M., và Griffin, H. G., eds.) Humana Press, New Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology* (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); và *Sequence Analysis Primer* (Gribskov, M. và Devereux, J., eds.) Stockton Press, New York (1991). Để so sánh trình tự, thông thường, một trình tự đóng vai trò là trình tự tham chiếu mà các trình tự kiểm tra sẽ được so sánh với nó. Khi sử dụng thuật toán so sánh trình tự, các trình tự kiểm tra và trình tự tham chiếu được nhập vào máy tính, các tọa độ trình tự con được chỉ định nếu cần, và các tham số chương trình thuật toán trình tự được

chỉ định. Sau đó thuật toán so sánh trình tự tính toán tỉ lệ phần trăm tương đồng trình tự cho (các) trình tự kiểm tra so với trình tự tham chiếu, dựa vào các tham số chương trình đã được chỉ định. Sự sắp xếp thẳng hàng tối ưu các trình tự để sắp xếp thẳng hàng cửa sổ so sánh đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể được thực hiện bằng các công cụ như thuật toán tương đồng cục bộ (local homology algorithm) của Smith và Waterman, thuật toán sắp xếp thẳng hàng tương đồng (homology alignment algorithm) của Needleman và Wunsch, tìm kiếm phương pháp tương đồng của Pearson và Lipman, và tùy ý bằng các phương pháp thực hiện bằng máy tính các thuật toán này như GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA sẵn có như một phần của GCG® Wisconsin Package® (Accelrys Inc., San Diego, CA). Tỉ lệ tương đồng cho các đoạn đã được sắp xếp thẳng hàng của trình tự kiểm tra và trình tự tham chiếu là số lượng nucleotit hoặc axit amin giống nhau mà chung cho hai trình tự đã được sắp xếp thẳng hàng chia cho tổng số nucleotit hoặc axit amin trong đoạn trình tự tham chiếu, nghĩa là, toàn bộ trình tự tham chiếu hoặc một phần xác định nhỏ hơn của trình tự tham chiếu. Tỉ lệ phần trăm tương đồng trình tự được thể hiện bằng tỉ lệ tương đồng nhân với 100.

Một khía cạnh của phương án này đề cập đến nguyên liệu thực vật chứa trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 dưới sự kiểm soát phiên mã của trình tự khởi động hoạt động trong nguyên liệu thực vật này. Trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 thiếu ít nhất một phần của vùng hoạt hóa của trình tự khởi động *SUSIBA1* hoặc trình tự khởi động giống *SUSIBA1* có mặt trong intron của phiên bản kiểu dại của trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2.

Do đó, theo các phương án, trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2, như gen *SUSIBA2* hoặc gen giống SUSIBA2, thiếu ít nhất một phần của vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p mà lẽ ra có mặt trong intron ở phiên bản kiểu dại của gen *SUSIBA2* hoặc gen giống SUSIBA2. Sự vắng mặt của ít nhất là một phần của vùng hoạt hóa có nghĩa là phức hợp hoặc yếu tố hoạt hóa *trans* bất kỳ không thể liên kết hiệu quả với vùng hoạt hóa và do đó không thể hoạt hóa hiệu quả *SUSIBA1 p* hoặc SUSIBA1-like p. Kết quả là, không có hoặc chỉ một lượng thấp yếu tố phiên mã SUSIBA1 hoặc giống SUSIBA1 sẽ được sản sinh trong nguyên liệu thực vật bất kể mức đường trong nguyên liệu thực vật này. Sự vắng mặt hoặc lượng thấp của yếu tố phiên mã SUSIBA1 hoặc giống SUSIBA1 trong nguyên liệu thực vật lại có nghĩa

là yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 sẽ thắng yếu tố phiên mã SUSIBA1 hoặc giống SUSIBA1 để liên kết với *SUSIBA2* p hoặc p giống SUSIBA2, và chi tiết hơn là với ít nhất một W-box trong *SUSIBA2* p hoặc p giống SUSIBA2. Điều này lại gây ra sự hoạt hóa *SUSIBA2* p hoặc p giống SUSIBA2 và sản sinh thêm yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 trong nguyên liệu thực vật này. Các mức cao của yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 và các mức thấp của yếu tố phiên mã SUSIBA1 hoặc giống SUSIBA1 ở nguyên liệu thực vật cảm ứng sự sản sinh tinh bột ở nguyên liệu thực vật hoặc cảm ứng sự sản sinh tinh bột và fructan ở nguyên liệu thực vật.

Do đó nguyên liệu thực vật theo nhiều phương án sẽ thuộc trường hợp như được minh họa trong Fig.26B bất kể mức đường trong nguyên liệu thực vật này, nghĩa là, cả ở mức đường thấp.

Sự biểu hiện gen *SUSIBA1* hoặc giống *SUSIBA1* bị ức chế và do đó các mức yếu tố phiên mã SUSIBA1 hoặc giống SUSIBA1 thấp, do thiếu hoặc không có ít nhất là một phần của vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p, gây ra sự biểu hiện tăng của gen *SUSIBA2* hoặc giống SUSIBA2 và do đó tạo ra các mức yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 cao. Yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 sẽ lại hoạt hóa các gen tham gia vào quá trình tổng hợp tinh bột trong nguyên liệu thực vật. Do đó, nếu nguyên liệu thực vật cũng có khả năng tổng hợp fructan, các mức yếu tố phiên mã SUSIBA1 hoặc giống SUSIBA1 thấp có nghĩa là yếu tố phiên mã SUSIBA1 hoặc giống SUSIBA1 sẽ không ức chế các gen tham gia vào quá trình tổng hợp fructan ở nguyên liệu thực vật.

Nguyên liệu thực vật theo các phương án này do đó sẽ là nguyên liệu thực vật tinh bột cao hoặc nguyên liệu thực vật tinh bột cao và fructan cao.

Ít nhất một phần của vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p, trong một phương án, bị xóa khỏi phiên bản kiểu dại của trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2. Kết quả của sự xóa này và do đó sự vắng mặt của ít nhất một phần của vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p, nguyên liệu thực vật chứa trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 thiếu ít nhất một phần của vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p. Do đó, trong một phương án được ưu tiên, nguyên liệu thực vật này không chứa phần bất kỳ như vậy của vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p.

Trong một phương án cụ thể, ít nhất một phần của vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p

hoặc SUSIBA1-like p bị xóa bởi đột biến mất đoạn gây ra bởi cụm đoạn lặp xuôi ngược ngắn phân cách đều (clustered regularly interspaced short palindromic repeat: CRISPR)/protein kết hợp CRISPR 9 (CRISPR/Cas9) ra khỏi phiên bản kiểu dại của trình tự bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2.

CRISPR/Cas9 là phương pháp cắt ADN mà bao gồm bước biểu hiện Cas9 endonucleaza được dẫn đường bởi ARN cùng với ARN dẫn đường dẫn nó đến trình tự cụ thể cần được sửa đổi. Khi Cas9 cắt trình tự đích, tế bào thực vật sửa lại tổn thương này bằng cách thay thế trình tự ban đầu bằng ADN tương đồng. Bằng cách đưa vào khuôn bổ sung với các tương đồng thích hợp, Cas9 có thể được sử dụng để xóa, bổ sung, hoặc biến đổi gen theo cách đơn giản chưa từng có. Do đó CRISPR/Cas9 là công nghệ hữu hiệu để xóa ít nhất là một phần của vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p khỏi phiên bản kiểu dại của trình tự bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 ở nguyên liệu thực vật.

Mặc dù đột biến mất đoạn gây ra bởi CRISPR/Cas9 ở ít nhất một phần của vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p là công nghệ tốt hơn để sản xuất nguyên liệu thực vật không có hoặc có sự biểu hiện gen *SUSIBA1* hoặc gen giống *SUSIBA1* bị ức chế, các phương án này không bị giới hạn vào đó. Các công nghệ và các kỹ thuật khác đã biết trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng để loại bỏ hoặc xóa bỏ các trình tự nucleotit bộ gen ở nguyên liệu thực vật có thể được sử dụng thay thế. Ví dụ, đột biến mất đoạn trình tự khởi động có thể được sử dụng để tạo ra hoặc sinh ra trình tự nucleotit mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 nhưng thiếu ít nhất là một phần của vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p mà lẽ ra có mặt trong intron của trình tự nucleotit này (gen *SUSIBA2* hoặc gen giống SUSIBA2). Sau đó cấu trúc tạo thành có thể được cho biểu hiện tạm thời nhờ *Agrobacterium tumefaciens* (agroinfiltrated) vào nguyên liệu thực vật.

Agroinfiltration là phương pháp được sử dụng trong sinh học thực vật để cảm ứng sự biểu hiện của các gen trong nguyên liệu thực vật. Trong phương pháp này, huyền phù chứa *Agrobacterium tumefaciens* được đưa vào nguyên liệu thực vật bằng cách tiêm trực tiếp hoặc bằng cách thâm nhập chân không, hoặc cho kết hợp với nguyên liệu thực vật trên giá đỡ, sau đó vi khuẩn này chuyển trình tự nucleotit đã tạo ra theo mong muốn vào nguyên liệu thực vật nhờ sự vận chuyển của T-ADN.

Bước thứ nhất là đưa trình tự nucleotit vào chủng *Agrobacterium tumefaciens.* Sau

đó, chủng này được nuôi trong môi trường nuôi cấy lỏng và vi khuẩn thu được được rửa và được tạo huyền phù vào dung dịch đệm thích hợp. Để tiêm, sau đó dung dịch này được đưa vào xylanh. Đầu của xylanh này được ấn vào mặt dưới của nguyên liệu thực vật, như lá, trong khi tác dụng đồng thời một lực ép nhẹ theo hướng ngược lại vào mặt còn lại của lá. Sau đó huyền phù *Agrobacterium* được bơm vào các khoang chứa không khí bên trong lá này qua khí khổng, hoặc đôi khi qua vết cắt nhỏ được tạo ra ở mặt dưới của lá.

Thâm nhập chân không là cách khác để đưa *Agrobacterium* vào sâu trong mô thực vật. Trong quy trình này, đĩa lá, lá, hoặc toàn bộ cây được nhúng chìm vào cốc có mỏ chứa dung dịch này, và cốc có mỏ được đặt trong buồng chân không. Sau đó chân không được tác dụng, ép không khí ra khỏi các khoang giữa các tế bào bên trong lá qua khí khổng. Khi chân không đã được giải phóng, sự chênh lệch áp suất ép huyền phù *Agrobacterium* vào trong lá qua khí khổng vào trong mô diệp nhục. Điều này có thể làm cho gần như toàn bộ các tế bào trong lá đã sử dụng bất kỳ được tiếp xúc với vi khuẩn này.

Khi vào trong nguyên liệu thực vật, *Agrobacterium* vẫn nằm trong khoang giữa các tế bào và vận chuyển trình tự nucleotit như một phần của T-ADN thu được từ Ti plasmit với số lượng bản sao cao vào tế bào thực vật.

Trong một phương án, trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 là trình tự nucleotit nội sinh của bộ gen. Trong một phương án cụ thể, trình tự nucleotit nội sinh của bộ gen có mặt trong nhiễm sắc thể của nguyên liệu thực vật. Do đó, ít nhất một phần của vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p, theo các phương án này, đã bị xóa bỏ, như bằng đột biến mất đoạn gây ra bởi CRISPR/Cas9, ra khỏi trình tự nucleotit nội sinh của bộ gen, tốt hơn là có mặt trong nhiễm sắc thể của nguyên liệu thực vật.

Trong một phương án, một phần của vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p bị xóa bỏ khỏi trình tự nucleotit mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2. Trong trường hợp này, phần bị xóa bỏ này tốt hơn, nếu được chọn để tương ứng với trình tự hoặc vùng con của vùng hoạt hóa mà phức hợp hoặc yếu tố hoạt hóa *trans* liên kết vào đó. Do đó, đột biến mất đoạn của trình tự hoặc vùng con này ngăn cản hoặc ít nhất là làm giảm đáng kể sự liên kết của phức hợp hoặc yếu tố hoạt hóa *trans* với vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p .

Trong một phương án khác, vùng hoạt hóa này được xóa bỏ khỏi trình tự nucleotit. Trong phương án này, trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc

giống SUSIBA2 thiếu vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p. Việc loại bỏ hoàn toàn vùng hoạt hóa này do đó ngăn cản hữu hiệu phức hợp hoặc yếu tố hoạt hóa *trans* liên kết với *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p.

Vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p ở đại mạch được chỉ ra dưới đây (SEQ ID NO: 92):

GTTGCCTCTCTTTTGTAAATGTATCTATGAGTTACATATTTTATTCTGATATTTTTTGGATG
ATAGGAAGGTAACGCTATTCCAGATGCATGGCAAATCTCAATATAAAACTCATTAACTCAAT
ATTCATGTGCAGCATTACTTCTTTCACATGTTGTGGAGAAGTTTCTTTATAAATGGTAGAGT
TTGAAGGAAGTATTTTGAATGGCAGTTTGGGGAAAACCTATGGTACATATGTAGTTAGATCT
ATCTGTGCTTGCTATATTAGTCACATCCTTTCTTAATTCGTTGACTTGTTTTTACATATTTA
GTTTTGCATTGTGTAACATTTGTGATGTCATATTTTGTACTGCAG

Vùng hoạt hóa tương ứng của SUSIBA1-like p ở lúa được chỉ ra dưới đây (SEQ ID NO: 93):

ATTTCCTTGCTAGGTGAGACTTGAGTGGTGCTAGTCTGGCTGCAAATTTATAGAAGTATGTG
AAAATTTGAGGTCAGAATACAAGTAATTGAATGGACCAATCTAATGAGTTCTGTAGCTTTAG
AATAATTAATGTTAACATAAAAATATGTTCATGAAATCAGGTCCTTCTGCATTTTGTTGTTA
ACCGAATTCCACATTCTTCTTTAGTTCTCACAAGTACAGACAAGTATCTTGTAATGGTGGAT
TCTTTTTTGGAAAACAAACTTCATTACATATTTTGTGTGATCCATCTATGCCTTGTGCCCTT
GTTACCTTTTTTTCCCTACACCTTGTTTTCTCTTGTACTTAGTTTTGCATTGTATAACCTTT
TGCTGTACTCGTGTCTTGTACTGTAG

Vùng hoạt hóa tương ứng của SUSIBA1-like p ở lúa mì được chỉ ra dưới đây (SEQ ID NO: 112):

CTTGCCTATCATTTGTAAATGCATGTACGAACTTACCTATTTTATTCTGATCTTCTTTGGAG
GGTAGGAAGGTAACACTATCCCAGATGCATGGCAAATCTCAGTATAGAACTCATTAACTCAA
TATCCATATGTAACATTACTTCTTTCACATGTAGCGGAGAAGTTTCTTTATAAATAGTAGAG
TTTGAAAAAAGCACTTTGAATGACAGTTTGGGGAAAAACTATGGTACATATGTAGTTAGATC
TATCTGTGCTTGCTATGTTAGTCACATTCTTTCTTAATTCCTGTTGACTTGTTTTTGCATAT
TTTGTTTTGCATCGTGTAACATTTGTAATGCTCATATTTTGTACTGCAG

SUSIBA1 p hoặc SUSIBA1-like p kiểu dại thường chứa vùng ức chế đường ngoài vùng hoạt hóa đường. Trong một phương án, trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 còn thiếu ít nhất một phần của vùng ức chế đường của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p có mặt trong intron của phiên bản kiểu dại của trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2.

Do đó, *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p chứa, trong một phương án, hai yếu tố

điều khiển: vùng hoạt hóa và vùng ức chế đường. Hai yếu tố điều khiển này có mặt trong phần trình tự nucleotit mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 tương ứng với intron. Các yếu tố điều khiển này do đó là một phần của phần intron của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p. Như đã đề cập trên đây, *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p còn chứa phần exon nằm trong exon của trình tự nucleotit mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2.

Trong một phương án, một phần của vùng ức chế đường của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p bị xóa bỏ khỏi trình tự nucleotit mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2. Trong một phương án khác, vùng ức chế đường này được xóa bỏ khỏi trình tự nucleotit.

Sự xóa bỏ vùng ức chế đường hoặc ít nhất là một phần của nó có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, ví dụ, đột biến mất đoạn gây ra bởi CRISPR/Cas9 hoặc công nghệ khác, như được mô tả trong phần trên đây về vùng hoạt hóa.

Sự xóa bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng ức chế đường của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p là bổ sung thêm cho sự xóa bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p.

Trong một phương án, trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 thiếu i) ít nhất là một phần của vùng hoạt hóa, ii) toàn bộ vùng hoạt hóa, iii) ít nhất là một phần của vùng hoạt hóa và ít nhất là một phần của vùng ức chế đường, iv) ít nhất là một phần của vùng hoạt hóa và toàn bộ vùng ức chế đường, v) toàn bộ vùng hoạt hóa và ít nhất là một phần của vùng ức chế đường, hoặc vi) toàn bộ vùng hoạt hóa và toàn bộ vùng ức chế đường của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p.

Vùng ức chế đường của *SUSIBA1* p ở đại mạch được chỉ ra dưới đây (SEQ ID NO: 94):

GTACACAACCTTTAATTTTCTTTTCTGTGTCCTATAGAGATTAATGCACTTTATCTTGCAGA
ACATTAAGATGAAATTTAAGCATTTTGTTTCTAGATGACCCTGCAACTTTTTTTGGCCTTTA
TTGTGCATATTATATAATTTGGCCAGGTTCTTGAATTGTTGCATAATTCATAAT

Vùng ức chế đường tương ứng của SUSIBA1-like p ở lúa được chỉ ra dưới đây (SEQ ID NO: 95):

GTATGGATCCTTTCTTTGAGTGATTACCTGGTATCGTGTAATTCTTCATTTGTGTATACTGT
ATTTGAGAGTTTGAAAAAATTTCCATAGAAAATAATAACATTTGTTGTTTACAAATGGTCCC
GCCAAAACAGTGGAATTTATATTGGGGATGTACATAAAAGGAGTGTAAAGTTCTAATGTGCT
TATGCTAACTTCCTTTCCATGATCTAAAGTTGTTACCTTACGGTATGCTATTTATTGGATCT
ATATTGCATTTTACTTGGTAAATCTATCTGAGGTTCCAGCTTTTGATATTTAAGTTTTCCTA
TGTTTAATTCAAAATATTCTCACGTGAATCGCAAACCTCACCAGGAGTACAATAAATTCGTT
TTATTATTATTGTAGGCTGTGTTATTTCTAGTCCATGGTTCGGTGTCTTGAAATTTCAGTGC
CAAAATTGGGATGGATCTGGTTACATCTTCAAGTCTAATAAATGATCACACCGACTTTATTG
TGTGATTTGATTATAGCAGGGTCTTGCAACATAAATACAAGCTATTAATTGTGAAAGGAGAA
ATGAGATCTTTGGTGAGATCATGAGAATAGGGTATAACAGACACAAT

Vùng ức chế đường tương ứng của SUSIBA1-like p ở lúa mì được chỉ ra dưới đây (SEQ ID NO: 113):

GTACACAACCTTTAATTTTCTTTTCTCTGTGTCCCATAGAGATTAATGTACTTTATCTTGCA
GAACATCAAAAGAAAATTTAAGCATTTTGTTTCTATACGACCCCACAAATATATCTGGCCTT
TATTGTGCATATTATAACCATAATTCGGCTAGGTTCTTGAATTGTTGCATAATTCATAAT

Vùng ức chế đường ở lúa chứa phần theo sau, thứ hai có sự tương đồng trình tự cao với vùng ức chế đường tương ứng ở đại mạch và phần đứng trước, thứ nhất không có mặt ở đại mạch.

Vùng hoạt hóa và vùng ức chế đường của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p đều có mặt ở intron của gen *SUSIBA2* hoặc gen giống SUSIBA2. Trong một phương án, intron này bị xóa bỏ khỏi gen *SUSIBA2* hoặc gen giống SUSIBA2. Do đó, trong phương án này, trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 thiếu intron chứa vùng hoạt hóa và vùng ức chế đường của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p. Trong một phương án cụ thể, trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 thiếu intron 2.

Trong một phương án, trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 thiếu phần intron của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p. Ở đại mạch, intron 2 bao gồm vùng hoạt hóa và vùng ức chế đường, nghĩa là, phần intron của *HvSUSIBA1* p chiếm intron 2. Intron 2 tương ứng ở, ví dụ, lúa chứa vùng hoạt hóa và vùng ức chế đường có tỷ lệ tương đồng trình tự cao với vùng tương ứng ở đại mạch. Tuy nhiên intron 2 ở lúa, còn chứa trình tự nucleotit đứng trước vùng hoạt hóa có tỷ lệ tương đồng trình tự cao với vùng hoạt hóa ở đại mạch. Trình tự nucleotit đứng trước này có thể là một phần của vùng hoạt hóa lớn hơn ở lúa, tạo thành một vùng khác nằm trong SUSIBA1-like

p ở lúa hoặc không tạo thành một phần của SUSIBA1-like p. Do đó, trong một phương án, intron này có thể chứa (các) trình tự nucleotit khác với phần intron của SUSIBA1-like p. Trong phương án này, intron này bao gồm phần intron của SUSIBA1-like p, tốt hơn nếu là vùng hoạt hóa và vùng ức chế đường, và ít nhất là một trình tự nucleotit khác. Trong phương án này, phần intron của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p bị xóa bỏ khỏi phiên bản kiểu dại của trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2. Điều này có nghĩa là sau khi xóa bỏ phần intron này, trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 có thể thiếu intron 2, nếu phần intron này chiếm toàn bộ trình tự của intron 2, hoặc có thể thiếu một phần của intron 2, nếu phần intron này chiếm một phần của toàn bộ trình tự của intron 2.

Trình tự nucleotit của *SUSIBA1* p ở đại mạch được trình bày dưới đây (SEQ ID NO: 96). Phần được gạch chân của trình tự nucleotit này tương ứng với phần *SUSIBA1* p có mặt trong intron 2 của gen *SUSIBA2*. Phần được gạch chân và in nghiêng của trình tự nucleotit này tương ứng với vùng hoạt hóa, trong khi phần được gạch chân và in đậm của trình tự nucleotit này tương ứng với vùng ức chế đường. Phần còn lại của trình tự nucleotit này tương ứng với phần *SUSIBA1* p có mặt trong exon 3 của gen *SUSIBA2*.

gtacacaacctttaattttcttttctgtgtcctatagagattaatgcactttatcttgcaga
acattaagatgaaatttaagcattttgtttctagatgaccctgcaactttttttggccttta
ttgtgcatattatataatttggccaggttcttgaattgttgcataattcataatgttgcctc
tcttttgtaaatgtatctatgagttacatattttattctgatatttttttggatgataggaag
gtaacgctattccagatgcatggcaaatctcaatataaaactcattaactcaatattcatgt
gcagcattacttctttcacatgttgtggagaagtttctttataaatggtagagtttgaagga
agtattttgaatggcagtttggggaaaacctatggtacatatgtagttagatctatctgtgc
ttgctatattagtcacatcctttcttaattcgttgacttgttttacatatttagttttgca
ttgtgtaacatttgtgatgtcatattttgtactgcaggctcctgctatgagtgatctaaaaa
aacatgagcattctatgcaaaatcagagtatgaatcccagctcatcatctagcaatatggtg
aatgaaaacagacctccctgttcacgtgagtcgagtcttacagtgaatgtaagtgctcagaa
ccaacctgttggaatggttggtttgactgacagcatgcctgctgaagttggtacatctgagc
cgcagcagatgaatagctctgacaatgccatgcaagagccgcagtctgaaaatgttgctgac
aagtcggcagatgatggctacaactggcggaaatacgggcagaagcatgtcaagggaagtga
aaaccctagaagttactacaagtgcacacatcctaattgtgaa

Trình tự nucleotit của SUSIBA1-like p ở lúa được trình bày dưới đây (SEQ ID NO: 97). Phần được gạch chân của trình tự nucleotit này tương ứng với phần SUSIBA1-like p có mặt trong intron 2 của gen giống SUSIBA2. Phần được gạch chân và in nghiêng của

trình tự nucleotit này tương ứng với vùng hoạt hóa, trong khi phần được gạch chân và in đậm của trình tự nucleotit này tương ứng với vùng ức chế đường. Trình tự nucleotit đứng trước được chỉ ra trong phần được gạch chân, in đậm và in nghiêng. Phần còn lại của trình tự nucleotit này tương ứng với phần SUSIBA1-like p có mặt trong exon 3 của gen giống SUSIBA2.

gtatggatcctttctttgagtgattacctggtatcgtgtaattcttcatttgtgtatactgt
atttgagagtttgaaaaaatttccatagaaaataataacatttgttgtttacaaatggtccc
gccaaaacagtggaatttatattggggatgtacataaaaggagtgtaaagttctaatgtgct
tatgctaacttcctttccatgatctaaagttgttaccttacggtatgctatttattggatct
atattgcattttacttggtaaatctatctgaggttccagcttttgatatttaagttttccta
tgtttaattcaaaatattctcacgtgaatcgcaaacctcaccaggagtacaataaattcgtt
ttattattattgtaggctgtgttatttctagtccatggttcggtgtcttgaaatttcagtgc
caaaattgggatggatctggttacatcttcaagtctaataaatgatcacaccgactttattg
tgtgatttgattatagcagggtcttgcaacataaatacaagctattaattgtgaaaggagaa
*atgagatctttggtgagatcatgagaatagggtataacagacacaat*atttccttgctaggt
gagacttgagtggtgctagtctggctgcaaatttatagaagtatgtgaaaatttgaggtcag
aatacaagtaattgaatggaccaatctaatgagttctgtagctttagaataattaatgttaa
cataaaaatatgttcatgaaatcaggtccttctgcattttgttgttaaccgaattccacatt
cttctttagttctcacaagtacagacaagtatcttgtaatggtggattctttttggaaaac
aaacttcattacatattttgtgtgatccatctatgccttgtgcccttgttacctttttttcc
ctacaccttgttttctcttgtacttagttttgcattgtataacctttttgctgtactcgtgtc
*ttgtactgtagg*cttctgctatcaatgatcccaaaaagcatgaaacttctatgaaaaatgaa
agcctgaatactgccctgtcatctgacgatatgatgatcgacaatatacctctatgttctcg
tgagtcaactctcgcagtcaatatttcaagtgccccgagccaactggttggaatggttggtt
taactgacagctcacctgctgaagttggtacatctgagttgcatcagatgaatagctctgga
aatgctatgcaggagtcacagcctgaaagtgtggctgaaaagtctgcagaggatggttataa
ctggcgcaaatatgggcaaaagcatgttaagggaagtgagaacccgagaagctattacaagt
gcacacatcctaactgtgat

Trong một phương án, nguyên liệu thực vật là nguyên liệu thực vật từ lúa (*Oryza sativa* hoặc *Oryza glaberrima)*. Các ví dụ không giới hạn về nguyên liệu thực vật từ lúa này bao gồm cây lúa, tế bào cây lúa, mô lúa và hạt gạo. Sau đó trình tự nucleotit bộ gen tốt hơn, nếu mã hóa yếu tố phiên mã giống SUSIBA2 (OsSUSIBA2-like TF) thiếu ít nhất một phần của vùng hoạt hóa của SUSIBA1-like p (OsSUSIBA1-like p) có mặt trong intron của phiên bản kiểu dại của trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã giống SUSIBA2

(OsSUSIBA2-like TF).

Trong một phương án khác, nguyên liệu thực vật là nguyên liệu thực vật *Graminaea*. Ví dụ không giới hạn về nguyên liệu thực vật *Graminaea* này bao gồm cây *Graminaea*, tế bào *Graminaea*, mô *Graminaea* và hạt *Graminaea*. Ví dụ được ưu tiên về các nguyên liệu thực vật *Graminaea* này bao gồm nguyên liệu thực vật của đại mạch (*Hordeum vulgare)*, nguyên liệu thực vật lúa mì (*Triticum* spp.), nguyên liệu thực vật yến mạch *(Avena sativa)*, nguyên liệu thực vật từ lúa mạch đen (*Secale cereal)* và nguyên liệu thực vật ngô (Zea *mays)*.

Ít nhất một số nguyên liệu thực vật theo các phương án này không chỉ có quá trình tổng hợp hydrat cacbon kiểm soát được, như tổng hợp tinh bột tăng hoặc tổng hợp tinh bột và fructan tăng. Nguyên liệu thực vật này có thể có thêm các đặc điểm có lợi khác bao gồm thải metan thấp. Sự biểu hiện của yếu tố phiên mã HvSUSIBA2 ở lúa đã được chỉ ra là không chỉ dẫn đến sự tổng hợp tinh bột cao mà còn dẫn đến sự thải metan thấp và làm giảm các mức vi khuẩn sinh metan vùng rễ [3]. Tuy nhiên giống lúa được mô tả trong [3] là giống lúa chuyển gen chứa trình tự mã hóa của yếu tố phiên mã SUSIBA2 đại mạch liên kết điều khiển với trình tự khởi động *SBEIIb* đại mạch. Giống lúa chuyển gen thu được do đó chứa dạng chuyển gen của trình tự nucleotit không phải của bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 đại mạch (HvSUSIBA2 TF) và trình tự nucleotit nội sinh của bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã giống SUSIBA2 của lúa (OsSUSIBA2-like TF). Trình tự nucleotit nội sinh của bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã giống SUSIBA2 lúa (OsSUSIBA2-like TF) chứa toàn bộ trình tự của trình tự khởi động giống *SUSIBA1* của lúa (OsSUSIBA1-like p) bao gồm vùng hoạt hóa và vùng ức chế đường của nó.

Trái ngược rõ ràng với giống lúa chuyển gen đã đề cập trên đây, nguyên liệu thực vật theo các phương án này tốt hơn, nếu không chứa nguyên liệu chuyển gen bất kỳ. Trái ngược rõ ràng là, trình tự nucleotit nội sinh của bộ gen của nó mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 được biến đổi bằng cách xóa bỏ ít nhất là một phần của vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p. Điều này có nghĩa là, trái ngược rõ ràng với giống lúa chuyển gen trong [3], nguyên liệu thực vật theo các phương án này tốt hơn, nếu không thể sản sinh ra yếu tố phiên mã SUSIBA1 hoặc giống SUSIBA1 bất kỳ, hoặc chỉ có khả năng sản sinh các lượng không đáng kể của yếu tố phiên mã này. Giống lúa chuyển gen [3] chứa trình tự khởi động nội sinh và trình tự mã hóa cho yếu tố phiên mã giống SUSIBA1 ở gạo tẻ và do đó có thể sản sinh ra lượng đáng kể yếu tố phiên mã

này.

Nguyên liệu thực vật theo các phương án này có thể sản sinh ra lượng tinh bột hoặc tinh bột và fructan thậm chí còn cao hơn so với lúa chuyển gen thuộc giải pháp đã biết do thiếu sự sản sinh đáng kể bất kỳ của yếu tố phiên mã SUSIBA1 hoặc giống SUSIBA1. Thêm vào đó, nguyên liệu thực vật theo các phương án này có thể có các đặc điểm có lợi là thải metan thấp như được đề cập cho giống gạo tẻ chuyển gen trong [3]. Ưu điểm khác của các phương án này, cụ thể là việc sử dụng đột biến mất đoạn do CRISPR/Cas9 của ít nhất một phần của vùng hoạt hóa của *SUSIBA1* p hoặc SUSIBA1-like p, là nguyên liệu thực vật không được xem là sinh vật biến đổi di truyền (GMO). Do đó, trong một phương án, nguyên liệu thực vật này là nguyên liệu thực vật không GMO.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Quá trình tổng hợp hydrat cacbon liên tục là quan trọng đối với sự sống còn của thực vật nhờ đảm bảo việc cung cấp năng lượng cho sự sinh trưởng và phát triển trong quá trình phát sinh cá thể hoặc sinh sản của thực vật. Tinh bột và fructan là hai hydrat cacbon quan trọng ở nhiều cây có hoa và để sử dụng cho người. Việc hiểu về quá trình tổng hợp tinh bột và fructan phối hợp không chỉ giúp làm sáng tỏ cách mà các thực vật phân bổ photosynthate (phân tử được tạo ra do quang hợp trong lá) và ưu tiên quá trình tổng hợp các hydrat cacbon khác nhau cho sự sống còn mà còn có lợi cho việc cải thiện các cây ngũ cốc trong nông nghiệp vì an ninh lương thực và chất lượng sản xuất. Hệ thống được báo cáo ở đây từ một gen duy nhất ở đại mạch, sử dụng hai trình tự khởi động luân phiên, một intron/exon, để tạo ra hai yếu tố phiên mã trùng nhau về trình tự nhưng trái ngược về chức năng, trong việc nhận biết đường, thông qua việc truyền tín hiệu sucroza/glucoza/fructoza. Hệ thống này sử dụng cơ chế tự điều hòa để nhận biết hoạt tính *trans* được kiểm soát bằng đường trên một trình tự khởi động và điều hòa, toàn bộ trong hệ thống này, sự tổng hợp tinh bột và fructan phối hợp nhờ yếu tố phiên mã cạnh tranh liên kết với trình tự khởi động còn lại. Hệ thống đa chức năng này có thể được áp dụng để gây giống các tính trạng ở cây thân cỏ với lượng tinh bột và fructan được điều chỉnh cho nhiều ứng dụng đa dạng. Sự phát hiện trình tự khởi động kéo dài qua intron/exon trong gen chủ, tạo ra các protein có chức năng khác biệt, góp phần vào sự phức tạp của bộ gen thực vật.

Ở thực vật, đường là quan trọng trong việc gây ra sự sinh trưởng và phát triển của thực vật. Sự phát triển của thực vật do đường bao gồm một quá trình quan trọng, tổng hợp

hydrat cacbon liên tục nhờ đường cho các chiến lược cung cấp năng lượng và nguyên liệu tức thời, ngắn hạn và dài hạn. Tuy nhiên, làm thế nào để đường điều hòa được quá trình tổng hợp hydrat cacbon liên tục để sử dụng hiệu quả các photosynthate vẫn chưa rõ. Tinh bột và fructan lần lượt là các polyme glucoza và fructoza, và là hai hydrat cacbon quan trọng ở một số lượng lớn thực vật có hoa. Tinh bột là phổ biến trong giới thực vật và các fructan có thể được tìm thấy ở hơn 36 000 loài thực vật hoặc hơn 12% thực vật hạt kín bao gồm cả cây một lá mầm và hai lá mầm. Ở cây hai lá mầm, năm họ chính sản sinh fructan như *Asteraceae,* ví dụ, bồ công anh, atiso và rau diếp xoăn; *Campanulaceae,* ví dụ, cây hoa chuông lá tròn; và *Boraginaceae,* ví dụ , Lưu ly sớm (Early Forget-me-not), và ở cây một lá mầm cũng có năm họ chính tổng hợp fructan như *Liliaceae,* ví dụ, loa kèn trắng; *Amaryllidaceae,* ví dụ, hành tây; và *Gramineae* ôn đới quan trọng bao gồm nhiều loại cây trồng, ví dụ, đại mạch, lúa mì, yến mạch, và nhiều loại cỏ làm thức ăn cho gia súc. Trong quá trình phát triển của thực vật, tinh bột đóng vai trò là dạng cung cấp năng lượng tương đối dài hạn và fructan là nguồn năng lượng sẵn có nhanh chóng. Quan trọng là, cả hai hydrat cacbon đều có nhu cầu cao để sử dụng cho người. Tinh bột là nhân tố chính để đảm bảo an ninh lương thực hiện tại và tương lai và, với sự sản xuất toàn cầu hàng năm gần 3 tỉ tấn, hầu hết đến từ ngũ cốc, là cực kỳ quan trọng về kinh tế. Các fructan được sản sinh ở nhiều cây thân cỏ trong quá trình phát triển của thực vật và các giai đoạn sớm của sự phát triển hệ sinh sản là thiết yếu để làm đầy hạt và quan trọng đối với năng suất và với khả năng chịu hạn và chịu lạnh. Một số cây trồng thân cỏ tích lũy hàm lượng cao fructan làm hydrat cacbon dự trữ ở hạt thành thục. Các fructan hạt này có thể được sử dụng trong nhiều loại thực phẩm và các ứng dụng không phải thực phẩm, ví dụ, làm thành phần thực phẩm chức năng có hàm lượng calo thấp có tác dụng tích cực trên hệ vi sinh vật (microbiome) trong ruột người. Tuy nhiên, hiểu biết hiện nay về cách mà thực vật điều hòa và ưu tiên sự tổng hợp hydrat cacbon, như tổng hợp tinh bột và fructan, để tối ưu hóa việc dự trữ và sử dụng các photosynthate cho sự sinh trưởng và phát triển là rất ít. Ở đây, việc sử dụng quá trình tổng hợp tinh bột và fructan ở đại mạch làm hệ mẫu, trong mạng lưới truyền tín hiệu đường ở thực vật, cơ chế tự điều hòa từ một gen duy nhất nhờ đó sự biểu hiện đáp ứng đường của hai biến thể yếu tố phiên mã (TF), có các trình tự giống nhau nhưng độ dài khác nhau ở các đầu 5' từ hai trình tự khởi động luân phiên, tạo ra hệ thống nhận biết đường đối lập. Hệ thống này phát hiện đường bằng cách nhận biết hoạt tính *trans* trên trình tự khởi động bên trong và kiểm soát, toàn bộ trong hệ thống này, quá trình tổng hợp fructan và tinh

bột phối hợp nhờ sự liên kết của yếu tố phiên mã cạnh tranh trên trình tự khởi động còn lại.

Thông tin liên quan đến trình tự mà giải thích các cơ chế đằng sau các tính trạng quan trọng của cây trồng như năng suất, các thành phần hydrat cacbon, làm đầy hạt và khả năng chịu stress do yếu tố không phải sinh học gây ra ở các cây thân cỏ ôn đới là quan trọng đối với các nỗ lực để làm tăng năng suất cây trồng bằng cách chọn lọc nhờ chỉ thị phân tử và sinh học tổng hợp.

Như đã báo cáo ở đây, ở nhiễm sắc thể đại mạch 2, trình tự bản sao đơn mã hóa hai biến thể cỡ của các TF truyền tín hiệu đường ở đại mạch (sugar signaling in barley: SUSIBA), SUSIBA1 là 30 kD và SUSIBA2 là 62 kD (Fig. 1A, 1B, 2, 3A-3C). Các trình tự khởi động của *SUSIBA1* và *SUSIBA2* (*SUSIBA1* p và *SUSIBA2* p) đáp ứng với các nồng độ khác nhau của sucroza (Fig. 5A, 5B). SUSIBA1 đóng vai trò là tác nhân ức chế mà ức chế trực tiếp sự tổng hợp fructan, trong khi đó SUSIBA2 là tác nhân hoạt hóa tăng cường sự tổng hợp tinh bột. Bất ngờ là, sự biểu hiện *SUSIBA2* được kiểm soát bởi sự liên kết cạnh tranh SUSIBA1/SUSIBA2 trên trình tự khởi động *SUSIBA2* , mà tạo ra hệ thống tự điều hòa đối với quá trình tổng hợp tinh bột và fructan phối hợp.

Kết quả

Quá trình tổng hợp tinh bột và fructan đáp ứng với sự cung cấp sucroza sai vị trí ở nhiều điểm đặt khởi đầu khác nhau

Quá trình tổng hợp tinh bột và fructan trong lá tích trữ được cảm ứng khi sucroza (Suc) là sẵn có ở nồng độ cao *in vivo* hoặc bằng cách cung cấp đường sai vị trí (Fig. 4A, 4B). Sự cảm ứng tinh bột và fructan ở lá đại mạch được xử lý bằng sucroza bắt đầu ở các điểm đặt khác nhau, 50 mM Suc đối với fructan và 85 mM Suc đối với tinh bột (Fig. 4A, 4B). Ngoài ra, hàm lượng của tinh bột và fructan có tương quan rõ ràng với các mức sucroza đã cung cấp (Fig. 4A, 4B). Các quan sát này đặt ra các câu hỏi về bản chất của các con đường truyền tín hiệu đường mà gây ra sự cảm ứng liên tục quá trình tổng hợp tinh bột và fructan.

SUSIBA1 và SUSIBA2 có khả năng cảm biến đường nhờ sự truyền tín hiệu sucroza/glucoza/fructoza

Trong nhiều con đường truyền tín hiệu Suc, đã phát hiện ra là Glc, Fru, và/hoặc trehaloza 6-P (T6P), mà không phải là chính Suc, đóng vai trò là chất truyền tin chính. Gần đây đã được chỉ ra là hexoza có thể điều hòa sự tổng hợp oligofructan trong hạt đại mạch

và sự biệt hóa tế bào ở cây bông, tương ứng. Cùng các nồng độ mol của Suc, Fru và Glc được sử dụng cho lá tích trữ của đại mạch và sự tác động lên sự tích lũy fructan và tinh bột được kiểm tra (Fig.6A và 6B). Như được chỉ ra, tác dụng cảm ứng sự tích lũy fructan và tinh bột được quan sát thấy đối với các nồng độ Suc lần lượt là ≥50 và 85mM (cũng xem Fig.4A, 4B). Ở 85 mM không chỉ Fru mà cả Glc cảm ứng sự tích lũy tinh bột. Cả Glc và Fru đều không cảm ứng sự tích lũy fructan ở 50 mM nhưng cảm ứng ở 85 mM. Việc kiểm tra mức nồng độ sản phẩm phiên mã và protein chứng minh rằng các mẫu được xử lý bằng Fru và Glc thể hiện cùng một xu hướng với các mẫu được xử lý bằng Suc, nghĩa là, với sự giảm đối với *SUSIBA1*/SUSIBA1 và tăng đối với *SUSIBA2*/SUSIBA2 và các sản phẩm phiên mã/enzym đối với sự tổng hợp fructan (*6-SFT*/6-SFT) và tinh bột (*SBEIIb*/SBEIIb) (Fig.6C and 6D). Các mức nồng độ của Fru và Glc nội sinh ở các mẫu được xử lý bằng Suc là cao hơn so với ở các mẫu được xử lý bằng Fru và Glc (Fig.7A và 7B). Các mức nồng độ Fru và Glc nội sinh có tương quan với sự tích lũy fructan và tinh bột ở các mẫu được xử lý bằng đường (Fig.6A và 6B và Fig.7A và 7B). Các mức nồng độ T6P thường là thấp và không thể được phát hiện dương tính ở tất cả các mẫu, trong khi đó tiêu chuẩn T6P là 5 ng (119 pmol) tạo ra tín hiệu rõ ràng trong phân tích sắc ký lỏng - phép đo phổ khối lượng (LC/MS). Phát hiện này được chứng minh bằng việc không có sự gia tăng về mức nồng độ sản phẩm phiên mã giống *TPS* (Fig.7C) hoặc mức hoạt tính trehaloza 6-phosphat toàn phần (TPS) (Fig.7D) trong việc xử lý bằng Suc, Fru hoặc Glc.

SUSIBA2 neo trình tự khởi động intron/exon cho SUSIBA1

Để mô tả chức năng và sự tác động lẫn nhau của các SUSIBA1 và SUSIBA2 TF trong quá trình tổng hợp tinh bột và fructan, trước hết nguồn gốc của *SUSIBA1* và sự tương đồng và trình tự của *SUSIBA1* p được kiểm tra. Việc sàng lọc thư viện cADN nội nhũ đại mạch ở thời điểm 10 ngày sau khi ra hoa (daf) với *SUSIBA2* cADN làm đoạn dò tạo ra một số dòng tương đồng với đầu 3' của *SUSIBA2* cADN mặc dù sự biểu hiện của *SUSIBA1* là thấp ở giai đoạn này (Fig.1C và 1D). Với 5'-RACE (khuếch đại nhanh các đầu cADN: rapid amplification of cDNA ends) sử dụng lá đại mạch, thu được tổng số ba amplicon ARN (Fig.1A). Phân tích trình tự chỉ ra là các amplicon là tương đồng với một phần của *SUSIBA2* cADN. cADN dài nhất (amplicon 3) gồm 1448 nt tương ứng với peptit 281 axit amin tương đồng với 281 axit amin đầu cùng C của SUSIBA2 và có khối lượng phân tử được suy luận xấp xỉ 30 kD (Fig.1B). Phân tích thấm tách Northern và Western của lá và các mô nội nhũ đại mạch xác nhận sự có mặt của sản phẩm phiên mã *SUSIBA1* 1,5 kb và

sản phẩm protein 30-kD (Fig.1C và 1D). Để phân lập *SUSIBA1* p, intron 2 và một phần đầu 5'của exon 3 của *SUSIBA2* được khuếch đại PCR từ bộ gen đại mạch. Vùng có độ dài đầy đủ đã được khuếch đại, intron 2, hoặc một phần đầu 5' của exon 3 sau đó được dung hợp với gen chỉ thị *GFP*. Vi khuẩn Agrobacterium chứa các cấu trúc khác nhau được sử dụng để thâm nhập lá đại mạch. Vùng có độ dài đầy đủ này tạo ra hoạt tính mạnh, tương tự với hoạt tính của trình tự khởi động 35S (Fig.3C), trong khi đó đầu 5' của exon 3 thể hiện hoạt tính yếu (Fig.3C). Intron 2, đối chứng âm (*GUS:GFP*), và vi khuẩn agrobacterium không có các cấu trúc không gây ra hoạt tính gen chỉ thị bất kỳ (Fig.3C). Kết luận là vùng có độ dài đầy đủ đã phân lập là trình tự khởi động chức năng đối với *SUSIBA1*.

Để minh họa các đáp ứng khác nhau của *SUSIBA1* p và *SUSIBA2* p với các mức sucroza, lá đại mạch được thâm nhập bằng vi khuẩn agrobacterium chứa các cấu trúc *SUSIBA1* p*:GFP* và *SUSIBA2* p*:BFP* và các lá này được xử lý với các nồng độ sucroza khác nhau. Mối tương quan âm và dương trực tiếp giữa hoạt tính trình tự khởi động và các nồng độ sucroza lần lượt đối với *SUSIBA1* và *SUSIBA2,* là rõ ràng (Fig.5B). Không phát hiện thấy huỳnh quang từ đối chứng âm *GUS:GFP*.

Vai trò của SUSIBA1 trong việc điều hòa sự tổng hợp fructan

Khi đã nhận diện được *SUSIBA1* p, khả năng tham gia của SUSIBA1 vào quá trình tổng hợp fructan được kiểm tra. Sự định vị nhân của SUSIBA1 được xác nhận bằng sự thâm nhập của cấu trúc dung hợp *SUSIBA1:GFP* nhờ vi khuẩn agrobacterium, điều này chứng minh là SUSIBA1 có thể gắn đích thành công GFP vào nhân (Fig.8A đến 8D). Thử nghiệm điện di dịch chuyển di động (Electrophoretic mobility shift assay: EMSA) được sử dụng để nghiên cứu tương tác *in vitro* giữa SUSIBA1 và trình tự khởi động của *6-SFT* mà mã hóa enzym chính trong quá trình tổng hợp fructan ở đại mạch. EMSA được thực hiện như được mô tả trước đây [1] bằng cách sử dụng SUSIBA1 được biểu hiện quá mức và được tinh chế từ *E. coli* (Fig.8E đến 8J). Theo dấu hiệu của các protein WRKY, đã được chỉ ra là SUSIBA2 TF liên kết với yếu tố *cis* W-box ADN. Phân tích thêm về hoạt tính SUSIBA2 cho thấy là nó cũng liên kết với SUREa nhưng không liên kết với yếu tố *cis* SP8a. Việc kiểm tra trình tự khởi động *6-SFT* dẫn đến việc nhận diện hai yếu tố SUREa, ba yếu tố W-box và một yếu tố SP8a (Fig.8E). Bằng cách sử dụng các tổ hợp khác nhau của các enzym giới hạn BstXI, Pvull và Spel, trình tự khởi động có độ dài đầy đủ (đoạn 1) được phân tích thành bốn đoạn (các đoạn 2-5, Fig.8E). EMSA chỉ ra rằng SUSIBA1 có thể

liên kết với các đoạn 1-4 chứa một hoặc nhiều yếu tố *cis*, nhưng không liên kết với đoạn 5 thiếu bất kỳ trong số các yếu tố này (Fig.8F). Điều này chỉ ra rằng SUSIBA1 có thể liên kết với SUREa và W-box và/hoặc SP8a. EMSA với các đoạn dò oligonucleotit được cấu trúc cho từng yếu tố (Fig.8G) chứng minh là SUSIBA1 thực sự có thể liên kết với mỗi yếu tố (Fig.8H). Để xác nhận tính đặc hiệu của hoạt tính liên kết, các trình tự của các yếu tố (Fig.8I) được thao tác di truyền và sự liên kết của SUSIBA1 được kiểm tra. EMSA chỉ ra là khi các trình tự của yếu tố được thay thế bằng đoạn A, hoạt tính liên kết SUSIBA1 bị mất (Fig.8J), cho thấy là SUSIBA1 có thể tương tác với trình tự khởi động *6-SFT in vitro* bằng cách liên kết với các yếu tố SUREa, W-box và SP8a, với sự liên kết mạnh với W-box. Không có hoạt tính liên kết của SUSIBA1 với các trình tự của yếu tố được thao tác di truyền, nghĩa là SP8a M, W-box M và SUREa M4 cũng chỉ ra độ tin cậy của EMSA trong hệ thống thử nghiệm (Fig.8J).

Để thu được bằng chứng về sự tương tác *in vivo* giữa SUSIBA1 và trình tự khởi động *6-SFT*, *6-SFT* p*:GFP* được đồng thâm nhập cùng với *p35S:SUSIBA1* và ảnh hưởng của SUSIBA1 trên hoạt tính trình tự khởi động *6-SFT* được theo dõi (Fig.8K đến 8O). Cấu trúc *6-SFT* p*:GFP* một mình, hoặc được đồng thâm nhập cùng với yếu tố phiên mã thực vật không liên quan (WRI1) trong môi trường 100 mM Suc, không có tác động đối với hoạt tính trình tự khởi động *6-SFT* (Fig.8K và 8L). Ngược lại, *6-SFT* p*:GFP* được đồng thâm nhập cùng với *p35S:SUSIBA1* khử hoạt tính trình tự khởi động *6-SFT* (Fig.8M). Để xác nhận sự sản sinh *de novo* của protein SUSIBA1 trong vùng thâm nhập, các tế bào vi khuẩn agrobacterium sống và chết chứa *p35S:SUSIBA1* được sử dụng và các mức nồng độ protein và sản phẩm phiên mã *SUSIBA1* được so sánh trong vùng thâm nhập này bằng cách sử dụng *p35S:WRI1* làm đối chứng (Fig.8N và 8O). Như được mong đợi, sự thâm nhập với các tế bào vi khuẩn agrobacterium sống tạo ra các mức nồng độ protein và sản phẩm phiên mã *SUSIBA1* cao hơn nhiều so với nền tế bào chết đã được thâm nhập và tương tự đối với mức sản phẩm phiên mã *WRI1* đối chứng (Fig.8N và 8O).

Cho đến nay các kết quả này gợi ý rằng SUSIBA1 có khả năng điều hòa sự tổng hợp fructan bằng cách ức chế hoạt tính *6-SFT*. Để thu được bằng chứng kết luận về trường hợp này, thử nghiệm làm giảm sự biểu hiện *SUSIBA1* được thực hiện bằng cách ức chế oligodeoxynucleotit đối nghĩa (asODN). Chiến lược ức chế asODN được lựa chọn dựa vào độ tin cậy cao của nó làm công cụ chẩn đoán về chức năng gen, và khả năng phân biệt giữa các gen có tính tương đồng trình tự cao của nó. Tùy theo trình tự đích, *cơ chế hoạt động*

điển hình để ức chế asODN diễn ra qua sự cắt sản phẩm phiên mã được định hướng bởi RNaza H, và/hoặc sự tạo thành bộ ba chuỗi ADN ở vị trí trình tự khởi động hoạt động. Vì trình tự *SUSIBA1* chồng lấp với phần 3' của *SUSIBA2,* việc ức chế *SUSIBA1* mà không tác động lên *SUSIBA2* đặt ra một thách thức. Do đó, năm asODN (Fig.9A) được thiết kế và hiệu quả ức chế của chúng đối với *SUSIBA1* và *SUSIBA2* được thử nghiệm, theo quy trình được mô tả trước đây [2]. Hai trong số các asODN, asODN 1 và 5, thể hiện tác dụng ức chế tốt *SUSIBA1* mà không ức chế hoạt tính *SUSIBA2* như được đánh giá bằng sự sản sinh các protein SUSIBA1 và SUSIBA2 (Fig.9B, các panen trên). Các hiệu quả ức chế khác nhau của ODN đã cho ở cùng các vùng trình tự của *SUSIBA1* và *SUSIBA2* có thể là do các cấu trúc bậc hai ARN khác nhau, ví dụ, các thân, ở các vùng ngăn cản sự liên kết asODN. So sánh thêm giữa asODN 1 và asODN 5 dựa vào tác động của chúng trên các mức protein 6-SFT xác định được asODN 1, mà thể hiện trên bản đồ vùng mã hóa của *SUSIBA2* và trình tự khởi động của *SUSIBA1,* là ứng viên tốt nhất cho thử nghiệm ức chế asODN (Fig. 9B, các panen dưới). Để xác nhận là asODN 1 gây cản trở hoạt tính *SUSIBA1* p, các lá đại mạch được xử lý bằng sucroza được đồng thâm nhập bằng *SUSIBA1* p:*GFP* và asODN 1, hoặc ODN có nghĩa (sODN). Kết quả chứng minh rằng hoạt tính *SUSIBA1* p bị ức chế hiệu quả bởi asODN 1 (Fig.9C). ODN được đánh dấu huỳnh quang được sử dụng để chỉ ra sự hấp thu hiệu quả asODN bởi tế bào lá đại mạch (Fig.9D). Bằng cách sử dụng asODN 1 kháng *SUSIBA1* và asODN đã mô tả trước đây kháng *SUSIBA2* [2] (được gọi là Su2Antisense 1 trong Bảng 1) ở các ngưỡng cảm ứng sucroza đối với sự tổng hợp fructan và tinh bột (xem Fig.4A, 4B cho các ngưỡng), vai trò của SUSIBA1 làm tác nhân ức chế đối với fructan, và SUSIBA2 là tác nhân hoạt hóa đối với tinh bột được chứng minh (Fig. 10A, 10B, 11A, 11B, 12A, 12B).

SUSIBA1 và SUSIBA2 tạo thành hệ thống đối kháng phân tử

Quan điểm SUSIBA1 là tác nhân ức chế sự tổng hợp fructan và SUSIBA2 là tác nhân hoạt hóa sự tổng hợp tinh bột được chứng minh thêm bằng cách đánh giá mối tương quan giữa mức độ biểu hiện *SUSIBA1* và *SUSIBA2* và hàm lượng fructan và tinh bột trong các điều kiện tự nhiên hơn, nghĩa là, trong các giống đại mạch khác nhau với hàm lượng fructan hạt cao và thấp (Fig. 13A, 13B), trong các thử nghiệm cảm ứng sucroza (Fig. 14A, 14B), và trong quá trình biến thiên hàng ngày của sự tích lũy tinh bột và fructan (Fig. 15A, 15B). Các kết quả thu thập được chứng minh mối tương quan âm giữa hoạt tính *SUSIBA1* và hàm lượng fructan, và mối tương quan dương giữa hoạt tính *SUSIBA2* và hàm lượng

tinh bột. Do đó *SUSIBA1* và *SUSIBA2* tạo thành hệ thống đối kháng phân tử.

Để kiểm tra xem hệ thống phức tạp điều khiển sự tổng hợp tinh bột và fructan này tương quan như thế nào với sự tích lũy tinh bột và fructan, các mức tinh bột và fructan được theo dõi trong lá đại mạch trong chu kỳ ngày-đêm 16 giờ -8 giờ (Fig. 15A, 15B). Sau khi bắt đầu chiếu sáng, sự biểu hiện của *SUSIBA2* tăng, kích thích sự biểu hiện của các gen tổng hợp tinh bột (ví dụ, *SBEIIb)* và gây ra sự tích lũy tinh bột cao vào cuối ngày (Fig.15B). Đáng chú ý, mặc dù sự biểu hiện *SUSIBA1* bị giảm để giải phóng và làm tăng sự biểu hiện *6-SFT* (Fig.15A), không phát hiện thấy sự tích lũy fructan trong pha chiếu sáng (Fig.15B). Nguyên nhân hợp lý là sự cảm ứng tổng hợp fructan tương ứng với sự thoái biến được gia tăng. Để chứng minh giả thuyết này, các mức biểu hiện của gen mã hóa enzym thoái biến fructan đối với 1-FEH và 6-FEH được kiểm tra. Như được thể hiện trong Fig.15A, hoạt tính của *1-FEH* và *6-FEH* theo sau hoạt tính của *6-SFT.* Điều này gợi ý là động học của sự chuyển hóa fructan là thành phần quan trọng của sự phát triển lá tích trữ ở đại mạch.

Sự liên kết cạnh tranh bởi SUSIBA2 và SUSIBA1 với W-box trong trình tự khởi động SUSIBA2 điều khiển hệ thống đối kháng này và sự biểu hiện SUSIBA2

Việc nhận diện hệ thống đối kháng này đặt ra câu hỏi là hoạt tính khác nhau của hai trình tự khởi động luân phiên này và hệ thống đối kháng này được thực hiện như thế nào. Câu hỏi này được giải quyết bằng bộ các phương pháp, bao gồm đột biến mất đoạn trình tự khởi động, ức chế asODN, bẫy oligo TF mồi chuỗi kép, biểu hiện quá mức bằng cách thâm nhập, giải trình tự ADN, và EMSA. Khi các chiều dài khác nhau của trình tự khởi động *SUSIBA2* được dung hợp với gen chỉ thị *GFP*, và được cho biểu hiện tạm thời nhờ *Agrobacterium tumefaciens* vào lá đại mạch, trình tự khởi động có chiều dài đầy đủ đáp ứng với các nồng độ sucroza như mong đợi, trong khi không có hoặc rất ít đáp ứng được phát hiện thấy đối với trình tự khởi động bị cắt thiếu mất 25% của đầu 5' (Fig. 16A-16C). Quan sát này cho thấy là trình tự đáp ứng đường được đặt ở đầu 5'xa của trình tự khởi động *SUSIBA2*. Sự thâm nhập đồng thời của dạng có chiều dài đầy đủ của *SUSIBA2* p:*GFP* cùng với *35p:SUSIBA1* thực sự cũng làm mất hoạt tính trình tự khởi động *SUSIBA2* (Fig.16B và 16C), gợi ý rằng SUSIBA1 ức chế hoạt tính *SUSIBA2* bằng cách liên kết với vùng 5' xa của trình tự khởi động *SUSIBA2*. Quan điểm này có vẻ không phù hợp với các kết quả được trình bày trong các Fig. 11 A, 11B, trong đó tác dụng ức chế asODN của *SUSIBA1* không làm thay đổi sự biểu hiện *SUSIBA2* ở 40 mM Suc. Được giả thiết là, ở 40 mM Suc, sự biểu hiện *SUSIBA1* đã được làm giảm và tác dụng khử ức chế bất kỳ hoạt tính *SUSIBA2*

do làm giảm thêm hiệu giá SUSIBA1 là không đáng chú ý. Tuy nhiên tác dụng hoạt hóa sự biểu hiện *SUSIBA2*, bằng cách ức chế *SUSIBA1* bởi asODN ở 25 mM Suc, đầu thấp của ngưỡng cảm ứng sucroza đối với sự biểu hiện *SUSIBA2* (25 mM/40 mM) (Fig.17A) và ở các nồng độ Suc khác nhau khi vắng mặt hoặc có mặt SUSIBA1 được biểu hiện quá mức (Fig.17B) gợi ý rõ ràng là SUSIBA1 đóng vai trò là tác nhân ức chế đối với sự biểu hiện *SUSIBA2*. Bất ngờ là, khi *SUSIBA1* bị ức chế, sự cung cấp/biểu hiện quá mức SUSIBA2 có thể tăng cường sự biểu hiện *SUSIBA2*, gợi ý là SUSIBA2/*SUSIBA2* có hoạt tính tự tăng cường khi *SUSIBA1* là thấp hoặc gợi ý rằng hoạt tính tự tăng cường bị cản trở bởi hoạt tính ức chế của SUSIBA1 (Fig. 17C, 19A, 19B). Từ thử nghiệm EMSA trước đây (Fig.8E đến 8J), đã được chỉ ra là SUSIBA1 có thể liên kết hiệu quả với các motif W-box. Việc tìm kiếm các W-box trong đầu 5' xa đáp ứng đường của trình tự khởi động *SUSIBA2* cho thấy W-box. Nhờ việc chấp thuận công nghệ bẫy oligo TF mồi, oligo mồi bao gồm W-box và oligo mồi đối chứng không có W-box bất kỳ được chọn ngẫu nhiên từ trình tự khởi động SUSIBA2 đã được thiết kế (Fig.18A). Khi các oligo mồi được cho thâm nhập đồng thời cùng với *p35S:SUSIBA1,* oligo mồi W-box loại bỏ tác dụng ức chế sự biểu hiện *SUSIBA2* đáp ứng đường của SUSIBA1 (Fig. 18B, 20A, 20B), ngụ ý là W-box trong trình tự khởi động *SUSIBA2* là vị trí liên kết cùng gốc đối với tác nhân ức chế SUSIBA1. Các W-box cũng là đích để hoạt hóa các gen xuôi dòng bởi SUSIBA2. Giả thuyết là SUSIBA1 và SUSIBA2 cạnh tranh đối với W-box trong trình tự khởi động *SUSIBA2*. Cơ sở cho giả thuyết này là sự biểu hiện quá mức của SUSIBA2 ở 40 mM Suc có thể làm tăng sự biểu hiện *SUSIBA2* khi ức chế *SUSIBA1* (Fig. 17C, 19A, 19B), và bẫy oligo mồi W-box gắn đích SUSIBA2 ở nền biểu hiện *SUSIBA1* thấp làm giảm mạnh hoạt động dương của SUSIBA2 trên sự biểu hiện *SUSIBA2* (Fig. 18C, 18D, 21A, 21B). Sự biểu hiện *SUSIBA1* thấp đạt được nhờ nồng độ Suc cao (100 mM, Fig.18D), hoặc bằng cách ức chế asODN (Fig. 17C, 18C, 19A, 19B, 21 A, 21B). Quan sát thấy là, ở 100 mM Suc, sự thâm nhập của cấu trúc *p35S:SUSIBA2* không làm tăng đáng kể sự biểu hiện *SUSIBA2* nội sinh, được phân tích bằng các đoạn mồi đặc hiệu đầu cùng 5' mARN *SUSIBA2* chỉ bao gồm *SUSIBA2* nội sinh mà không bao gồm trình tự cấu trúc này, có thể là do sự dư thừa tác dụng hoạt hóa bởi nồng độ Suc cao và việc đưa vào nội sinh *SUSIBA2* (Fig.18D).

Bằng chứng khác về ý tưởng cạnh tranh W-box được cung cấp bởi các thử nghiệm EMSA chứng minh là với oligo mồi W-box *SUSIBA2* làm đoạn dò, SUSIBA1 có thể ngăn chặn hiệu quả hoạt tính liên kết của SUSIBA2 với W-box (Fig.18E).

Trình tự cis và hoạt tính trans tương ứng trong trình tự khởi động SUSIBA1 tạo thành tác nhân cảm biến đường trong hệ thống đối kháng

Do vai trò đã phát hiện ra của SUSIBA1 trong việc kiểm soát sự biểu hiện *SUSIBA2* theo cách phụ thuộc đường, cơ chế mà theo đó *SUSIBA1* cảm biến đường trở nên cực kỳ quan trọng. Để giải quyết câu hỏi này, các chiến lược giống như vậy được sử dụng như đã mô tả trên đây cho *SUSIBA2* để khảo sát trình tự khởi động *SUSIBA1*. Các thử nghiệm làm mất đoạn trình tự khởi động chỉ ra là trình tự đáp ứng đường nên được đặt ở vùng đầu cùng 5' dài 177 bp của trình tự khởi động *SUSIBA1* và sự xóa bỏ vùng này làm mất hoàn toàn hoạt tính đáp ứng đường của trình tự khởi động *SUSIBA1* (Fig. 22A-22C). Thêm vào đó, sự xóa bỏ toàn bộ trình tự khởi động intron làm giảm đáng kể hoạt tính trình tự khởi động nói chung của *SUSIBA1,* mà tương đương với kết quả được trình bày trong Fig. 3A-3C. Để thu hẹp yếu tố đáp ứng đường trong vùng dài 177 bp, chiến lược bẫy mồi được sử dụng và vùng này được chia thành 6 oligo mồi (Fig. 23A và 23B). Sau khi thâm nhập vào lá đại mạch, các mồi 2 và 3 có thể làm giảm đáng kể sự biểu hiện *SUSIBA1* ở mức đường thấp và vừa, mà có thể cho phép nền biểu hiện *SUSIBA1* để phân tích (Fig. 23C, 24A, 24B). Để phân tích yếu tố *trans* tương ứng tham gia vào hoạt tính đáp ứng đường của *SUSIBA1*, các dịch chiết protein nhân từ lá đại mạch được xử lý ở các nồng độ Suc khác nhau cùng với đoạn ADN bao gồm các mồi 2 và 3, đoạn đối chứng nằm ngoài vùng dài 177 bp (Fig.23A), và mồi 2 và 3, được sử dụng trong các thử nghiệm EMSA (Fig.23D). EMSA hình ảnh hóa hoạt tính yếu tố *trans* mà có thể liên kết với đoạn 1 và mồi 2, nhưng không liên kết với đoạn 2 và mồi 3.. Yếu tố *trans* có thể là yếu tố điều hòa dương vì hoạt tính của nó tương quan với sự biểu hiện *SUSIBA1*. Việc kiểm tra chi tiết trình tự mồi 2 cho thấy là nó chứa motif TTATC mà giống với yếu tố ức chế đường đã được nhận diện (sugar-repressive element: SRE).

Tầm quan trọng của trình tự khởi động 5' dài 177 bp *SUSIBA1*và yếu tố *trans* cùng gốc đã phát hiện được trong quá trình tổng hợp fructan được chứng minh bằng các thử nghiệm EMSA sử dụng hai kiểu gen đại mạch khác nhau, cây fructan cao 155, và cây fructan thấp 181 (Fig. 25A-25C). Dữ liệu giải trình tự và các kết quả EMSA chứng minh vai trò của hoạt tính yếu tố *trans* là yếu tố quyết định đối với hàm lượng fructan ở đại mạch (Fig. 25A-25C).

Bộ máy phân tử điều khiển sự điều hòa tổng hợp tinh bột và fructan phối hợp ở đại mạch đã được chứng minh. Mạch điều hòa này bao gồm hai chức năng đối lập (hệ thống

đối kháng) được thực hiện bằng cách khóa liên động các gen *SUSIBA1* và *SUSIBA2* TF (Fig. 26A, 26B). Ở trung tâm của hệ thống này, sự liên kết cạnh tranh của hai TF với W-box trong vùng ức chế đường của trình tự khởi động *SUSIBA2* đóng vai trò là cơ chế thích ứng bên trong để tự điều hòa hệ thống đối kháng này. Các kết quả này gợi ý là sự liên kết cạnh tranh SUSIBA1/SUSIBA2 nói chung trong hệ thống này đóng vai trò quan trọng trong việc làm chậm quá trình tổng hợp tinh bột đến mức đường cao hơn so với mức đường cần thiết để tổng hợp fructan (Fig. 4A, 4B). Mức đường cao hơn tạo ra điều kiện không có hoặc có ít SUSIBA1 hơn mà cho phép biểu hiện tăng dần và liên kết SUSIBA2 với W-box trong việc tăng cường sự biểu hiện *SUSIBA2* để điều hòa tăng sự tổng hợp tinh bột. Yếu tố *trans* được huy động làm tác nhân hoạt hóa đối với yếu tố trình tự khởi động intron của trình tự khởi động *SUSIBA1* và đóng vai trò là tác nhân cảm biến đường cuối cùng trong các con đường truyền tín hiệu đường phức tạp của hệ thống này. Kết quả này cũng gợi ý là sự cảm ứng bộ máy điều hòa để tổng hợp tinh bột và fructan được khởi động bởi sự nhập bào của photosynthate (Suc) và được gây ra bởi sự truyền tín hiệu Glc/Fru, trong khi T6P dường như không tham gia vào trong các điều kiện thử nghiệm (Fig. 6A-6D, 7A-7D). Vai trò tiềm tàng của T6P trong việc điều hòa trong các điều kiện nồng độ đường cao hơn (nghĩa là, > 85 mM) và dưới ánh sáng không thể bị loại trừ. Sự tích lũy tinh bột cao trong các mẫu được xử lý bằng Glc (85 mM) (Fig.6A và 6B) có thể là do Glc là chất chuyển hóa trung tâm trong con đường tổng hợp tinh bột. Động học của sự chuyển hóa fructan trong các cơ quan tích trữ của đại mạch đã suy luận ở đây (Fig. 15A, 15B) có thể chỉ ra nhu cầu về sự cân bằng kích thước bể của Suc và hexoza trong các cơ quan sản xuất (source) và tích trữ (sink) hoặc để điều chỉnh áp suất thẩm thấu để điều khiển sự chuyển Suc ra khỏi các mô tích trữ.

Mô hình liên kết yếu tố phiên mã cạnh tranh cảm biến đường (Fig. 26A, 26B) để điều khiển sự tổng hợp tinh bột và fructan trong các cây thân cỏ ôn đới được đề xuất ở đây có thể được sử dụng trong các chương trình nhân giống bằng cách chọn lọc nhờ chỉ thị phân tử hoặc các phương pháp chuyển gen để thay đổi mức tinh bột và fructan trong, ví dụ, các cây đại mạch và lúa mì để đáp ứng nhu cầu về thực phẩm, thức ăn gia súc cụ thể và các ứng dụng công nghiệp. Sự ức chế hoạt tính *trans* hoặc sự xóa bỏ trình tự khởi động intron *SUSIBA1* bằng các công nghệ chuyển gen hoặc công nghệ biên tập bộ gen có thể làm tăng hiệu quả hàm lượng fructan và tinh bột một cách đồng thời. Phân tích số liệu phát sinh loài chỉ ra là các trình tự intron thứ hai của *SUSIBA2* hoặc các phần chính của trình tự

khởi động *SUSIBA1* được bảo tồn trong ba loài cây trồng quan trọng, đại mạch, lúa mì và lúa và đặc biệt là giữa đại mạch và lúa mì (Fig.27). Hệ thống đối kháng SUSIBA1/SUSIBA2 được kiểm soát bằng đường có thể tồn tại ở các loài cây trồng để điều hòa sự tổng hợp tinh bột và các hydrat cacbon khác. Vì lúa không tích lũy fructan, còn sự tổng hợp hydrat cacbon nào khác ngoài tinh bột được điều hòa bởi hệ thống này ở loài này cần được minh họa.

Việc ứng dụng phương pháp agroinfiltration làm công cụ nghiên cứu ở cây một lá mầm, được giới thiệu ở đây, có nhiều hứa hẹn để phát triển sự hiểu biết về chức năng gen ở cây ngũ cốc và cây thân cỏ. Ngoài ra, như được minh họa ở đây, sự kết hợp của phương pháp agroinfiltration, bẫy oligo mồi và phương pháp tiếp cận asODN làm tăng đáng kể tính hữu ích của các công nghệ được sử dụng ở sinh học thực vật cho phân tích chức năng gen và trình tự khởi động.

Trình tự khởi động bên trong (*SUSIBA1* p) trong bộ gen thực vật mà gây ra sự biểu hiện của protein có các chức năng khác với các chức năng của sản phẩm được mã hóa bởi gen neo (*SUSIBA2*) có thể có các tác động đáng kể đối với các bộ gen thực vật, ở chỗ nó tác động đến chú giải của các gen, dự đoán chức năng gen và các sản phẩm, và giải thích các kiểu hình bị loại bỏ gen.

Bông lúa đại mạch dài liên quan đến mức SUSIBA2 cao và bông ngắn liên quan đến SUSIBA1 cao

Các cây ngũ cốc là nguồn thực phẩm quan trọng nhất đối với loài người và năng suất ngũ cốc là vấn đề được quan tâm nhất đối với an ninh lương thực toàn cầu. Năng suất ngũ cốc phụ thuộc vào một số yếu tố, như số lượng bông lúa, kích thước bông lúa và khối lượng một nghìn hạt. Kích thước bông lúa là một trong các yếu tố chính quyết định năng suất ngũ cốc. Đã được báo cáo trước đây là đột biến trong gen mã hóa yếu tố phiên mã kiểu tác nhân ức chế ở đại mạch tạo ra đại mạch sáu hàng từ đại mạch hai hàng. Đại mạch sáu hàng này có sự tăng năng suất theo lý thuyết là ba lần so với đại mạch hai hàng. Tuy nhiên, điều gì quyết định độ dài bông lúa ngũ cốc theo chiều dọc vẫn là thách thức cần làm sáng tỏ.

Vì SUSIBA2 có thể làm tăng sức tích trữ trong các mô dự trữ, SUSIBA2 có thể làm tăng độ dài bông lúa với số lượng hạt nhiều hơn bằng cách hướng sucroza đến các bông lúa đang phát triển nhiều hơn trong quá trình đầy hạt. Nhiều đường sẵn có hơn đến các bông lúa đang phát triển, nghĩa là, hợp tử đang phát triển, có thể cứu các hạt đã được tạo

thành và ngăn ngừa sự phát triển không đầy đủ của chúng trong các bông lúa đang phát triển trong quá trình đầy hạt. Trong các dòng con của các giống đại mạch được lai 155 (hoặc SLU7) và 199 (hoặc KVL1113), hai loại bông lúa đại mạch được tạo ra, ngắn (8-10 cm) và dài (13-15 cm), xem Fig. 31. Việc kiểm tra cẩn thận sự biểu hiện gen ở các bông lúa đang phát triển quanh giai đoạn thụ phấn, nghĩa là, thời gian thụ tinh cho trứng, chỉ ra là sự biểu hiện cao của SUSIBA2 luôn có liên quan đến bông lúa dài, panen dưới trong Fig. 32. Hiện tượng này ngay lập tức đặt ra câu hỏi quan trọng và hấp dẫn, SUSIBA2 có phải là yếu tố quyết định di truyền về độ dài bông lúa hay không.

Trong nhiều năm nghiên cứu về các con đường truyền tín hiệu đường ở đại mạch, gen SUSIBA2 đại mạch được phát hiện ra là nằm trên nhiễm sắc thể 2. Locut SUSIBA2 sử dụng hai trình tự khởi động luân phiên để tạo ra hai yếu tố phiên mã SUSIBA1 và SUSIBA2, xem Fig. 26A, 26B. Trình tự khởi động SUSIBA1 được đặt trong intron thứ hai và đầu 5' của exon thứ ba của SUSIBA2. Do đó, SUSIBA1 là khoảng một nửa đầu cùng C của SUSIBA2. SUSIBA1 là tác nhân ức chế của SUSIBA2 và ngăn cản SUSIBA2 tự hoạt hóa biểu hiện. Các trình tự khởi động SUSIBA1 và SUSIBA2 đáp ứng khác nhau với các đường. Khi mức đường là thấp, phức hợp protein kiểu hoạt hóa được kiểm soát bởi đường chưa được xác định tăng cường sự biểu hiện SUSIBA1. SUSIBA1 liên kết với trình tự khởi động SUSIBA2. Sự biểu hiện cao của SUSIBA1 ngăn cản sự biểu hiện SUSIBA2. Khi đường là cao, hoạt tính hoạt hóa được kiểm soát bởi đường bị giảm và sự biểu hiện SUSIBA1 bị giảm. Sự giảm biểu hiện SUSIBA1 giải phóng sự biểu hiện SUSIBA2 theo kiểu lũy tiến. Khi đường cao liên tục, SUSIBA1 ít hơn gây ra sự biểu hiện cao của SUSIBA2. SUSIBA2 với mức ngày càng tăng liên kết với trình tự khởi động gen của chính nó bằng cách liên kết cạnh tranh với SUSIBA1 và tự tăng cường sự biểu hiện của riêng nó để điều hòa tăng các gen xuôi dòng như gen tinh bột.

Nguyên liệu và phương pháp

Nguyên liệu thực vật và các điều kiện sinh trưởng

Các hạt đại mạch của các giống *Hordeum vulgare* Golden Promise, SLU 7 (giống 155), và KVL 301 (giống 181) thu được lần lượt từ Ngân hàng Gen Bắc Âu, trường đại học Khoa học nông nghiệp Thụy Điển (SLU) và trường đại học Nông nghiệp và thú y Hoàng gia (KVL). Golden Promise được trồng trong 16 giờ chiếu sáng ở 22°C, 8 giờ trong bóng tối ở 18°C, độ ẩm tương đối 70% với cường độ chiếu sáng là 400 μmol m^{-2} s^{-1}, SLU

7 và KVL 301 lần lượt ở 24/16°C và 18/10°C. Các điều kiện sinh trưởng khác là tương tự với các điều kiện đã mô tả trước đây [6]. Các giai đoạn phát triển của đại mạch được theo dõi theo thang Zadoks [18], hoặc số ngày sau khi ra hoa (daf) đối với các hạt đang phát triển. Các lá thứ hai từ các cây giống đại mạch bốn tuần tuổi được sử dụng cho thử nghiệm cảm ứng đường, ức chế asODN và các thử nghiệm khác.

Oligonucleotit

Các oligonucleotit được sử dụng trong sáng chế được liệt kê trong Bảng 1. Chúng được mua từ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Tách dòng phân tử và sàng lọc thư viện cADN

Các plasmit chứa *GFP, BFP* và *GUS* thu được như đã mô tả [1, 7], Arabidopsis *WRI1* được khuếch đại từ số truy cập Ngân hàng Gen NM_202701. Tất cả các quy trình để tách dòng phân tử là như đã mô tả [1, 2, 4, 8], 5'-RACE được thực hiện theo kit Gene Race®core (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Việc sàng lọc thư viện cADN được thực hiện như được mô tả [1, 8].

Cảm ứng sucroza và ức chế asODN

Các thử nghiệm có sự cảm ứng sucroza và ức chế asODN là như được báo cáo trước đây [1, 2, 4, 5, 9]. Nói ngắn gọn, các cây đại mạch được giữ trong bóng tối trong 24 giờ để tiêu thụ hết đường và sau đó được sử dụng cho các thử nghiệm này. Lá thứ hai từ ngọn của các cây giống 4 tuần tuổi được hái và được ủ trong nhiều nồng độ khác nhau của sucroza có hoặc không có các ODN. Để cảm ứng sucroza, nước và sorbitol được sử dụng làm đối chứng. Để ức chế asODN, các ODN có nghĩa được sử dụng làm đối chứng.

Agroinfiltration

Quá trình agroinfiltration được thực hiện theo quy trình đã công bố cho các cây hai lá mầm [10] có các cải biến nhỏ. Các cây giống con của các cây 4 tuần tuổi được giữ trong bóng tối trong 24 giờ để tiêu thụ hết đường. Lá thứ hai từ ngọn được thâm nhập cùng với vi khuẩn agrobacterium chứa cấu trúc AGL1 được tạo huyền phù trong các dung dịch khác nhau đến các nồng độ OD giống nhau để tối ưu hóa điều kiện agroinfiltration cho hiệu quả biến nạp tương đương như đã mô tả [10]. Sau khi thâm nhập, lá hoặc các cây được ủ trong

bóng tối có hoặc không có các dung dịch khác nhau trong 48 giờ nữa trước khi phân tích qPCR hoặc 72 giờ trước khi quan sát dưới đèn UV và kính hiển vi ở bước sóng 460-500 nm đối với GFP và 340-380 nm đối với BFP. Các trình tự khác nhau được dung hợp với các gen chỉ thị và được biến nạp với vi khuẩn agrobacterium và được thâm nhập vào lá đại mạch.

Thử nghiệm bẫy oligo mồi

Mồi oligodeoxynucleotit được tạo ra bằng cách gắn mồi oligonucleotit trong Tris-HCl 14 mM, độ pH=8,0, và $MgCl_2$ 7 mM, sau đó pha loãng đến nồng độ làm việc là 25 µM để thâm nhập vào lá đại mạch. Đối với phân tích sản phẩm phiên mã qPCR, các vùng đã được thâm nhập được sử dụng để phân lập ARN 48 giờ sau khi thâm nhập. Đối với phân tích bằng kính hiển vi huỳnh quang, các vùng đã thâm nhập được sử dụng 72 giờ sau khi thâm nhập.

Phân tích thấm tách Northern và Western

Phân tích thấm tách Northern và Western được thực hiện như đã mô tả [1]. cADN của *SUSIBA2* được sử dụng làm đoạn dò cho phân tích Northern và kháng thể kháng 6-SFT đại mạch, món quà từ Tiến sỹ Martinez-Carrasco, được sử dụng cho phân tích thấm tách Western. Profin đầy đủ điển hình của các protein được nhuộm bằng Coomassie và các dải phản ứng miễn dịch trên vết từ cùng một lượng nạp được chỉ ra trong Fig.6D. Phân tích thấm tách Western cho SUSIBA1 và SUSIBA2 được chạy trên các vết khác nhau thay vì trên các vết giống nhau do phản ứng chéo của kháng thể kháng lại chiều dài đầy đủ của peptit SUSIBA2 với SUSIBA1 là yếu hơn so với với SUSIBA2.

Phân tích qPCR

PCR thời gian thực định lượng (qPCR) được thực hiện như đã mô tả trước đây [2,11], mức độ biểu hiện tương đối của *SUSIBA1* được tính bằng cách lấy giá trị delta Ct của *SUSIBA1+2* trừ đi giá trị đó của *SUSIBA2,* nghĩa là, giá trị delta Ct của *SUSIBA1* = giá trị delta Ct của *SUSIBA1+2* - giá trị delta Ct của *SUSIBA2* sử dụng cùng một gen giữ nhà (house-keeping gene) (hoặc gen tham chiếu).

Kính hiển vi

Kính hiển vi huỳnh quang và kính hiển vi đồng tiêu là như đã mô tả [2], cường độ huỳnh quang tương đối được đo bằng phần mềm ImageJ [19].

Phân lập protein nhân

Các lá đại mạch được xử lý bằng 0 mM, 50 mM và 100 mM Suc trong hai ngày, và các protein nhân được phân lập như đã mô tả trước đây [12], các protein nhân từ các hạt 9 daf của các giống 155 và 181 được phân lập theo cùng một quy trình.

EMSA

Thử nghiệm điện di dịch chuyển di động (EMSA) được thực hiện theo như đã mô tả trên đây [1, 12]. Nói ngắn gọn, các protein SUSIBA1 và SUSIBA2 được biểu hiện quá mức được tinh chế hoặc các protein nhân đại mạch được phân lập và được sử dụng cho EMSA. Các đoạn dò đoạn ADN được đánh dấu đầu cùng bằng [γ^{32}P]-ATP với PNK (T_4 polynucleotit kinaza). Đối với các đoạn dò oligo, một chuỗi được đánh dấu đầu cùng bằng [γ ^{32}P]-ATP với PNK và được gắn mồi với chuỗi bổ sung của oligo ở 14 mM Tris (độ pH=8,0) và 7 mM $MgCl_2$. Các gel agaroza được sử dụng cho các đoạn ADN lớn và gel polyacrylamit cho các đoạn oligonucleotit. Đối với các thử nghiệm cạnh tranh, 0,2 µg SUSIBA2 được biểu hiện quá mức được ủ kèm theo bổ sung tăng dần SUSIBA1 được biểu hiện quá mức với 0,0125, 0,025, 0,05, 0,1 và 0,2 µg vào các phản ứng liên kết. Gel polyacrylamit 6% được sử dụng và điện thế hằng định 160 V được sử dụng.

Thiết kế thử nghiệm, phân tích thống kê và tin sinh học

Các bộ ba sinh học (biological triplicate) và bộ ba kỹ thuật (technical triplicate) được sử dụng ngoại trừ phân tích tinh bột và fructan, trong đó các bộ đôi kỹ thuật (technical duplicate) được sử dụng theo quy trình của nhà sản xuất (Megazyme, Bray, Co. Wicklow, Ireland). Các phương pháp ANOVA một chiều [13] và tin sinh học [11] được sử dụng để phân tích. Cây phát sinh loài được tạo ra bằng chương trình DNASTAR lasergene phiên bản 12.

Xác định fructan, tinh bột, Glc, Fru, và T6P

Fructan, tinh bột và fructoza và glucoza nội sinh được chiết và được phân tích như được mô tả [2,11] và theo các quy trình được cung cấp trong kit từ Megazyme (Bray, Co.

Wicklow, Ireland). Trehaloza 6-phosphat nội sinh được phân lập theo quy trình đã mô tả một cách chính xác [14] và được phân tích bằng kỹ thuật sắc ký lỏng-phép đo phổ khối lượng (LC/MS) như đã mô tả trên đây [15]. Các phân tích LC/MS được thực hiện trên Agilent 1100 HPLC kết hợp với máy đo khối phổ bẫy ion Amazon Speed ETD (Bruker Daltonics, Bremen, Đức). Các bước tách được thử trên cột Accucore-150-HILIC-Amide (2,1 x 150 mm) với các hạt cỡ 2,6 µm từ Thermo Scientific (USA) ở 25°C. Tốc độ dòng được duy trì ở 200 µl phút^{-1} và thể tích tiêm là 20 µl được sử dụng cho cả chuẩn và các phần chiết. Pha động là như đã được mô tả [15]. Máy đo khối phổ bẫy ion được vận hành bằng cách sử dụng phương pháp ion hóa tia điện (Electro Spray Ionization: ESI) ở chế độ âm và khối phổ thu được trên khoảng quét là m/z 50-500.

Thử nghiệm trehaloza 6-phosphat synthaza

Thử nghiệm trehaloza 6-phosphat synthaza được thực hiện như đã mô tả trên đây [16] ngoại trừ là thời gian và nhiệt độ phản ứng đầu tiên được đặt lần lượt ở 120 phút và 25°C. Hoạt tính enzym được thể hiện bằng sự giảm độ hấp thụ NADH ở 340 nm mỗi phút trong phản ứng thứ hai.

Bảng 1 - các oligonucleotit

Tên đoạn mồi	Tên gen	SEQ ID NO	Trình tự đoạn mồi (5'→3')
ExtF	*HvSUSIBA2*	1	AAGCTTGCTCCTGCTATGAGTGATCT
ExtR		2	GTCGACTTCACAATTAGGATGTGTGCAC
In+ExtF	*HvSUSIBA2*	3	AAGCTTGTACACAACCTTTAATTTTCTT
GFPF1	*GFP*	4	GTCGACATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
GFPR1		5	GAGCTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
RandomF	*GUS*	6	AAGCTTAACTGCATCAGCCGATTATCAT
RandomR		7	GTCGACGTGGTGGCTAGCTTGTTTGC
35SF	*35S* p	8	GAGCTCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAG
35SR		9	GTCGACAGTCCCCCGTGTTCTCTCC
WRIF	*AtWRI1*	10	GTCGACTCTCAGAGTTTAATGAAGAAGCG
WRIR		11	CACGTGGGCAAAGACATTGATTATTC
p6-SFTF	*Hv6-SFT* p	12	GGGAGCTCTCCGTAGTAAAAGAAACAGG
p6-SFTR		13	CGGAATTCTTTGTAGGCGTACGGTAGCGG
GFPF2	*GFP*	14	CGGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
GFPR2		15	GGCACGTGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
SU1F1	*HvSUSIBA2*	16	GGGTCGACATGGTTGAGCCTGTTCCAGC
SU1R1		17	AACACGTGTCATGGACCCATGCCCAAGT
SU1R2		18	CGGAATTCTGGACCCATGACCAAGTTC
pSUSIBA2F	*HvSUSIBA2* p	19	GGGAGCTCGAGGTAAAACCCTACATCCT
pSUSIBA2R		20	TTAAGCTTTCTCATGTAGTAATCATACGGTGGG

BFPF	*BFP*	21	TTAAGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
BFPR		22	AACACGTGCTATTTGTACAGCTCGTCCATGC
pSu1TR1F	*HvSUSIBA2*	23	GCAAGCTTTGTTGCCTCTCTTTTGTAAA
pSu1TR2F	*HvSUSIBA2*	24	GCAAGCTTGGTAGAGTTTGAAGGAAGTA
pSu2F	*HvSUSIBA2* p	25	GCAAGCTTGAGGTAAAACCCTACATCCT
pSu2TR1F		26	GCAAGCTTCCCGCGACCCGAGGACCTCT
pSu2TR2F		27	GCAAGCTTTGGCTATCTCTCTTTGTTGA
pSu2TRR		28	AAACTAGTTCTCATGTAGTAATCATACG
GFPSpeIF	*GFP*	29	AAACTAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
Su2FXhoI	*HvSUSIBA2*	30	AACTCGAGATGTCCCCCGCGCGGCTGCC
Su2RXhoI		31	AACTCGAGTCATGGACCCATGACCAAGT
Su1AntiSense1	*HvSUSIBA1*	32	GCTATTCATCTGCTGCGG
Su1Sense1	*HvSUSIBA1*	33	CCGCAGCAGATGAATAGC
Su1AntiSense2	*HvSUSIBA1*	34	TCCTATTGGGCTGGGGCT
Su1AntiSense3	*HvSUSIBA1*	35	GCTCAACCATACCAGGCG
Su1AntiSense4	*HvSUSIBA1*	36	GTCTTCCACCTCCAGCAT
Su1AntiSense5	*HvSUSIBA1*	37	ACCAGCAGACTCCATTTT
Su2AntiSense1	*HvSUSIBA2*	38	CGCGGGGGACATGGCCTT
Su2Sense1	*HvSUSIBA2*	39	AAGGCCATGACCCCCGCG
Su12Rev1	*HvSUSIBA2*	40	TCAACCTCACTTACAGTTTG
Su12Rev2		41	GTGATGCTCTCTCAACATGC
SUSIBA1+2F	*HvSUSIBA2*	42	TTGATCTTGGTGTTGGAATCA
SUSIBA1+2R		43	CCCATGGTTTGCATTTGATA
SUSIBA2F	*HvSUSIBA2*	44	TGAATGAAAACAGACCTCCC
SUSIBA2R		45	ATGTACCAACTTCAGCAGGC
6-SFTF	*Hv6-SFT*	46	GACGAACGGCACGACTACTA
6-SFTR		47	ATAGAAGGAGGTGGACGCAT
AtWRI1F	*AtWRI1*	48	CGTGGTGGGAAGAGAGAGC
AtWRI1R		49	TGTTGATGAAGCAGAGTCAGTAGA
SBEIIbF	*HvSBEIIb*	50	AGACGAGGCGGGGTCAGTTG
SBEIIbR		51	TCCCCGCCGCGGAAACTGC
1-FEHF	*Hv1-FEH*	52	GCGGTGGAGAGCTTCGGTG
1-FEHR		53	GCGCTGAGCTGTGGCACC

6-FEHF	*Hv6-FEH*	54	TGTACCCTGAGCACGCCG
6-FEHR		55	GCCAGCCTCCATGCTTCG
TPSF	*HvTPS-like*	56	AACGGACGGGTCAGTCATCG
TPSR		57	CCACCAGGCCCTTGCTCACG
UbiquitinF	*HvUbiquitin*	58	GCCAAGAAGCGCAAGAAGAAGA
UbiquitinR		59	GGTCGAAGTGGTTGGCCATGA
QSUSIBA2UTRF	*HvSUSIBA2*	60	GCGGGCGCGAGGTACAAGGC
QSUSIBA2UTRR		61	AGTTGGTGAGGAGCACGGGG
SP8aF	*Hv6-SFT* p	62	CTGTACTGTGTTTTTAGCCT
SP8aR		63	GACATGACACAAAAATCGGA
SUREaF		64	CACACATGGCACGCCAAAAC
SUREaR		65	GTGTGTACCGTGCGGTTTTG
W-boxF		66	TTATTTTGACCATATATACG
W-boxR		67	AATAAAACTGGTATATATGC
SP8aMF		68	CTGTAAAAAAAATTTAGCCT
SP8aMR		69	GACATTTTTTTTAAATCGGA
W-boxMF		70	TTATTAAAAAAATATATACG
W-boxMR		71	AATAATTTTTTTATATATGC
SUREaM1F		72	CAAAAATGGCACGCCAAAAC
SUREaM1R		73	GTTTTTTCCGTGCGGTTTTG
SUREaM2F		74	CACACAAAAAACGCCAAAAC
SUREaM2R		75	GTGTGTTTTTTGCGGTTTTG
SUREaM3F		76	CACACATGGCAAAAAAAAAC
SUREaM3R		77	GTGTGTACCGTTTTTTTTTG
SUREaM4F		78	CAAAAAAAAAAAAAAAAAAC
SUREaM4R		79	GTTTTTTTTTTTTTTTTTTG
pSU1 Decoy1S	*HvSUSIBA2*	80	GTACACAACCTTTAATTTTCTTTTCTG
pSU1 Decoy1AS		81	CATGTGTTGGAAATTAAAAGAAAAGAC
pSU1 Decoy2S		82	TGTCCTATAGAGATTAATGCACTTTATCTT
pSU1 Decoy2AS		83	ACAGGATATCTCTAATTACGTGAAATAGAA
pSU1 Decoy3S		84	GCAGAACATTAAGATGAAATTTAAGCATTT
pSU1 Decoy3AS		85	CGTCTTGTAATTCTACTTTAAATTCGTAAA
pSU1 Decoy4S		86	TGTTTCTAGATGACCCTGCAACTTTTTTTG

pSU1 Decoy4AS		87	ACAAAGATCTACTGGGACGTTGAAAAAAAC
pSU1 Decoy5S		88	GCCTTTATTGTGCATATTATATAATTTGGC
pSU1 Decoy5AS		89	CGGAAATAACACGTATAATATATTAAACCG
pSU1 Decoy6S		90	CAGGTTCTTGAATTGTTGCATAATTCATAA
pSU1 Decoy6AS		91	GTCCAAGAACTTAACAACGTATTAAGTATT
pSU2 W-boxS	*HvSUSIBA2* p	108	TAGGTCGTCAATTTGACTTATATAAAATAT
pSU2 W-boxAS		109	ATATTTTATATAAGTCAAATTGACGACCTA
pSU2 Decoy1S		110	GCTTCATCAACGTATCCGCACGTTACACGG
pSU2 Decoy1AS		111	CCGTGTAACGTGCGGATACGTTGATGAAGC

Nguyên liệu và phương pháp

Các giống đại mạch

253 giống đại mạch được thu hoạch. Trong số chúng, 12 giống được phân tích chi tiết trong các phân tích khác nhau [22]. Từ 12 giống này, bốn giống (155, 199, 224 và 235) được chọn để lai giống trong nghiên cứu này cho đại mạch fructan hạt cao.

Trồng cây

Các phòng khí hậu thực vật hiện đại ở SLU được sử dụng để trồng cây như đã mô tả trên đây và trong [22].

Sinh học phân tử

Các trình tự của SUSIBA1 và SUSIBA2 được sử dụng làm đoạn dò ADN và các kháng thể kháng SUSIBA1 và SUSIBA 2, SBEIIb và 6-SFT [1] được sử dụng làm đoạn dò protein để sàng lọc các dòng con sau khi lai. Các thử nghiệm khác như qPCR, thấm tách Western, kính hiển vi và v.v. được thực hiện như đã mô tả trên đây.

Phân tích hydrat cacbon

Phân tích fructan và β-glucan được thực hiện theo các quy trình đã công bố [11, 20, 21, 22].

Lai giống đại mạch

Việc sàng lọc các biến đổi di truyền về mức biểu hiện SUSIBA1 trong số các giống đại mạch tạo ra nhiều dòng có nhiều mức biểu hiện khác nhau của SUSIBA1. Trong số

chúng, các giống 155 và 199 là các giống có sự biểu hiện thấp của SUSIBA1 và được chọn để lai với các giống 224 và 235, trong đó sự biểu hiện SUSIBA1 là cao và hoạt tính thủy phân fructan là thấp. Việc lai các giống này được thực hiện để kiểm tra xem sự biểu hiện SUSIBA1 thấp và hoạt tính thủy phân fructan thấp có thể được kế thừa cho các dòng con hay không. Các giống được trồng trong nhà khí hậu thực vật và được sử dụng để lai giống theo kỹ thuật lai giống như đã mô tả trên đây [23]. Các dòng con sau khi lai được sử dụng cho nhiều phân tích khác nhau trong quá trình sàng lọc.

Kết quả

Hệ thống âm dương được sử dụng làm chất chỉ thị phân tử để theo dõi hoạt tính tổng hợp fructan, và hai gen enzym thủy phân, 1-FEH và 6-FEH, được sử dụng làm gen chỉ thị để theo dõi hoạt tính thủy phân fructan trong quá trình phát triển hạt đại mạch. Trọng tâm là vào hoạt tính tổng hợp cao ở giai đoạn sớm (9 ngày sau khi ra hoa) và hoạt tính thủy phân thấp ở giai đoạn muộn (22 ngày sau khi ra hoa). Từ 12 giống đại mạch, hai giống (giống 155 và 199) mà có hoạt tính tổng hợp cao ở giai đoạn sớm và hai giống (giống 224 và 235) mà thể hiện hoạt tính thủy phân thấp ở giai đoạn muộn được xác định. Bốn giống này được sử dụng để lai giống để làm tăng hàm lượng fructan hạt. Ý tưởng này là kết hợp hoạt tính tổng hợp cao với hoạt tính thủy phân thấp để tăng cường sự tích lũy fructan trong quá trình phát triển hạt. Ở các dòng con F_1 sau khi lai, năm dòng con có hàm lượng fructan tương đối cao được chọn để theo dõi sự phân ly của các tính trạng hàm lượng fructan. Năm dòng con này là ♀199x♂155, ♀155x♂199, ♀224x♂155, ♀224x♂199 và ♀199x♂235. Trong quá trình phát triển hạt, các dòng con đã chọn tích lũy ngày càng nhiều fructan qua các giai đoạn phát triển, đặc biệt là ở các giai đoạn muộn 22 ngày sau khi ra hoa và ở các hạt thành thục (Fig.33) chỉ ra rằng hoạt tính thủy phân thấp ở các giống 224 và 235 đã được đưa vào các dòng con này, mà dẫn đến sự tích lũy cao hơn so với cha mẹ 155 và 199. Đã quan sát thấy rằng khi các dòng con này là đồng hợp tử, các dòng ♀224x♂155 không có vỏ (trần), ♀224x♂199 không có vỏ (trần) sản sinh hàm lượng fructan hạt cao nhất với hàm lượng fructan từng cây lên đến hơn 13% mỗi khối lượng khô (DW) mà không ảnh hưởng đến khối lượng một nghìn hạt (TKW) (Fig. 34 và 35). Trong quá trình sàng lọc, hai loại hạt được quan sát thấy, hạt tròn và hạt dẹt ở các dòng con (Fig.36A). Khi hàm lượng fructan hạt trung bình được đo, hàm lượng fructan cao đi kèm theo kiểu hình hạt dẹt (Fig. 36B, 36C). Bất ngờ là, hàm lượng fructan cao ở các hạt dẹt có liên quan mật thiết với hàm lượng

β-glucan cao, ngụ ý là hệ thống âm dương này có thể kiểm soát sự tổng hợp β-glucan (Fig.36).

Ngoài ra các tính trạng khác liên quan đến năng suất cũng được nghiên cứu. Quan trọng là, hàm lượng fructan hạt cao và β-glucan cao trong các hạt dẹt này không ảnh hưởng đến các tính trạng: độ cao cây, số lượng bông lúa, số lượng hạt và TKW, thậm chí có sự tăng nhẹ TKW so với giống 155 (Fig. 35).

Trong các dòng con của các giống đại mạch đã lai 155 và 199, hai loại bông đại mạch được quan sát thấy, ngắn (8-10 cm) và dài (13-15 cm) (Fig. 31). Việc kiểm tra cẩn thận sự biểu hiện gen ở các bông lúa đang phát triển quanh giai đoạn thụ phấn (thời gian thụ tinh cho trứng) chỉ ra là sự biểu hiện cao của SUSIBA2 và sự biểu hiện thấp của SUSIBA1 luôn luôn đi kèm theo bông lúa dài (Fig. 32). Được giả thuyết là SUSIBA2 có thể là nhân tố quyết định di truyền về chiều dài bông lúa và hệ thống âm dương này có thể điều hòa độ dài của bông đại mạch. Giả thuyết này dựa trên chức năng của SUSIBA2 và rằng SUSIBA2 có thể làm tăng sức tích trữ trong các mô dự trữ và có thể làm tăng độ dài bông lúa với số lượng hạt nhiều hơn bằng cách hướng sucroza đến các bông lúa đang phát triển nhiều hơn trong quá trình đầy hạt. Cũng được gợi ý ở [24], nhiều đường sẵn có hơn đến các bông lúa đang phát triển chứa các hợp tử đang phát triển có thể cứu các hạt đã được tạo thành và ngăn ngừa sự phát triển không đầy đủ của chúng trong các bông lúa đang phát triển trong quá trình đầy hạt.

Các phương án được mô tả trên đây cần được hiểu là các ví dụ minh họa theo sáng chế. Sẽ được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là nhiều cải biến, tổ hợp và thay đổi có thể được tạo ra cho các phương án này mà không vượt ra khỏi phạm vi của sáng chế. Cụ thể là, các giải pháp bộ phận khác nhau trong các phương án khác nhau có thể được kết hợp theo các cấu hình khác, mà khả thi về mặt kỹ thuật. Tuy nhiên phạm vi của sáng chế được xác định bởi bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo đây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sun và đồng tác giả, *Plant Cell* 2003,15: 2076-2092
2. Sun và đồng tác giả, *Plant J.* 2005,44:128-138
3. Su và đồng tác giả, *Nature* 2015, 523: 602-606
4. Sun và đồng tác giả, *Plant J.* 2007, 52:1192-1198
5. Xie và đồng tác giả, *Plant J.* 2014, 77: 954-961

6. Nalawade và đồng tác giả, *Appl. Energy* 2012, 91:405-411
7. McCluskey, *Adv. Appl. Microbiol.* 2003, 52: 245-262
8. Sun và đồng tác giả, *Plant Physiol.* 1998,118: 37-49
9. Sun và đồng tác giả, *Plant Signal. Behav.* 2008, 3: 328-330
10. Wood và đồng tác giả, *Plant Biotechnolol. J.* 2009, 7: 914-924
11. Zhang và đồng tác giả, *BMC Plant Biol.* 2012,12: 230
12. Sun và đồng tác giả, *Plant Mol. Biol.* 1999, 40:431-443
13. Liu và đồng tác giả, *Nat. Med.* 2014, 20: 272-282
14. Lunn và đồng tác giả, *Biochem J.* 2006, 397:139-148
15. Antonio và đồng tác giả, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008, 22:1399-1407
16. De Smet và đồng tác giả, *Microbiology* 2000,146:199-208
17. Đơn sáng chế Mỹ số 2006/0191037
18. Zadoks và đồng tác giả, *Weed Res* 1974,14:415-421
19. Collins, *Biotechniques* 2007, 43: 25-30
20. McCleary and Codd, *J Sci Food Agric* 1991, 55: 303-312
21. McCleary và đồng tác giả, *JAOAC International* 2000, 83: 356-364
22. Nemeth và đồng tác giả, *Food Nutr Sci* 2014, 5: 581-589
23. Poehlman and Sleper, Breeding Field Crops, Fourth Edition (Ames, Iowa: Iowa State University Press) 1995
24. Tuncel and Okita, *Plant Sci* 2013, 211: 52-60

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> SUN, Chuanxin

<120> NGUYÊN LIỆU THỰC VẬT SẢN XUẤT HYDRAT CACBON
<130> P1360PC00
<150> US 62/479374
<151> 31-03-2017
<150> CA 2962852
<151> 31-03-2017
<160> 119
<170> PatentIn phiên bản 3.5
<210> 1
<211> 26
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 1
aagcttgctc ctgctatgag tgatct
26

<210> 2
<211> 28
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 2
gtcgacttca caattaggat gtgtgcac
28

<210> 3
<211> 28
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 3
aagcttgtac acaaccttta attttctt
28

<210> 4
<211> 26
<212> ADN
<213> Aequorea victoria
<400> 4
gtcgacatgg tgagcaaggg cgagga
26

<210> 5
<211> 28
<212> ADN
<213> Aequorea victoria
<400> 5

gagctcttac ttgtacagct cgtccatg
28

<210> 6
<211> 28
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<400> 6
aagcttaact gcatcagccg attatcat
28

<210> 7
<211> 26
<212> ADN
<213> Escherichia coli
<400> 7
gtcgacgtgg tggctagctt gtttgc
26

<210> 8
<211> 29
<212> ADN
<213> Cauliflower mosaic virus
<400> 8
gagctccatg gagtcaaaga ttcaaatag
29

<210> 9
<211> 25
<212> ADN
<213> Virut Cauliflower mosaic
<400> 9
gtcgacagtc ccccgtgttc tctcc
25

<210> 10
<211> 29
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 10
gtcgactctc agagtttaat gaagaagcg
29

<210> 11
<211> 26
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 11

cacgtgggca aagacattga ttattc
26

<210> 12
<211> 28
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 12
gggagctctc cgtagtaaaa gaaacagg
28

<210> 13
<211> 29
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 13
cggaattctt tgtaggcgta cggtagcgg
29

<210> 14
<211> 28
<212> ADN
<213> Aequorea victoria
<400> 14
cggaattcat ggtgagcaag ggcgagga
28

<210> 15
<211> 30
<212> ADN
<213> Aequorea victoria
<400> 15
ggcacgtgtt acttgtacag ctcgtccatg
30

<210> 16
<211> 28
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 16
gggtcgacat ggttgagcct gttccagc
28

<210> 17
<211> 28
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 17

aacacgtgtc atggacccat gcccaagt
28

<210> 18
<211> 27
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 18
cggaattctg gacccatgac caagttc
27

<210> 19
<211> 28
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 19
gggagctcga ggtaaaaccc tacatcct
28

<210> 20
<211> 33
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 20
ttaagctttc tcatgtagta atcatacggt ggg
33

<210> 21
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Protein huỳnh quang xanh lam (BFP)
<400> 21
ttaagcttat ggtgagcaag ggcgagga
28

<210> 22
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Protein huỳnh quang xanh lam (BFP)
<400> 22
aacacgtgct atttgtacag ctcgtccatg c
31

<210> 23

<211> 28
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 23
gcaagctttg ttgcctctct tttgtaaa
28

<210> 24
<211> 28
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 24
gcaagcttgg tagagtttga aggaagta
28

<210> 25
<211> 28
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 25
gcaagcttga ggtaaaaccc tacatcct
28

<210> 26
<211> 28
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 26
gcaagcttcc cgcgacccga ggacctct
28

<210> 27
<211> 28
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 27
gcaagctttg gctatctctc tttgttga
28

<210> 28
<211> 28
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 28
aaactagttc tcatgtagta atcatacg
28

<210> 29

<211> 28
<212> ADN
<213> Aequorea victoria
<400> 29
aaactagtat ggtgagcaag ggcgagga
28

<210> 30
<211> 28
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 30
aactcgagat gtcccccgcg cggctgcc
28

<210> 31
<211> 28
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 31
aactcgagtc atggacccat gaccaagt
28

<210> 32
<211> 18
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 32
gctattcatc tgctgcgg
18

<210> 33
<211> 18
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 33
ccgcagcaga tgaatagc
18

<210> 34
<211> 18
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 34
tcctattggg ctggggct
18

<210> 35

<211> 18
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 35
gctcaaccat accaggcg
18

<210> 36
<211> 18
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 36
gtcttccacc tccagcat
18

<210> 37
<211> 18
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 37
accagcagac tccatttt
18

<210> 38
<211> 18
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 38
cgcgggggac atggcctt
18

<210> 39
<211> 18
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 39
aaggccatga cccccgcg
18

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 40
tcaacctcac ttacagtttg
20

<210> 41

<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 41
gtgatgctct ctcaacatgc
20

<210> 42
<211> 21
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 42
ttgatcttgg tgttggaatc a
21

<210> 43
<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 43
cccatggttt gcatttgata
20

<210> 44
<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 44
tgaatgaaaa cagacctccc
20

<210> 45
<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 45
atgtaccaac ttcagcaggc
20

<210> 46
<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 46
gacgaacggc acgactacta
20

<210> 47

<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 47
atagaaggag gtggacgcat
20

<210> 48
<211> 19
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 48
cgtggtggga agagagagc
19

<210> 49
<211> 24
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 49
tgttgatgaa gcagagtcag taga
24

<210> 50
<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 50
agacgaggcg gggtcagttg
20

<210> 51
<211> 19
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 51
tccccgccgc ggaaactgc
19

<210> 52
<211> 19
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 52
gcggtggaga gcttcggtg
19

<210> 53

<211> 18
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 53
gcgctgagct gtggcacc
18

<210> 54
<211> 18
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 54
tgtaccctga gcacgccg
18

<210> 55
<211> 18
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 55
gccagcctcc atgcttcg
18

<210> 56
<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 56
aacggacggg tcagtcatcg
20

<210> 57
<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 57
ccaccaggcc cttgctcacg
20

<210> 58
<211> 22
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 58
gccaagaagc gcaagaagaa ga
22

<210> 59

<211> 21
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 59
ggtcgaagtg gttggccatg a
21

<210> 60
<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 60
gcgggcgcga ggtacaaggc
20

<210> 61
<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 61
agttggtgag gagcacgggg
20

<210> 62
<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 62
ctgtactgtg tttttagcct
20

<210> 63
<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 63
gacatgacac aaaaatcgga
20

<210> 64
<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 64
cacacatggc acgccaaaac
20

<210> 65

<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 65
gtgtgtaccg tgcggttttg
20

<210> 66
<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 66
ttattttgac catatatacg
20

<210> 67
<211> 20
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 67
aataaaactg gtatatatgc
20

<210> 68
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dạng nhân tạo của yếu tố SP8a trong 6-SFT p
<400> 68
ctgtaaaaaa aatttagcct
20

<210> 69
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dạng nhân tạo của yếu tố SP8a trong 6-SFT p
<400> 69
gacatttttt ttaaatcgga
20

<210> 70
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Dạng nhân tạo của yếu tố W-box trong 6-SFT p
<400> 70
ttattaaaaa aatatatacg
20

<210> 71
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dạng nhân tạo của yếu tố W-box trong 6-SFT p
<400> 71
aataattttt ttatatatgc
20

<210> 72
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dạng nhân tạo của yếu tố SUREa trong 6-SFT p
<400> 72
caaaaatggc acgccaaaac
20

<210> 73
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dạng nhân tạo của yếu tố SUREa trong 6-SFT p
<400> 73
gtttttccg tgcggttttg
20

<210> 74
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dạng nhân tạo của yếu tố SUREa trong 6-SFT p
<400> 74
cacacaaaaa acgccaaaac
20

<210> 75
<211> 20
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dạng nhân tạo của yếu tố SUREa trong 6-SFT p
<400> 75
gtgtgttttt tgcggttttg
20

<210> 76
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dạng nhân tạo của yếu tố SUREa trong 6-SFT p
<400> 76
cacacatggc aaaaaaaaac
20

<210> 77
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dạng nhân tạo của yếu tố SUREa trong 6-SFT p
<400> 77
gtgtgtaccg tttttttttg
20

<210> 78
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dạng nhân tạo của yếu tố SUREa trong 6-SFT p
<400> 78
caaaaaaaaa aaaaaaaaac
20

<210> 79
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dạng nhân tạo của yếu tố SUREa trong 6-SFT p
<400> 79
gtttttttttt tttttttttg
20

<210> 80

<211> 27
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 80
gtacacaacc tttaattttc ttttctg
27

<210> 81
<211> 27
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 81
catgtgttgg aaattaaaag aaaagac
27

<210> 82
<211> 30
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 82
tgtcctatag agattaatgc actttatctt
30

<210> 83
<211> 30
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 83
acaggatatc tctaattacg tgaaatagaa
30

<210> 84
<211> 30
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 84
gcagaacatt aagatgaaat ttaagcattt
30

<210> 85
<211> 30
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 85
cgtcttgtaa ttctacttta aattcgtaaa
30

<210> 86

<211> 30
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 86
tgtttctaga tgaccctgca actttttttg
30

<210> 87
<211> 30
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 87
acaaagatct actgggacgt tgaaaaaaac
30

<210> 88
<211> 30
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 88
gcctttattg tgcatattat ataatttggc
30

<210> 89
<211> 30
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 89
cggaaataac acgtataata tattaaaccg
30

<210> 90
<211> 30
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 90
caggttcttg aattgttgca taattcataa
30

<210> 91
<211> 30
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 91
gtccaagaac ttaacaacgt attaagtatt
30

<210> 92

<211> 355
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 92
gttgcctctc ttttgtaaat gtatctatga gttacatatt ttattctgat atttttttgga
60
tgataggaag gtaacgctat tccagatgca tggcaaatct caatataaaa ctcattaact
120
caatattcat gtgcagcatt acttctttca catgttgtgg agaagtttct ttataaatgg
180
tagagtttga aggaagtatt ttgaatggca gtttggggaa aacctatggt acatatgtag
240
ttagatctat ctgtgcttgc tatattagtc acatcctttc ttaattcgtt gacttgtttt
300
tacatattta gttttgcatt gtgtaacatt tgtgatgtca tattttgtac tgcag
355

<210> 93
<211> 398
<212> ADN
<213> Oryza sativa
<400> 93
atttccttgc taggtgagac ttgagtggtg ctagtctggc tgcaaattta tagaagtatg
60
tgaaaatttg aggtcagaat acaagtaatt gaatggacca atctaatgag ttctgtagct
120
ttagaataat taatgttaac ataaaaatat gttcatgaaa tcaggtcctt ctgcattttg
180
ttgttaaccg aattccacat tcttctttag ttctcacaag tacagacaag tatcttgtaa
240
tggtggattc ttttttggaa aacaaacttc attacatatt ttgtgtgatc catctatgcc
300
ttgtgccctt gttacctttt tttccctaca ccttgttttc tcttgtactt agttttgcat
360
tgtataacct tttgctgtac tcgtgtcttg tactgtag
398

<210> 94
<211> 178
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 94
gtacacaacc tttaattttc ttttctgtgt cctatagaga ttaatgcact ttatcttgca
60
gaacattaag atgaaattta agcattttgt ttctagatga ccctgcaact ttttttggcc
120
tttattgtgc atattatata atttggccag gttcttgaat tgttgcataa ttcataat
178

<210> 95
<211> 605
<212> ADN
<213> Oryza sativa
<400> 95
gtatggatcc tttctttgag tgattacctg gtatcgtgta attcttcatt tgtgtatact
60
gtatttgaga gtttgaaaaa atttccatag aaaataataa catttgttgt ttacaaatgg
120
tcccgccaaa acagtggaat ttatattggg gatgtacata aaaggagtgt aaagttctaa
180
tgtgcttatg ctaacttcct ttccatgatc taaagttgtt accttacggt atgctattta
240
ttggatctat attgcatttt acttggtaaa tctatctgag gttccagctt ttgatattta
300
agttttccta tgtttaattc aaaatattct cacgtgaatc gcaaacctca ccaggagtac
360
aataaattcg ttttattatt attgtaggct gtgttatttc tagtccatgg ttcggtgtct
420
tgaaatttca gtgccaaaat tgggatggat ctggttacat cttcaagtct aataaatgat
480
cacaccgact ttattgtgtg atttgattat agcagggtct tgcaacataa atacaagcta
540
ttaattgtga aaggagaaat gagatctttg gtgagatcat gagaataggg tataacagac
600
acaat
605

<210> 96
<211> 911
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 96
gtacacaacc tttaattttc ttttctgtgt cctatagaga ttaatgcact ttatcttgca
60
gaacattaag atgaaattta agcattttgt ttctagatga ccctgcaact ttttttggcc
120
tttattgtgc atattatata atttggccag gttcttgaat tgttgcataa ttcataatgt
180
tgcctctctt ttgtaaatgt atctatgagt tacatatttt attctgatat tttttggatg
240
ataggaaggt aacgctattc cagatgcatg gcaaatctca atataaaact cattaactca
300
atattcatgt gcagcattac ttctttcaca tgttgtggag aagtttcttt ataaatggta
360
gagtttgaag gaagtatttt gaatggcagt ttggggaaaa cctatggtac atatgtagtt
420

agatctatct gtgcttgcta tattagtcac atcctttctt aattcgttga cttgttttta
480
catatttagt tttgcattgt gtaacatttg tgatgtcata ttttgtactg caggctcctg
540
ctatgagtga tctaaaaaaa catgagcatt ctatgcaaaa tcagagtatg aatcccagct
600
catcatctag caatatggtg aatgaaaaca gacctccctg ttcacgtgag tcgagtctta
660
cagtgaatgt aagtgctcag aaccaacctg ttggaatggt tggtttgact gacagcatgc
720
ctgctgaagt tggtacatct gagccgcagc agatgaatag ctctgacaat gccatgcaag
780
agccgcagtc tgaaaatgtt gctgacaagt cggcagatga tggctacaac tggcggaaat
840
acgggcagaa gcatgtcaag ggaagtgaaa accctagaag ttactacaag tgcacacatc
900
ctaattgtga a
911

<210> 97
<211> 1384
<212> ADN
<213> Oryza sativa
<400> 97
gtatggatcc tttctttgag tgattacctg gtatcgtgta attcttcatt tgtgtatact
60
gtatttgaga gtttgaaaaa atttccatag aaaataataa catttgttgt ttacaaatgg
120
tcccgccaaa acagtggaat ttatattggg gatgtacata aaaggagtgt aaagttctaa
180
tgtgcttatg ctaacttcct ttccatgatc taaagttgtt accttacggt atgctattta
240
ttggatctat attgcatttt acttggtaaa tctatctgag gttccagctt ttgatattta
300
agttttccta tgtttaattc aaaatattct cacgtgaatc gcaaacctca ccaggagtac
360
aataaattcg ttttattatt attgtaggct gtgttatttc tagtccatgg ttcggtgtct
420
tgaaatttca gtgccaaaat tgggatggat ctggttacat cttcaagtct aataaatgat
480
cacaccgact ttattgtgtg atttgattat agcagggtct tgcaacataa atacaagcta
540
ttaattgtga aaggagaaat gagatctttg gtgagatcat gagaataggg tataacagac
600
acaatatttc cttgctaggt gagacttgag tggtgctagt ctggctgcaa atttatagaa
660
gtatgtgaaa atttgaggtc agaatacaag taattgaatg gaccaatcta atgagttctg
720

tagctttaga ataattaatg ttaacataaa aatatgttca tgaaatcagg tccttctgca
780
ttttgttgtt aaccgaattc cacattcttc tttagttctc acaagtacag acaagtatct
840
tgtaatggtg gattcttttt tggaaaacaa acttcattac atattttgtg tgatccatct
900
atgccttgtg cccttgttac ctttttttcc ctacaccttg ttttctcttg tacttagttt
960
tgcattgtat aaccttttgc tgtactcgtg tcttgtactg taggcttctg ctatcaatga
1020
tcccaaaaag catgaaactt ctatgaaaaa tgaaagcctg aatactgccc tgtcatctga
1080
cgatatgatg atcgacaata tacctctatg ttctcgtgag tcaactctcg cagtcaatat
1140
ttcaagtgcc ccgagccaac tggttggaat ggttggttta actgacagct cacctgctga
1200
agttggtaca tctgagttgc atcagatgaa tagctctgga aatgctatgc aggagtcaca
1260
gcctgaaagt gtggctgaaa agtctgcaga ggatggttat aactggcgca aatatgggca
1320
aaagcatgtt aagggaagtg agaacccgag aagctattac aagtgcacac atcctaactg
1380
tgat
1384

<210> 98
<211> 181
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 98
cttccaggtt gaaccttcac caacaactgg tagtctgggc atggctgcga ttctgcacaa
60
gagcgctcat ccagacatgc tgccttcgcc acgggataaa tctgttcgta atgcccatga
120
agataggggt tctagggatt ttgaattcaa gcctcatctg aattcgtctt ctcaatcact
180
g
181

<210> 99
<211> 541
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 99
gctcctgcta tgagtgatct aaaaaaacat gagcattcta tgcaaaatca gagtatgaat
60
cccagctcat catctagcaa tatggtgaat gaaaacagac ctccctgttc acgtgagtcg
120

agtcttacag tgaatgtaag tgctcagaac caacctgttg gaatggttgg tttgactgac
180
agcatgcctg ctgaagttgg tacatctgag ccgcagcaga tgaatagctc tgacaatgcc
240
atgcaagagc cgcagtctga aaatgttgct gacaagtcgg cagatgatgg ctacaactgg
300
cggaaatacg ggcagaagca tgtcaaggga agtgaaaacc ctagaagtta ctacaagtgc
360
acacatccta attgtgaagt aaaaaagcta ttggagcgtg cagttgatgg tctgatcacg
420
gaagttgtct ataagggacg ccacaatcat cctaagcccc agcccaatag gaggttagct
480
ggtggtgcag ttccttcaaa ccagggtgaa gaacgatatg acggcgcttc agctgctgat
540
g
541

<210> 100
<211> 533
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 100
gtacacaacc tttaattttc ttttctgtgt cctatagaga ttaatgcact ttatcttgca
60
gaacattaag atgaaattta agcattttgt ttctagatga ccctgcaact ttttttggcc
120
tttattgtgc atattatata atttggccag gttcttgaat tgttgcataa ttcataatgt
180
tgcctctctt ttgtaaatgt atctatgagt tacatatttt attctgatat tttttggatg
240
ataggaaggt aacgctattc cagatgcatg gcaaatctca atataaaact cattaactca
300
atattcatgt gcagcattac ttctttcaca tgttgtggag aagtttcttt ataaatggta
360
gagtttgaag gaagtatttt gaatggcagt ttggggaaaa cctatggtac atatgtagtt
420
agatctatct gtgcttgcta tattagtcac atcctttctt aattcgttga cttgttttta
480
catatttagt tttgcattgt gtaacatttg tgatgtcata ttttgtactg cag
533

<210> 101
<211> 181
<212> ADN
<213> Oryza sativa
<400> 101
tgtttaggtt gaaccctctc cgacaactgg tactctgagc atggctgcaa ttatgaacaa
60

gagtgcaaat ccagacatac ttccttcgcc tagggataaa acatctggta gcacccatga
120
agatggtggc tctcgagatt ttgaattcaa gcctcatctg aattcatcct ctcaatcgac
180
g
181

<210> 102
<211> 544
<212> ADN
<213> Oryza sativa
<400> 102
gcttctgcta tcaatgatcc caaaaagcat gaaacttcta tgaaaaatga aagcctgaat
60
actgccctgt catctgacga tatgatgatc gacaatatac ctctatgttc tcgtgagtca
120
actctcgcag tcaatatttc aagtgccccg agccaactgg ttggaatggt tggtttaact
180
gacagctcac ctgctgaagt tggtacatct gagttgcatc agatgaatag ctctggaaat
240
gctatgcagg agtcacagcc tgaaagtgtg gctgaaaagt ctgcagagga tggttataac
300
tggcgcaaat atgggcaaaa gcatgttaag ggaagtgaga acccgagaag ctattacaag
360
tgcacacatc ctaactgtga tgtaaaaaag ctattggagc gttcgcttga tggtcagatt
420
actgaagtgg tttataaagg gcgtcacaat caccctaagc cccaacccaa taggaggctg
480
tctgccggtg cagttcctcc aatccagggt gaagaaagat atgatggtgt ggcaactact
540
gatg
544

<210> 103
<211> 1003
<212> ADN
<213> Oryza sativa
<400> 103
gtatggatcc tttctttgag tgattacctg gtatcgtgta attcttcatt tgtgtatact
60
gtatttgaga gtttgaaaaa atttccatag aaaataataa catttgttgt ttacaaatgg
120
tcccgccaaa acagtggaat ttatattggg gatgtacata aaaggagtgt aaagttctaa
180
tgtgcttatg ctaacttcct ttccatgatc taaagttgtt accttacggt atgctattta
240
ttggatctat attgcatttt acttggtaaa tctatctgag gttccagctt ttgatattta
300

agttttccta tgtttaattc aaaatattct cacgtgaatc gcaaacctca ccaggagtac
360
aataaattcg ttttattatt attgtaggct gtgttatttc tagtccatgg ttcggtgtct
420
tgaaatttca gtgccaaaat tgggatggat ctggttacat cttcaagtct aataaatgat
480
cacaccgact ttattgtgtg atttgattat agcagggtct tgcaacataa atacaagcta
540
ttaattgtga aaggagaaat gagatctttg gtgagatcat gagaataggg tataacagac
600
acaatatttc cttgctaggt gagacttgag tggtgctagt ctggctgcaa atttatagaa
660
gtatgtgaaa atttgaggtc agaatacaag taattgaatg gaccaatcta atgagttctg
720
tagctttaga ataattaatg ttaacataaa aatatgttca tgaaatcagg tccttctgca
780
ttttgttgtt aaccgaattc cacattcttc tttagttctc acaagtacag acaagtatct
840
tgtaatggtg gattcttttt tggaaaacaa acttcattac atattttgtg tgatccatct
900
atgccttgtg cccttgttac ctttttttcc ctacaccttg ttttctcttg tacttagttt
960
tgcattgtat aacctttttgc tgtactcgtg tcttgtactg tag
1003

<210> 104
<211> 573
<212> PRT
<213> Hordeum vulgare
<400> 104
Met Ser Pro Ala Arg Leu Pro Ile Ser Arg Glu Ser Cys Leu Thr Ile
1 5 10 15

Pro Ala Gly Phe Ser Pro Ser Ala Leu Leu Asp Ser Pro Val Leu Leu
20 25 30

Thr Asn Phe Lys Val Glu Pro Ser Pro Thr Thr Gly Ser Leu Gly Met
35 40 45

Ala Ala Ile Leu His Lys Ser Ala His Pro Asp Met Leu Pro Ser Pro
50 55 60

Arg Asp Lys Ser Val Arg Asn Ala His Glu Asp Arg Gly Ser Arg Asp
65 70 75 80

Phe Glu Phe Lys Pro His Leu Asn Ser Ser Ser Gln Ser Leu Ala Pro
85 90 95

Ala Met Ser Asp Leu Lys Lys His Glu His Ser Met Gln Asn Gln Ser
100 105 110

Met Asn Pro Ser Ser Ser Ser Ser Asn Met Val Asn Glu Asn Arg Pro
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Glu Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Ser Ala Gln Asn
130 135 140

Gln Pro Val Gly Met Val Gly Leu Thr Asp Ser Met Pro Ala Glu Val
145 150 155 160

Gly Thr Ser Glu Pro Gln Gln Met Asn Ser Ser Asp Asn Ala Met Gln
165 170 175

Glu Pro Gln Ser Glu Asn Val Ala Asp Lys Ser Ala Asp Asp Gly Tyr
180 185 190

Asn Trp Arg Lys Tyr Gly Gln Lys His Val Lys Gly Ser Glu Asn Pro
195 200 205

Arg Ser Tyr Tyr Lys Cys Thr His Pro Asn Cys Glu Val Lys Lys Leu
210 215 220

Leu Glu Arg Ala Val Asp Gly Leu Ile Thr Glu Val Val Tyr Lys Gly
225 230 235 240

Arg His Asn His Pro Lys Pro Gln Pro Asn Arg Arg Leu Ala Gly Gly
245 250 255

Ala Val Pro Ser Asn Gln Gly Glu Glu Arg Tyr Asp Gly Ala Ser Ala
260 265 270

Ala Asp Asp Lys Ser Ser Asn Ala Leu Ser Asn Leu Ala Asn Pro Val
275 280 285

His Ser Pro Gly Met Val Glu Pro Val Pro Ala Ser Val Ser Asp Asp
290 295 300

Asp Ile Asp Ala Gly Gly Gly Arg Pro Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Thr
305 310 315 320

Glu Glu Glu Asp Leu Glu Ser Lys Arg Arg Lys Met Glu Ser Ala Gly
325 330 335

Ile Asp Ala Ala Leu Met Gly Lys Pro Asn Arg Glu Pro Arg Val Val
340 345 350

Val Gln Thr Val Ser Glu Val Asp Ile Leu Asp Asp Gly Tyr Arg Trp
355 360 365

Arg Lys Tyr Gly Gln Lys Val Val Lys Gly Asn Pro Asn Pro Arg Ser
370 375 380

Tyr Tyr Lys Cys Thr Ser Thr Gly Cys Pro Val Arg Lys His Val Glu
385 390 395 400

Arg Ala Ser His Asp Pro Lys Ser Val Ile Thr Thr Tyr Glu Gly Lys
405 410 415

His Asn His Glu Val Pro Ala Ala Arg Asn Ala Thr His Glu Met Ser
420 425 430

Ala Pro Pro Met Lys Asn Val Val His Gln Ile Asn Ser Asn Met Pro
435 440 445

Ser Ser Ile Gly Gly Met Met Arg Ala Cys Glu Ala Arg Asn Tyr Thr
450 455 460

Asn Gln Tyr Ser Gln Ala Ala Glu Thr Asp Thr Val Ser Leu Asp Leu
465 470 475 480

Gly Val Gly Ile Ser Pro Asn His Ser Asp Ala Thr Asn Gln Met Gln
485 490 495

Ser Ser Gly Pro Asp Gln Met Gln Tyr Gln Met Gln Thr Met Gly Ser
500 505 510

Met Tyr Gly Asn Met Arg His Pro Ser Ser Met Ala Ala Pro Ala Val
515 520 525

Gln Gly Asn Ser Ala Ala Arg Met Tyr Gly Ser Arg Glu Glu Lys Gly
530 535 540

Asn Glu Gly Phe Thr Phe Arg Ala Thr Pro Met Asp His Ser Ala Asn
545 550 555 560

Leu Cys Tyr Ser Ser Ala Gly Asn Leu Val Met Gly Pro
565 570

<210> 105
<211> 618
<212> PRT
<213> Oryza sativa
<400> 105
Met Ala Asp Ser Pro Asn Pro Ser Ser Gly Asp His Pro Ala Gly Val

1 5 10 15

Gly Gly Ser Pro Glu Lys Gln Pro Pro Val Asp Arg Arg Val Ala Ala
20 25 30

Leu Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Arg Tyr Lys Ala Met Ser
35 40 45

Pro Ala Arg Leu Pro Ile Ser Arg Glu Pro Cys Leu Thr Ile Pro Ala
50 55 60

Gly Phe Ser Pro Ser Ala Leu Leu Glu Ser Pro Val Leu Leu Thr Asn
65 70 75 80

Phe Lys Val Glu Pro Ser Pro Thr Thr Gly Thr Leu Ser Met Ala Ala
85 90 95

Ile Met Asn Lys Ser Ala Asn Pro Asp Ile Leu Pro Ser Pro Arg Asp
100 105 110

Lys Thr Ser Gly Ser Thr His Glu Asp Gly Gly Ser Arg Asp Phe Glu
115 120 125

Phe Lys Pro His Leu Asn Ser Ser Ser Gln Ser Thr Ala Ser Ala Ile
130 135 140

Asn Asp Pro Lys Lys His Glu Thr Ser Met Lys Asn Glu Ser Leu Asn
145 150 155 160

Thr Ala Leu Ser Ser Asp Asp Met Met Ile Asp Asn Ile Pro Leu Cys
165 170 175

Ser Arg Glu Ser Thr Leu Ala Val Asn Ile Ser Ser Ala Pro Ser Gln
180 185 190

Leu Val Gly Met Val Gly Leu Thr Asp Ser Ser Pro Ala Glu Val Gly
195 200 205

Thr Ser Glu Leu His Gln Met Asn Ser Ser Gly Asn Ala Met Gln Glu
210 215 220

Ser Gln Pro Glu Ser Val Ala Glu Lys Ser Ala Glu Asp Gly Tyr Asn
225 230 235 240

Trp Arg Lys Tyr Gly Gln Lys His Val Lys Gly Ser Glu Asn Pro Arg
245 250 255

Ser Tyr Tyr Lys Cys Thr His Pro Asn Cys Asp Val Lys Lys Leu Leu

260 265 270

Glu Arg Ser Leu Asp Gly Gln Ile Thr Glu Val Val Tyr Lys Gly Arg
275 280 285

His Asn His Pro Lys Pro Gln Pro Asn Arg Arg Leu Ser Ala Gly Ala
290 295 300

Val Pro Pro Ile Gln Gly Glu Glu Arg Tyr Asp Gly Val Ala Thr Thr
305 310 315 320

Asp Asp Lys Ser Ser Asn Val Leu Ser Ile Leu Gly Asn Ala Val His
325 330 335

Thr Ala Gly Met Ile Glu Pro Val Pro Gly Ser Ala Ser Asp Asp Asp
340 345 350

Asn Asp Ala Gly Gly Gly Arg Pro Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Val Glu
355 360 365

Asp Asp Asp Leu Glu Ser Lys Arg Arg Lys Met Glu Ser Ala Ala Ile
370 375 380

Asp Ala Ala Leu Met Gly Lys Pro Asn Arg Glu Pro Arg Val Val Val
385 390 395 400

Gln Thr Val Ser Glu Val Asp Ile Leu Asp Asp Gly Tyr Arg Trp Arg
405 410 415

Lys Tyr Gly Gln Lys Val Val Lys Gly Asn Pro Asn Pro Arg Ser Tyr
420 425 430

Tyr Lys Cys Thr Asn Thr Gly Cys Pro Val Arg Lys His Val Glu Arg
435 440 445

Ala Ser His Asp Pro Lys Ser Val Ile Thr Thr Tyr Glu Gly Lys His
450 455 460

Asn His Glu Val Pro Ala Ser Arg Asn Ala Ser His Glu Met Ser Thr
465 470 475 480

Pro Pro Met Lys Pro Val Val His Pro Ile Asn Ser Asn Met Gln Gly
485 490 495

Leu Gly Gly Met Met Arg Ala Cys Glu Pro Arg Thr Phe Pro Asn Gln
500 505 510

Tyr Ser Gln Ala Ala Glu Ser Asp Thr Ile Ser Leu Asp Leu Gly Val

515 520 525

Gly Ile Ser Pro Asn His Ser Asp Ala Thr Asn Gln Leu Gln Ser Ser
530 535 540

Val Ser Asp Gln Met Gln Tyr Gln Met Gln Pro Met Gly Ser Val Tyr
545 550 555 560

Ser Asn Met Gly Leu Pro Ala Met Ala Met Pro Thr Met Ala Gly Asn
565 570 575

Ala Ala Ser Asn Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Glu Lys Pro Ser Glu Gly
580 585 590

Phe Thr Phe Lys Ala Thr Pro Met Asp His Ser Ala Asn Leu Cys Tyr
595 600 605

Ser Thr Ala Gly Asn Leu Val Met Gly Pro
610 615

<210> 106
<211> 281
<212> PRT
<213> Hordeum vulgare
<400> 106
Met Val Glu Pro Val Pro Ala Ser Val Ser Asp Asp Asp Ile Asp Ala
1 5 10 15

Gly Gly Gly Arg Pro Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Thr Glu Glu Glu Asp
20 25 30

Leu Glu Ser Lys Arg Arg Lys Met Glu Ser Ala Gly Ile Asp Ala Ala
35 40 45

Leu Met Gly Lys Pro Asn Arg Glu Pro Arg Val Val Val Gln Thr Val
50 55 60

Ser Glu Val Asp Ile Leu Asp Asp Gly Tyr Arg Trp Arg Lys Tyr Gly
65 70 75 80

Gln Lys Val Val Lys Gly Asn Pro Asn Pro Arg Ser Tyr Tyr Lys Cys
85 90 95

Thr Ser Thr Gly Cys Pro Val Arg Lys His Val Glu Arg Ala Ser His
100 105 110

Asp Pro Lys Ser Val Ile Thr Thr Tyr Glu Gly Lys His Asn His Glu
115 120 125

Val Pro Ala Ala Arg Asn Ala Thr His Glu Met Ser Ala Pro Pro Met
130 135 140

Lys Asn Val Val His Gln Ile Asn Ser Asn Met Pro Ser Ser Ile Gly
145 150 155 160

Gly Met Met Arg Ala Cys Glu Ala Arg Asn Tyr Thr Asn Gln Tyr Ser
165 170 175

Gln Ala Ala Glu Thr Asp Thr Val Ser Leu Asp Leu Gly Val Gly Ile
180 185 190

Ser Pro Asn His Ser Asp Ala Thr Asn Gln Met Gln Ser Ser Gly Pro
195 200 205

Asp Gln Met Gln Tyr Gln Met Gln Thr Met Gly Ser Met Tyr Gly Asn
210 215 220

Met Arg His Pro Ser Ser Met Ala Ala Pro Ala Val Gln Gly Asn Ser
225 230 235 240

Ala Ala Arg Met Tyr Gly Ser Arg Glu Glu Lys Gly Asn Glu Gly Phe
245 250 255

Thr Phe Arg Ala Thr Pro Met Asp His Ser Ala Asn Leu Cys Tyr Ser
260 265 270

Ser Ala Gly Asn Leu Val Met Gly Pro
275 280

<210> 107
<211> 279
<212> PRT
<213> Oryza sativa
<400> 107
Met Ile Glu Pro Val Pro Gly Ser Ala Ser Asp Asp Asp Asn Asp Ala
1 5 10 15

Gly Gly Gly Arg Pro Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Val Glu Asp Asp Asp
20 25 30

Leu Glu Ser Lys Arg Arg Lys Met Glu Ser Ala Ala Ile Asp Ala Ala
35 40 45

Leu Met Gly Lys Pro Asn Arg Glu Pro Arg Val Val Val Gln Thr Val
50 55 60

Ser Glu Val Asp Ile Leu Asp Asp Gly Tyr Arg Trp Arg Lys Tyr Gly
65 70 75 80

Gln Lys Val Val Lys Gly Asn Pro Asn Pro Arg Ser Tyr Tyr Lys Cys
85 90 95

Thr Asn Thr Gly Cys Pro Val Arg Lys His Val Glu Arg Ala Ser His
100 105 110

Asp Pro Lys Ser Val Ile Thr Thr Tyr Glu Gly Lys His Asn His Glu
115 120 125

Val Pro Ala Ser Arg Asn Ala Ser His Glu Met Ser Thr Pro Pro Met
130 135 140

Lys Pro Val Val His Pro Ile Asn Ser Asn Met Gln Gly Leu Gly Gly
145 150 155 160

Met Met Arg Ala Cys Glu Pro Arg Thr Phe Pro Asn Gln Tyr Ser Gln
165 170 175

Ala Ala Glu Ser Asp Thr Ile Ser Leu Asp Leu Gly Val Gly Ile Ser
180 185 190

Pro Asn His Ser Asp Ala Thr Asn Gln Leu Gln Ser Ser Val Ser Asp
195 200 205

Gln Met Gln Tyr Gln Met Gln Pro Met Gly Ser Val Tyr Ser Asn Met
210 215 220

Gly Leu Pro Ala Met Ala Met Pro Thr Met Ala Gly Asn Ala Ala Ser
225 230 235 240

Asn Ile Tyr Gly Ser Arg Glu Glu Lys Pro Ser Glu Gly Phe Thr Phe
245 250 255

Lys Ala Thr Pro Met Asp His Ser Ala Asn Leu Cys Tyr Ser Thr Ala
260 265 270

Gly Asn Leu Val Met Gly Pro
275

<210> 108
<211> 30
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 108
taggtcgtca atttgactta tataaaatat

30

<210> 109
<211> 30
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 109
atattttata taagtcaaat tgacgaccta
30

<210> 110
<211> 30
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 110
gcttcatcaa cgtatccgca cgttacacgg
30

<210> 111
<211> 30
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 111
ccgtgtaacg tgcggatacg ttgatgaagc
30

<210> 112
<211> 359
<212> ADN
<213> Triticum aestivum
<400> 112
cttgcctatc atttgtaaat gcatgtacga acttacctat tttattctga tcttctttgg
60
agggtaggaa ggtaacacta tcccagatgc atggcaaatc tcagtataga actcattaac
120
tcaatatcca tatgtaacat tacttctttc acatgtagcg gagaagtttc tttataaata
180
gtagagtttg aaaaaagcac tttgaatgac agtttgggga aaaactatgg tacatatgta
240
gttagatcta tctgtgcttg ctatgttagt cacattcttt cttaattcct gttgacttgt
300
ttttgcatat tttgttttgc atcgtgtaac atttgtaatg ctcatatttt gtactgcag
359

<210> 113
<211> 184
<212> ADN
<213> Triticum aestivum

<400> 113
gtacacaacc tttaattttc ttttctctgt gtcccataga gattaatgta ctttatcttg
60
cagaacatca aaagaaaatt taagcatttt gtttctatac gaccccacaa atatatctgg
120
cctttattgt gcatattata accataattc ggctaggttc ttgaattgtt gcataattca
180
taat
184

<210> 114
<211> 2354
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 114
agatcatgca tcgttgagcc gcttggtggg cgagacggct cgatgggctc cccgagcggg
60
cacgcgggct cgatgaagta ctccccgtgc ttcacttctg cgccacggtg atctccttgg
120
gtcgggtcca agccgaaacc tagctccggg gacctcccct cgcccgccgg gagctcgccc
180
gagaagccct accccgcgga tcgacgcgtc gcggcgctcg ccggcgcggg cgcgaggtac
240
aaggccatgt cccccgcgcg gctgccgatc tcgcgcgagt cctgcctcac catccccgcc
300
ggcttcagcc cctcagcgct cctcgactcc cccgtgctcc tcaccaactt caaggttgaa
360
ccttcaccaa caactggtag tctgggcatg gctgcgattc tgcacaagag cgctcatcca
420
gacatgctgc cttcgccacg ggataaatct gttcgtaatg cccatgaaga taggggttct
480
agggattttg aattcaagcc tcatctgaat tcgtcttctc aatcactggc tcctgctatg
540
agtgatctaa aaaaacatga gcattctatg caaaatcaga gtatgaatcc cagctcatca
600
tctagcaata tggtgaatga aaacagacct ccctgttcac gtgagtcgag tcttacagtg
660
aatgtaagtg ctcagaacca acctgttgga atggttggtt tgactgacag catgcctgct
720
gaagttggta catctgagcc gcagcagatg aatagctctg acaatgccat gcaagagccg
780
cagtctgaaa atgttgctga caagtcggca gatgatggct acaactggcg gaaatacggg
840
cagaagcatg tcaagggaag tgaaaaccct agaagttact acaagtgcac acatcctaat
900
tgtgaagtaa aaaagctatt ggagcgtgca gttgatggtc tgatcacgga agttgtctat
960
aagggacgcc acaatcatcc taagccccag cccaatagga ggttagctgg tggtgcagtt

1020
ccttcaaacc agggtgaaga acgatatgac ggcgcttcag ctgctgatga taaatcttcc
1080
aatgctctta gcaaccttgc taatccggta cattcgcctg gtatggttga gcctgttcca
1140
gcttcagtta gtgatgatga catcgatgct ggaggtggaa gaccctaccc tggggatgat
1200
gctactgagg aggaggattt agagtcgaaa cgcaggaaaa tggagtctgc tggtattgat
1260
gctgctctga tgggtaaacc taaccgtgag ccccgtgtcg tcgttcaaac tgtaagtgag
1320
gttgacatct tggatgatgg ctatcgttgg cggaaatatg gacagaaagt tgtcaaagga
1380
aaccccaatc cacggagtta ctacaaatgc acaagcacag gatgccctgt gaggaagcat
1440
gttgagagag catcacacga tcctaaatca gtgataacaa cgtatgaagg aaaacataac
1500
catgaagtcc ctgctgcgag gaatgcaacc catgagatgt ccgcgcctcc catgaagaac
1560
gtcgtgcatc agattaacag caatatgccc agcagcattg gtggcatgat gagggcatgt
1620
gaagccagga actacaccaa ccaatattct caggcggctg aaaccgacac tgtcagtctt
1680
gatcttggtg ttggaatcag cccaaaccac agcgacgcga caaaccaaat gcagtcttca
1740
ggtcctgacc agatgcagta tcaaatgcaa accatgggtt cgatgtacgg caacatgaga
1800
catccatcat caatggcagc gccagcggta caaggaaact ctgctgcccg catgtatggt
1860
tcgagagaag agaaaggtaa cgaagggttt actttcagag ccacaccgat ggaccattca
1920
gctaacctat gctatagcag tgctgggaac ttggtcatgg gtccatgaga gggaatgaga
1980
gtgtctgcaa atgctcatag ctccatgaat catatattac caacaatgct ttgtaatgac
2040
aatctcttca gcaagattct caattgtctc aattgtgtat cggttacaag tcagttcagc
2100
cggaggcaag tatgctagta taagctatac gtgggggcac tgcagcaaat acgcatgtgt
2160
ctttttaagt gcggaaaagg cccttgctgt atgtagcatc gcagccctac attcgttgta
2220
cagcgaacct aatatgatta attaattaga ttatgagaat ttggtttcgt gaactgtcta
2280
atcttctgta ctggaatatt gatagaaata tagattatgg taattttctt taaaaaaaaa
2340
aaaaaaaaaa aaaa
2354

<210> 115
<211> 1074
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 115
gtacacaacc tttaattttc ttttctgtgt cctatagaga ttaatgcact ttatcttgca
60
gaacattaag atgaaattta agcattttgt ttctagatga ccctgcaact ttttttggcc
120
tttattgtgc atattatata atttggccag gttcttgaat tgttgcataa ttcataatgt
180
tgcctctctt ttgtaaatgt atctatgagt tacatatttt attctgatat tttttggatg
240
ataggaaggt aacgctattc cagatgcatg gcaaatctca atataaaact cattaactca
300
atattcatgt gcagcattac ttctttcaca tgttgtggag aagtttcttt ataaatggta
360
gagtttgaag gaagtatttt gaatggcagt ttggggaaaa cctatggtac atatgtagtt
420
agatctatct gtgcttgcta tattagtcac atcctttctt aattcgttga cttgttttta
480
catatttagt tttgcattgt gtaacatttg tgatgtcata ttttgtactg caggctcctg
540
ctatgagtga tctaaaaaaa catgagcatt ctatgcaaaa tcagagtatg aatcccagct
600
catcatctag caatatggtg aatgaaaaca gacctccctg ttcacgtgag tcgagtctta
660
cagtgaatgt aagtgctcag aaccaacctg ttggaatggt tggtttgact gacagcatgc
720
ctgctgaagt tggtacatct gagccgcagc agatgaatag ctctgacaat gccatgcaag
780
agccgcagtc tgaaaatgtt gctgacaagt cggcagatga tggctacaac tggcggaaat
840
acgggcagaa gcatgtcaag ggaagtgaaa accctagaag ttactacaag tgcacacatc
900
ctaattgtga agtaaaaaag ctattggagc gtgcagttga tggtctgatc acggaagttg
960
tctataaggg acgccacaat catcctaagc cccagcccaa taggaggtta gctggtggtg
1020
cagttccttc aaaccagggt gaagaacgat atgacggcgc ttcagctgct gatg
1074

<210> 116
<211> 18
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 116
agccccagcc caatagga

18

<210> 117
<211> 18
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 117
cgcctggtat ggttgagc
18

<210> 118
<211> 18
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 118
atgctggagg tggaagac
18

<210> 119
<211> 18
<212> ADN
<213> Hordeum vulgare
<400> 119
aaaatggagt ctgctggt
18

Yêu cầu bảo hộ

1. Nguyên liệu thực vật chứa trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã truyền tín hiệu đường ở đại mạch 2 (SUSIBA2), trong đó nguyên liệu thực vật này là nguyên liệu thực vật từ đại mạch, hoặc mã hóa yếu tố phiên mã giống SUSIBA2, trong đó nguyên liệu thực vật này là nguyên liệu thực vật từ lúa hoặc nguyên liệu thực vật từ lúa mì,

trong đó yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 này chịu sự kiểm soát phiên mã của trình tự khởi động hoạt động ở nguyên liệu thực vật này,

trong đó trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 này ở nguyên liệu thực vật từ đại mạch, nguyên liệu thực vật từ lúa, hoặc nguyên liệu thực vật từ lúa mì lần lượt thiếu ít nhất một phần của

(i) vùng hoạt hóa đáp ứng đường như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 92 của trình tự khởi động SUSIBA1 (SUSUBIA1 p) có mặt trong intron của phiên bản kiểu dại của trình tự nucleotit bộ gen ở nguyên liệu thực vật từ đại mạch,

(ii) vùng hoạt hóa đáp ứng đường như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 93 của trình tự khởi động giống SUSIBA1(SUSIBA1-like p), có mặt trong intron của phiên bản kiểu dại của trình tự nucleotit bộ gen ở nguyên liệu thực vật từ lúa, hoặc

(iii) vùng hoạt hóa đáp ứng đường như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 112 của SUSIBA1-like p có mặt trong intron của phiên bản kiểu dại của trình tự nucleotit bộ gen ở nguyên liệu thực vật từ lúa mì, và

trong đó liên kết của yếu tố hoạt hóa *trans* với vùng hoạt hóa đáp ứng đường cảm ứng sự biểu hiện của SUSIBA1 mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA1 ở phiên bản kiểu dại của nguyên liệu thực vật từ đại mạch hoặc sự biểu hiện của giống SUSIBA1 mã hóa yếu tố phiên mã giống SUSIBA1 ở phiên bản kiểu dại của nguyên liệu thực vật từ lúa hoặc nguyên liệu thực vật từ lúa mì.

2. Nguyên liệu thực vật theo điểm 1, trong đó ít nhất một phần của vùng hoạt hóa đáp ứng đường của *SUSIBA1* p hoặc *SUSIBA1*-like p của phiên bản kiểu dại bị xóa bỏ khỏi phiên bản kiểu dại của trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 này để tạo ra trình tự nucleotit bộ gen này.

3. Nguyên liệu thực vật theo điểm 2, trong đó ít nhất một phần của vùng hoạt hóa đáp ứng đường của *SUSIBA1* p hoặc *SUSIBA1*-like p của phiên bản kiểu dại bị xóa bỏ bởi đột biến mất đoạn được gây ra bởi cụm đoạn lặp xuôi ngược ngắn phân cách đều, (CRISPR) / protein kết hợp CRISPR 9 (Cas9).

4. Nguyên liệu thực vật theo điểm 1, trong đó trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 này là trình tự nucleotit nội sinh của bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2.

5. Nguyên liệu thực vật theo điểm 1, trong đó trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 thiếu ít nhất một phần của vùng ức chế đường như được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 94 của SUSIBA1 p có mặt trong intron của phiên bản kiểu dại của trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 này, hoặc trong đó trình tự nucletotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã giống SUSIBA2 thiếu ít nhất một phần của vùng ức chế đường như được thể hiện lần lượt trong trình tự SEQ ID NO: 95 hoặc SEQ ID NO: 113 của SUSIBA1-like p có mặt trong intron của trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã giống SUSIBA2 ở nguyên liệu thực vật từ lúa hoặc nguyên liệu thực vật từ lúa mì.

6. Nguyên liệu thực vật theo điểm 1, trong đó trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 thiếu phần intron của *SUSIBA1* p hoặc *SUSIBA1*-like p của phiên bản kiểu dại của trình tự nucleotit bộ gen.

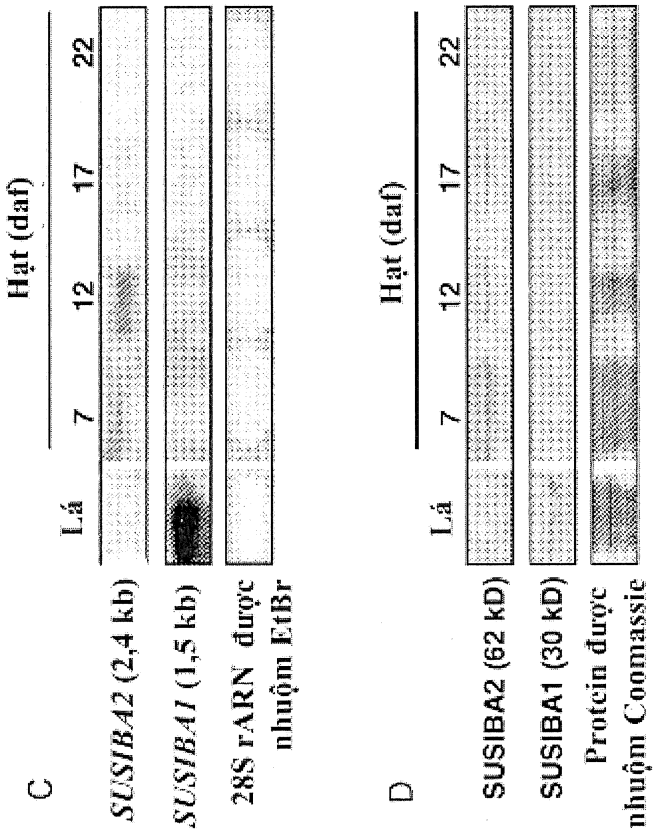
7. Nguyên liệu thực vật theo điểm 1, trong đó trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 thiếu intron 2 của phiên bản kiểu dại của của trình tự nucleotit bộ gen mã hóa yếu tố phiên mã SUSIBA2 hoặc giống SUSIBA2 này.

8. Nguyên liệu thực vật theo điểm 1, trong đó

nguyên liệu thực vật này được chọn từ nhóm bao gồm cây lúa, tế bào cây lúa và hạt lúa.

9. Nguyên liệu thực vật theo điểm 8, trong đó yếu tố phiên mã giống SUSIBA2 này có trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 105.

10. Nguyên liệu thực vật theo điểm 1, trong đó nguyên liệu thực vật được chọn từ nhóm gồm có thực vật, tế bào thực vật hoặc hạt.


C
Lá
7
12
17
22
Hạt (daf)
SUSIBA2 (2,4 kb)
SUSIBA1 (1,5 kb)
28S rARN được nhuộm EtBr
D
Lá
7
12
17
22
Hạt (daf)
SUSIBA2 (62 kD)
SUSIBA1 (30 kD)
Protein được nhuộm Coomassie

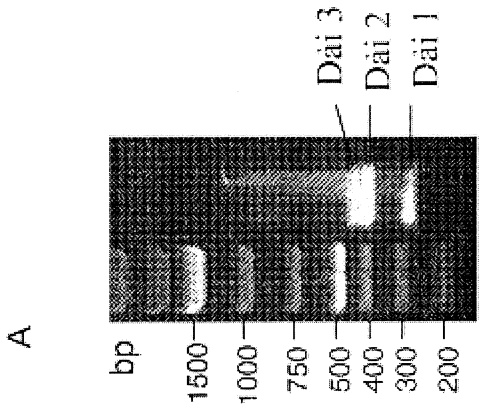

A
bp
1500
1000
750
500
400
300
200
Dải 3
Dải 2
Dải 1

Fig. 1

Fig. 1B

agatcatgcatcgttgagccgcttggtgggcgagacggctcgatgggctccccgagcgggcacgcgggctcgatgaagtactccccgtgcttcacttctgcgccacg

gtgatctccttgggtcgggtccaagccgaaacctagctccggggacctcccctcgcccgccgggagctcgcccgagaagccctaccccgcggatcgacgcgtcgcgg

cgctcgccggcgcgggcgcgaggtacaaggccatgtcccccgcgcggctgccgatctcgcgcgagtcctgcctcaccatccccgccggcttcagcccctcagcgctc

ctcgactcccccgtgctcctcaccaacttcaaggttgaaccttcaccaacaactggtagtctgggcatggctgcgattctgcacaagagcgctcatccagacatgct

gccttcgccacgggataaatctgttcgtaatgcccatgaagatagggggttctagggattttgaattcaagcctcatctgaattcgtcttctcaatcactggctcctg

ctatgagtgatctaaaaaaacatgagcattctatgcaaaatcagagtatgaatcccagctcatcatctagcaatatggtgaatgaaaacagacctccctgttcacgt

gagtcgagtcttacagtgaatgtaagtgctcagaaccaacctgttggaatggttggtttgactgacagcatgcctgctgaagttggtacatctgagccgcagcagat

gaatagctctgacaatgccatgcaagagccgcagtctgaaaatgttgctgacaagtcggcagatgatggctacaactggcggaaatacgggcagaagcatgtcaagg

Band3

gaagtgaaaaccctagaagttactacaagtgcacacatcctaattgtgaagtaaaaaagctattggagcgtgcagttgatggtctgatcacggaagttgtctataag

ggacgccacaatcatcctaagccccagcccaataggaggttagctggtggtgcagttccttcaaaccagggtgaagaacgatatgacggcgcttcagctgctgatga

taaatcttccaatgctcttagcaaccttgctaatccggtacattcgcctggtatggttgagcctgttccagcttcagttagtgatgatgacatcgatgctggaggtg

gaagaccctaccctggggatgatgctactgaggaggaggatttagagtcgaaacgcaggaaaatggagtctgctggtattgatgctgctctgatgggtaaacctaac

cgtgagccccgtgtcgtcgttcaaactgtaagtgaggttgacatcttggatgatggctatcgttggcggaaatatggacagaaagttgtcaaaggaaaccccaatcc

acggagttactacaaatgcacaagcacaggatgccctgtgaggaagcatgttgagagagcatcacacgatcctaaatcagtgataacaacgtatgaaggaaaacata

accatgaagtccctgctgcgaggaatgcaacccatgagatgtccgcgcctcccatgaagaacgtcgtgcatcagattaacagcaatatgcccagcagcattggtggc

atgatgagggcatgtgaagccaggaactacaccaaccaatattctcaggcggctgaaaccgacactgtcagtcttgatcttggtgttggaatcagcccaaaccacag

cgacgcgacaaaccaaatgcagtcttcaggtcctgaccagatgcagtatcaaatgcaaaccatgggttcgatgtacggcaacatgagacatccatcatcaatggcag

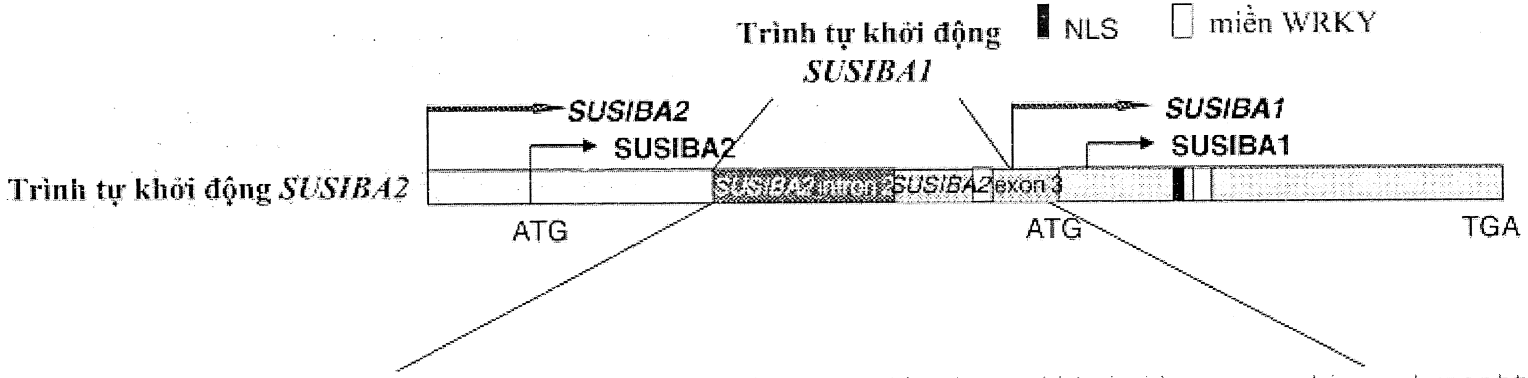
cgccagcggtacaaggaaactctgctgcccgcatgtatggttcgagagaagagaaaggtaacgaagggtttactttcagagccacaccgatggaccattcagctaac

ctatgctatagcagtgctgggaacttggtcatgggtccatgagagggaatgagagtgtctgcaaatgctcatagctccatgaatcatatattaccaacaatgctttg

taatgacaatctcttcagcaagattctcaattgtctcaattgtgtatcggttacaagtcagttcagccggaggcaagtatgctagtataagctatacgtgggggcac

tgcagcaaatacgcatgtgtctttttaagtgcggaaaaggcccttgctgtatgtagcatcgcagccctacattcgttgtacagcgaacctaatatgattaattaatt

agattatgagaatttggtttcgtgaactgtctaatcttctgtactggaatattgatagaaatatagattatggtaattttctttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa



gtacacaacctttaattttcttttctgtgtcctatagagattaatgcactttatcttgcagaacattaagatgaaatttaagcat
tttgtttctagatgaccctgcaactttttttggcctttattgtgcatattatataatttggccaggttcttgaattgttgcataa
ttcataatgttgcctctcttttgtaaatgtatctatgagttacatattttattctgatatttttttggatgataggaaggtaacgc
tattccagatgcatggcaaatctcaatataaaactcattaactcaatattcatgtgcagcattacttctttcacatgttgtggag
aagtttctttataaatggtagagtttgaaggaagtattttgaatggcagtttggggaaaacctatggtacatatgtagttagatc
tatctgtgcttgctatattagtcacatcctttcttaattcgttgacttgtttttacatatttagttttgcattgtgtaacatttg
tgatgtcatattttgtactgcag*gctcctgctatgagtgatctaaaaaaacatgagcattctatgcaaaatcagagtatgaatcc*
cagctcatcatctagcaatatggtgaatgaaaacagacctccctgttcacgtgagtcgagtcttacagtgaatgtaagtgctcag
aaccaacctgttggaatggttggtttgactgacagcatgcctgctgaagttggtacatctgagccgcagcagatgaatagctctg
acaatgccatgcaagagccgcagtctgaaaatgttgctgacaagtcggcagatgatggctacaactggcggaaatacgggcagaa
gcatgtcaagggaagtgaaaaccctagaagttactacaagtgcacacatcctaattgtgaagtaaaaaagctattggagcgtgca
gttgatggtctgatcacggaagttgtctataagggacgccacaatcatcctaagccccagcccaataggaggttagctggtggtg
cagttccttcaaaccagggtgaagaacgatatgacggcgcttcagctgctgatg...

*SUSIBA1

Fig. 2

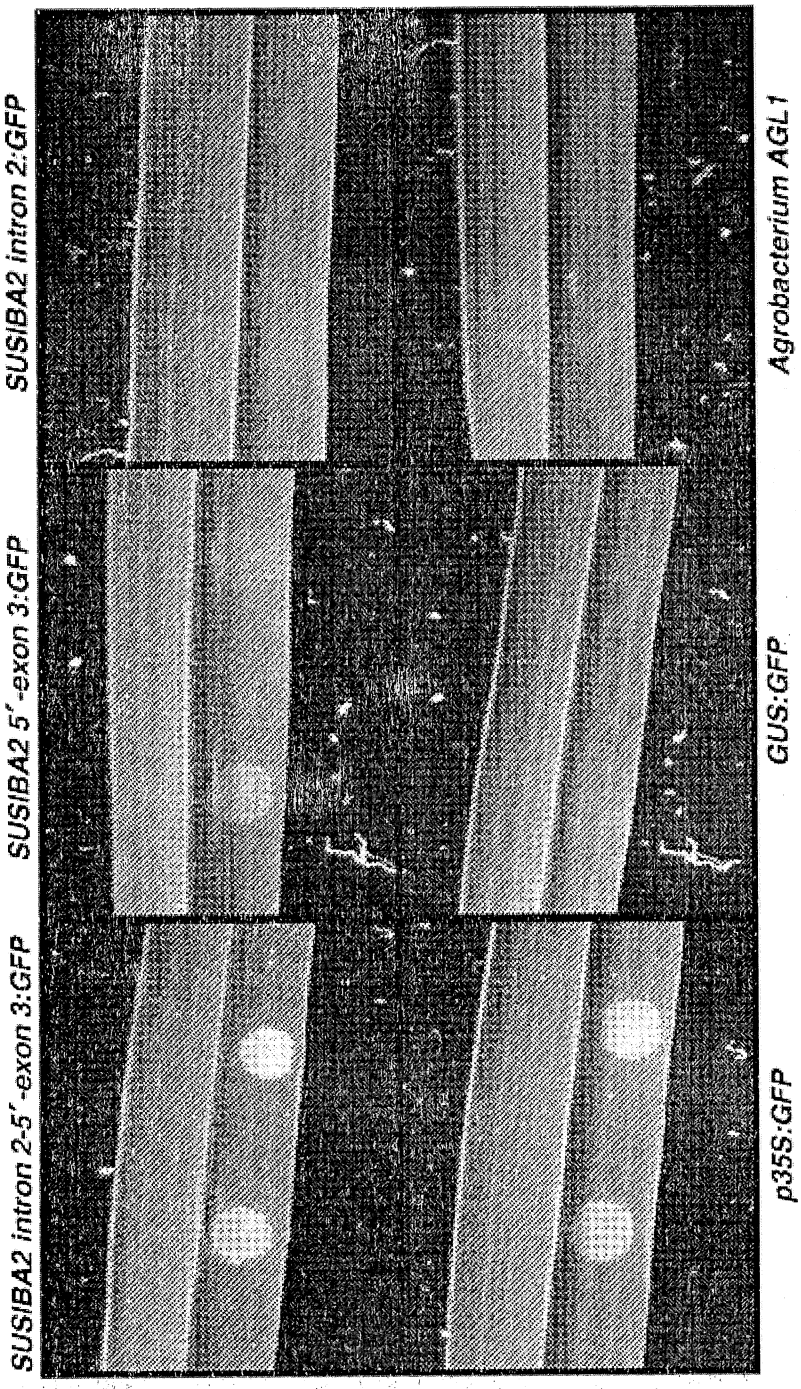

A
SUSIBA2 intron 2-5′-exon 3:GFP
SUSIBA2 5′-exon 3:GFP
SUSIBA2 intron 2:GFP
p35S:GFP
GUS:GFP
Agrobacterium AGL1

Fig. 3

B

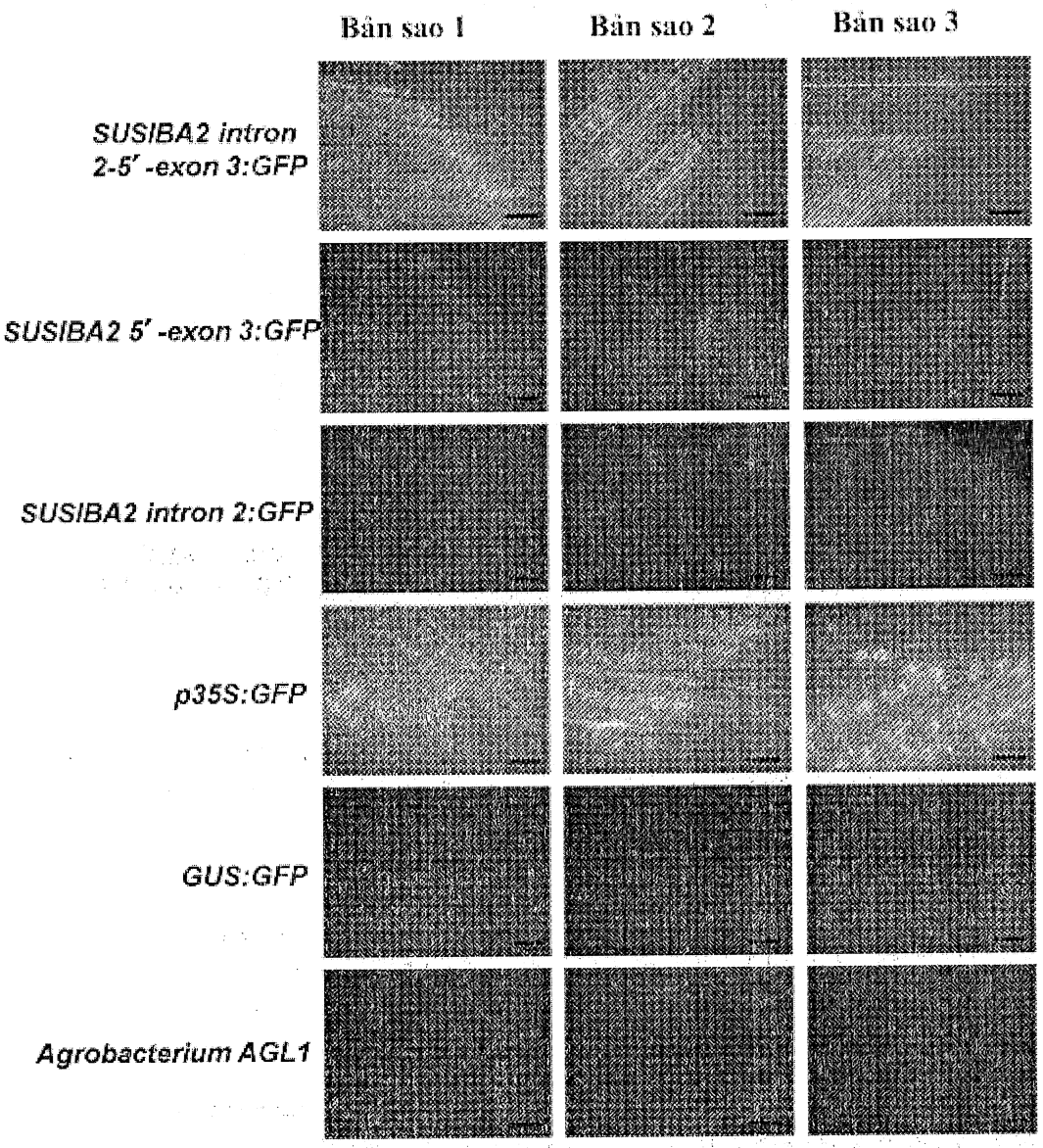

Bản sao 1
Bản sao 2
Bản sao 3
SUSIBA2 intron 2-5′ -exon 3:GFP
SUSIBA2 5′ -exon 3:GFP
SUSIBA2 intron 2:GFP
p35S:GFP
GUS:GFP
Agrobacterium AGL1

Fig. 3

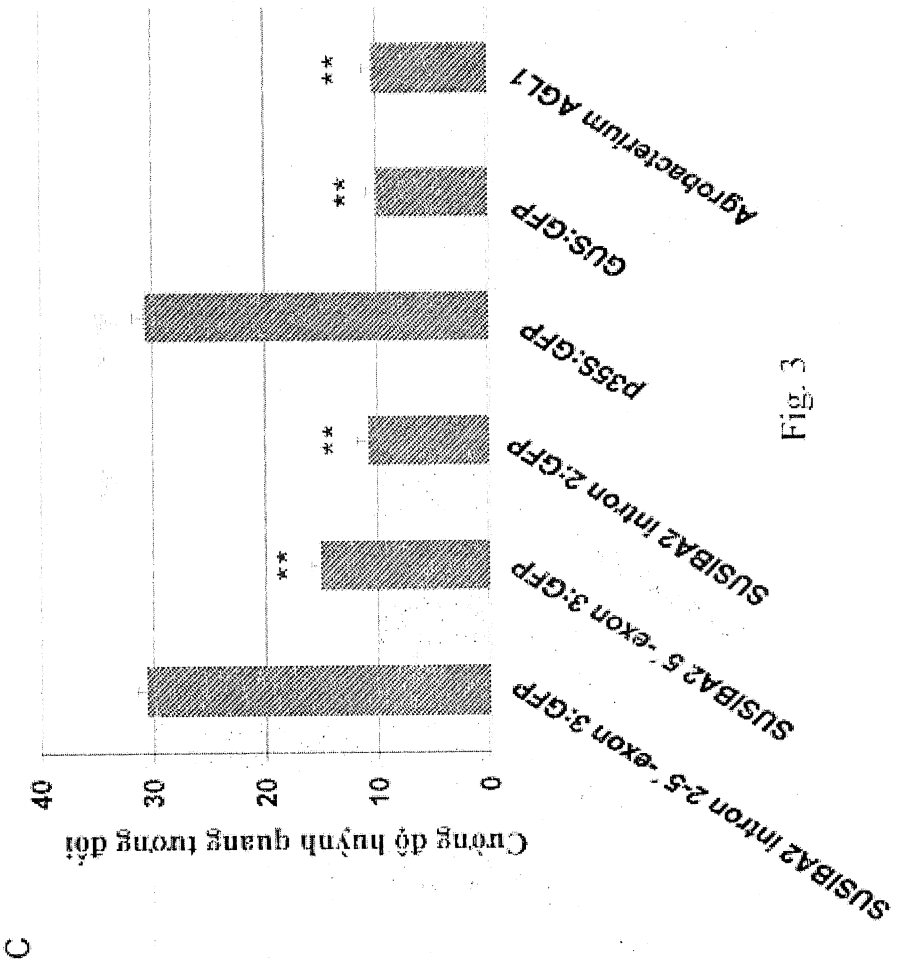
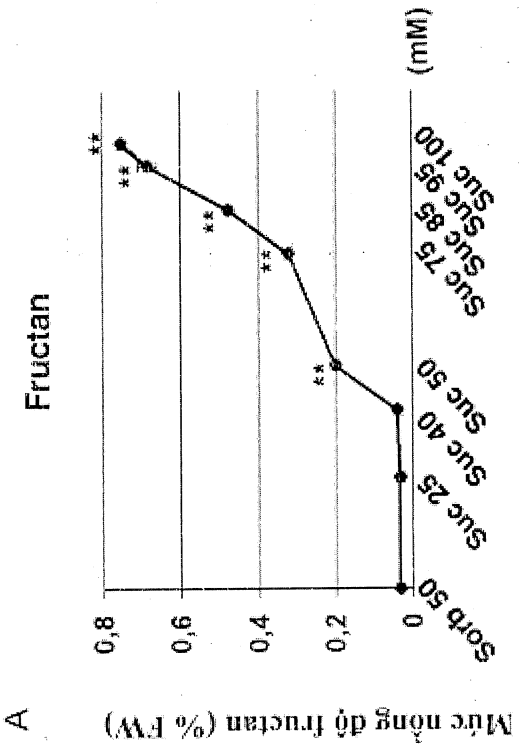

C
Cường độ huỳnh quang trong đôi
40
30
20
10
0
**
**
**
**
SUSIBA2 intron 2-5 -exon 3:GFP
SUSIBA2 5 -exon 3:GFP
SUSIBA2 intron 2:GFP
p35S:GFP
GUS:GFP
Agrobacterium AGL1

Fig. 3


A
Fructan
Mức nồng độ fructan (% FW)
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Sorb 50
Suc 25
Suc 40
Suc 50
Suc 75
Suc 85
Suc 95
Suc 100
(mM)
**

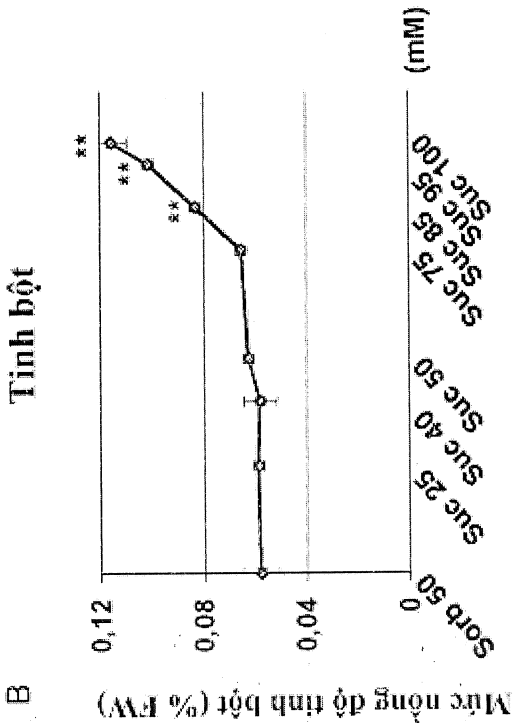

B
Tinh bột
Mức nồng độ tinh bột (% FW)
0,12
0,08
0,04
0
Sorb 50
Suc 25
Suc 40
Suc 50
Suc 75
Suc 85
Suc 95
Suc 100
(mM)
**

Fig. 4

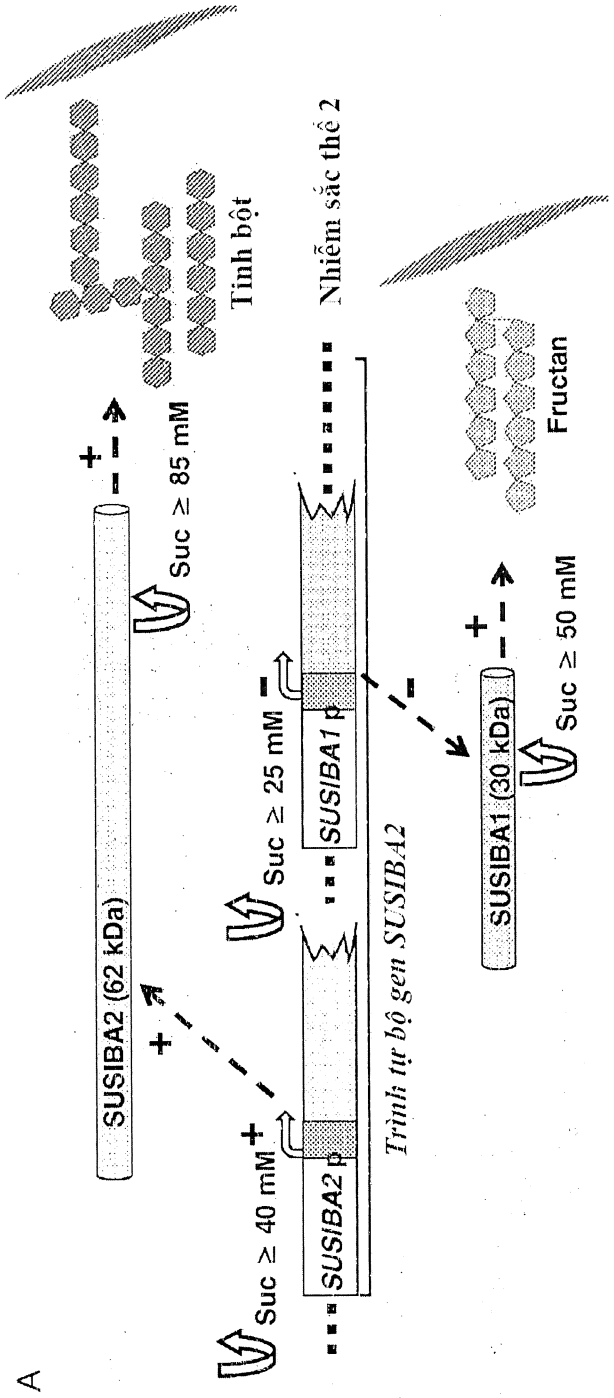

A
SUSIBA2 (62 kDa)
Suc ≥ 85 mM
Suc ≥ 40 mM
SUSIBA2 p
Suc ≥ 25 mM
SUSIBA1 p
Trình tự bộ gen SUSIBA2
SUSIBA1 (30 kDa)
Suc ≥ 50 mM
Tinh bột
Nhiễm sắc thể 2
Fructan

Fig. 5

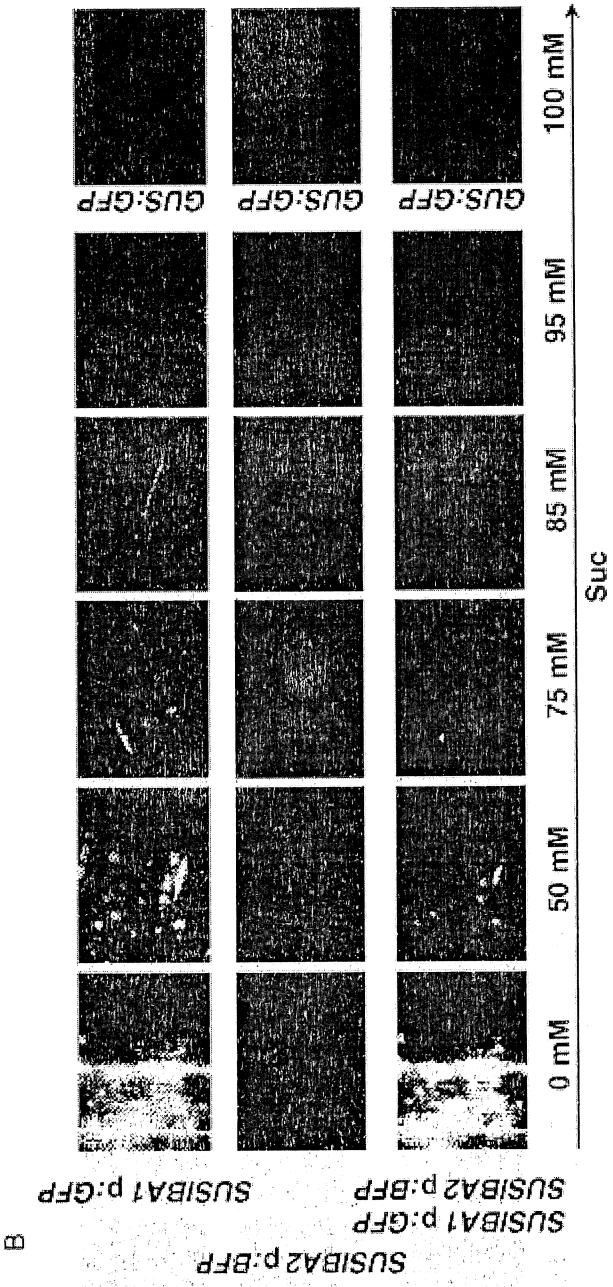

B
SUSIBA2 p:BFP
SUSIBA1 p:GFP
SUSIBA2 p:BFP
SUSIBA1 p:GFP
0 mM
50 mM
75 mM
85 mM
95 mM
100 mM
Suc
GUS:GFP
GUS:GFP
GUS:GFP

Fig. 5

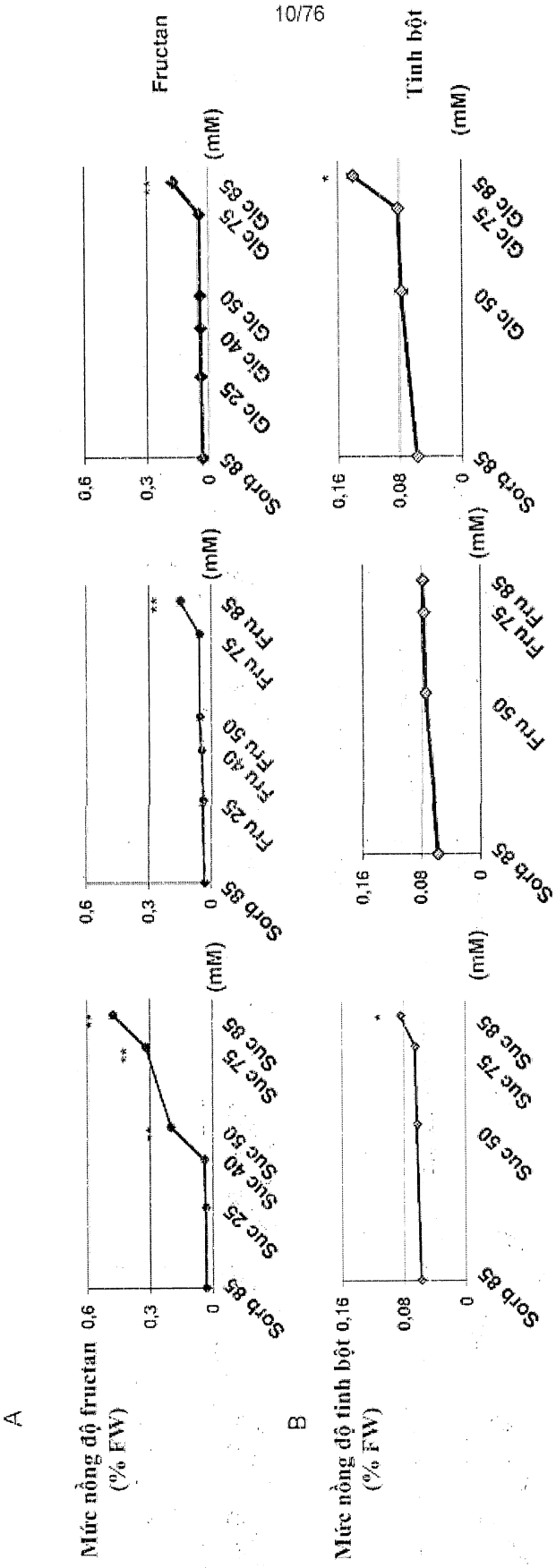

A
Mức nồng độ fructan (% FW)
Fructan
B
Mức nồng độ tinh bột (% FW)
Tinh bột
Sorb 85
Suc 25
Suc 40
Suc 50
Suc 75
Suc 85
Fru 25
Fru 40
Fru 50
Fru 75
Fru 85
Glc 25
Glc 40
Glc 50
Glc 75
Glc 85
(mM)
0,6
0,3
0
0,16
0,08
*
**

Fig. 6

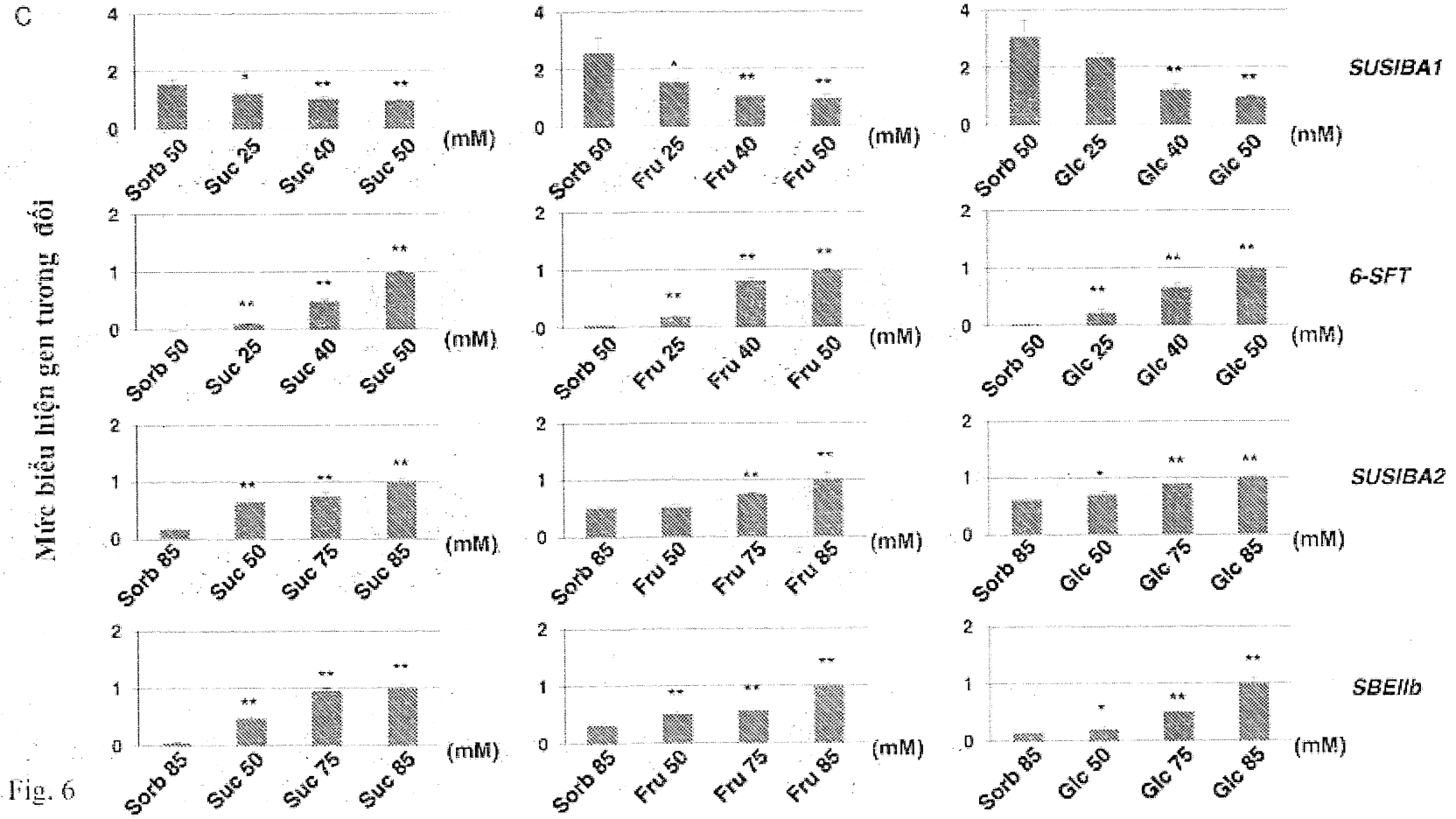

C
Mức biểu hiện gen tương đối
SUSIBA1
6-SFT
SUSIBA2
SBEIIb
Sorb 50
Suc 25
Suc 40
Suc 50
Fru 25
Fru 40
Fru 50
Glc 25
Glc 40
Glc 50
Sorb 85
Suc 50
Suc 75
Suc 85
Fru 50
Fru 75
Fru 85
Glc 50
Glc 75
Glc 85
(mM)

Fig. 6

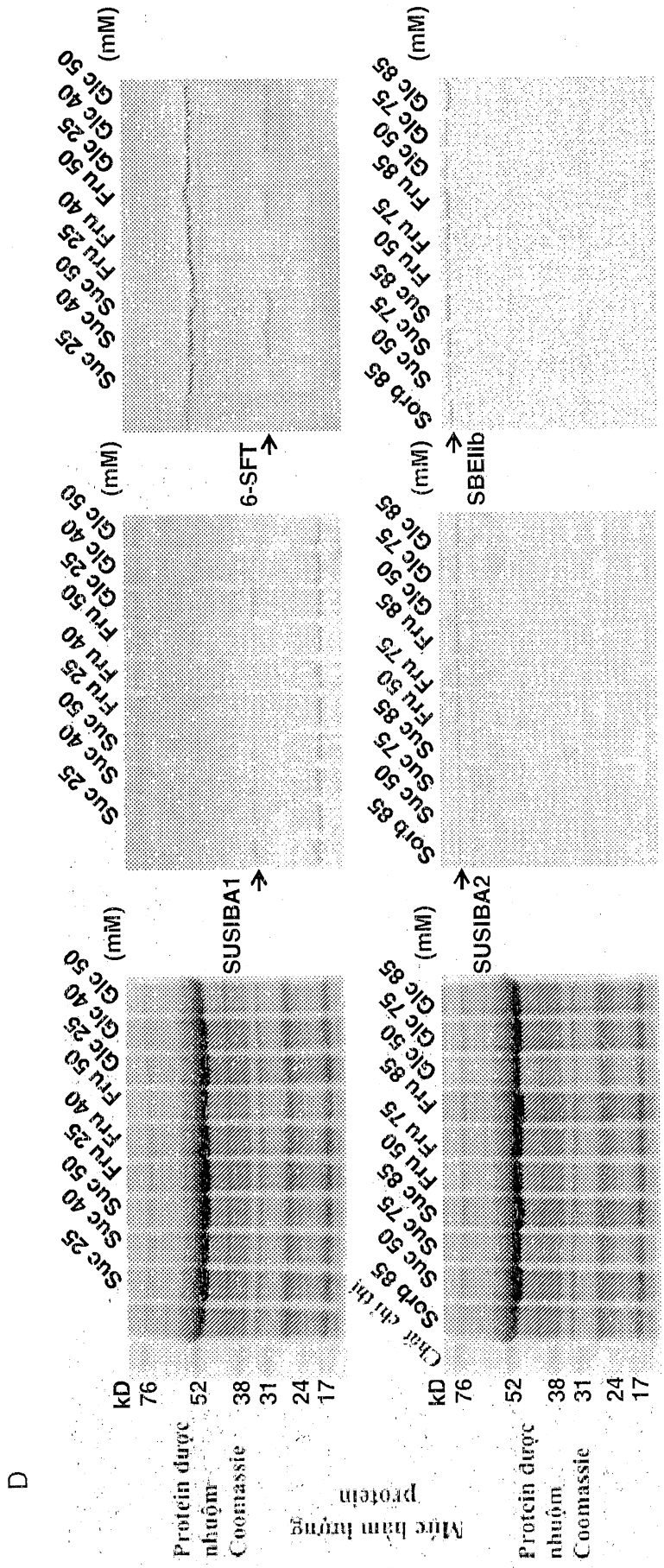

D
Protein được nhuộm Coomassie
kD
76
52
38
31
24
17
Suc 25
Suc 40
Suc 50
Fru 25
Fru 40
Fru 50
Glc 25
Glc 40
Glc 50
(mM)
SUSIBA1
6-SFT
Mức hàm lượng protein
Chất chỉ thị
Sorb 85
Suc 50
Suc 75
Fru 50
Fru 75
Fru 85
Glc 50
Glc 75
Glc 85
SUSIBA2
SBEIIb

Fig.6

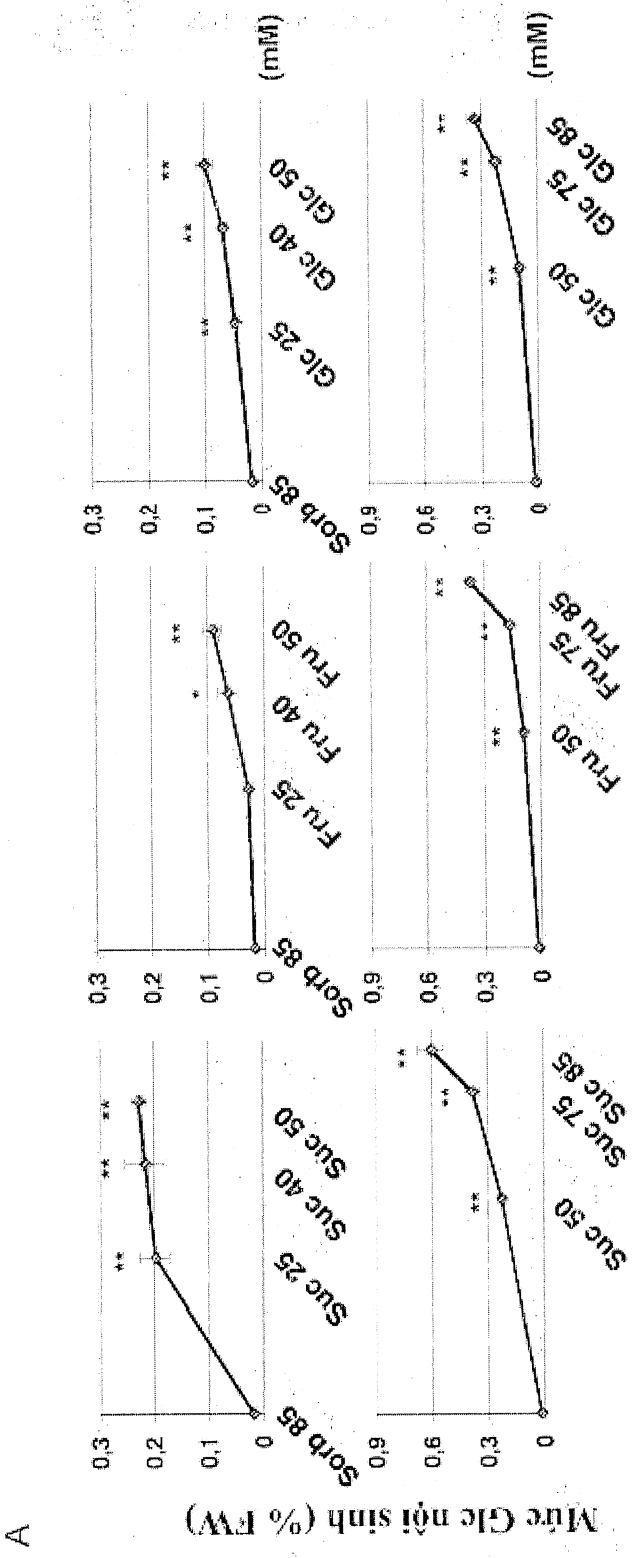

A
Mức Glc nội sinh (% FW)
0,3
0,2
0,1
0
Sorb 85
Suc 25
Suc 40
Suc 50
0,9
0,6
0,3
0
Suc 50
Suc 75
Suc 85
Fru 25
Fru 40
Fru 50
Fru 50
Fru 75
Fru 85
Glc 25
Glc 40
Glc 50
Glc 50
Glc 75
Glc 85
(mM)
(mM)

Fig. 7

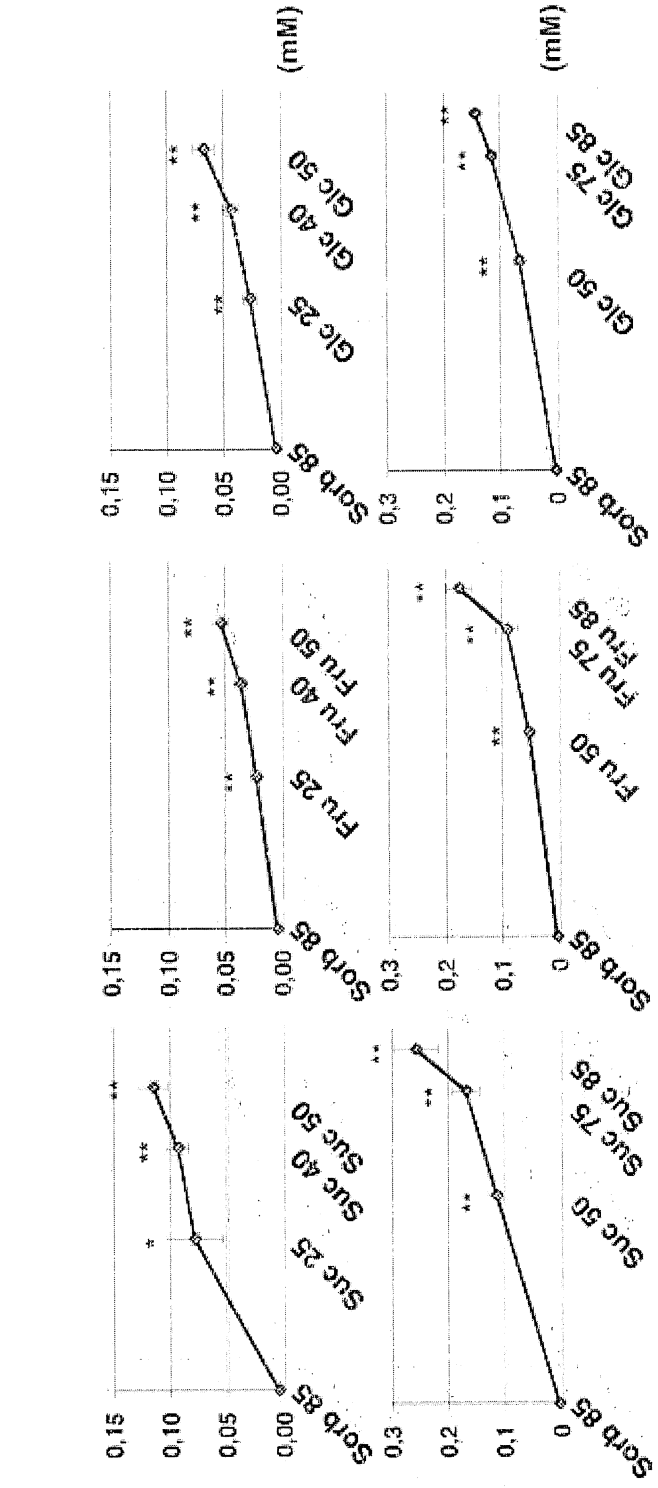

B
Mức Fru nội sinh (% FW)
0,15
0,10
0,05
0,00
Sorb 85
Suc 25
Suc 40
Suc 50
Suc 50
Suc 75
Suc 85
0,3
0,2
0,1
0
Sorb 85
Fru 25
Fru 40
Fru 50
Fru 50
Fru 75
Fru 85
0,15
0,10
0,05
0,00
Sorb 85
Glc 25
Glc 40
Glc 50
Glc 50
Glc 75
Glc 85
0,3
0,2
0,1
0
Sorb 85
(mM)
(mM)

Fig. 7

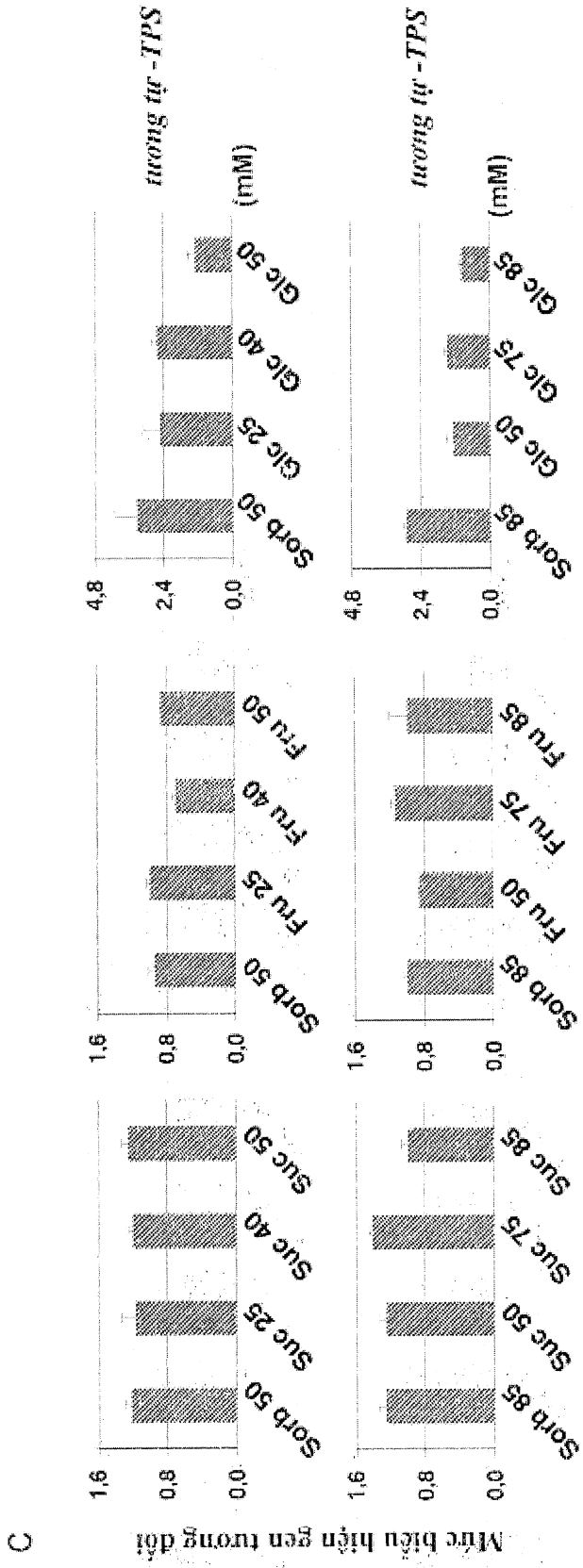

C
Mức biểu hiện gen tương đối
1,6
0,8
0,0
Sorb 50
Suc 25
Suc 40
Suc 50
Sorb 85
Suc 50
Suc 75
Suc 85
Fru 25
Fru 40
Fru 50
Fru 75
Fru 85
4,8
2,4
tương tự -TPS
(mM)
Glc 25
Glc 40
Glc 50
Glc 75
Glc 85

Fig. 7

D

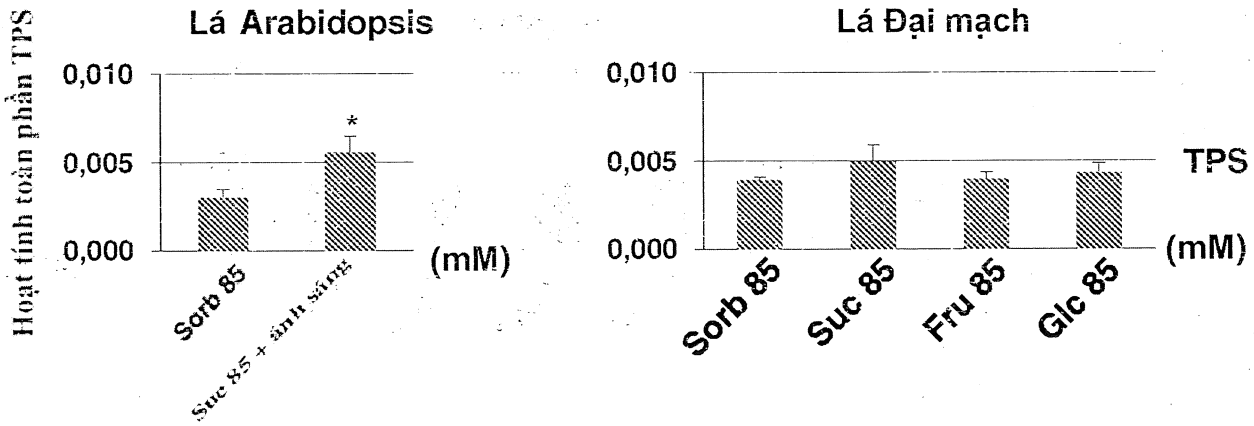

Lá Arabidopsis
Hoạt tính toàn phần TPS
0,010
0,005
0,000
*
(mM)
Sorb 85
Suc 85 + ánh sáng
Lá Đại mạch
0,010
0,005
0,000
TPS
(mM)
Sorb 85
Suc 85
Fru 85
Glc 85

Fig. 7

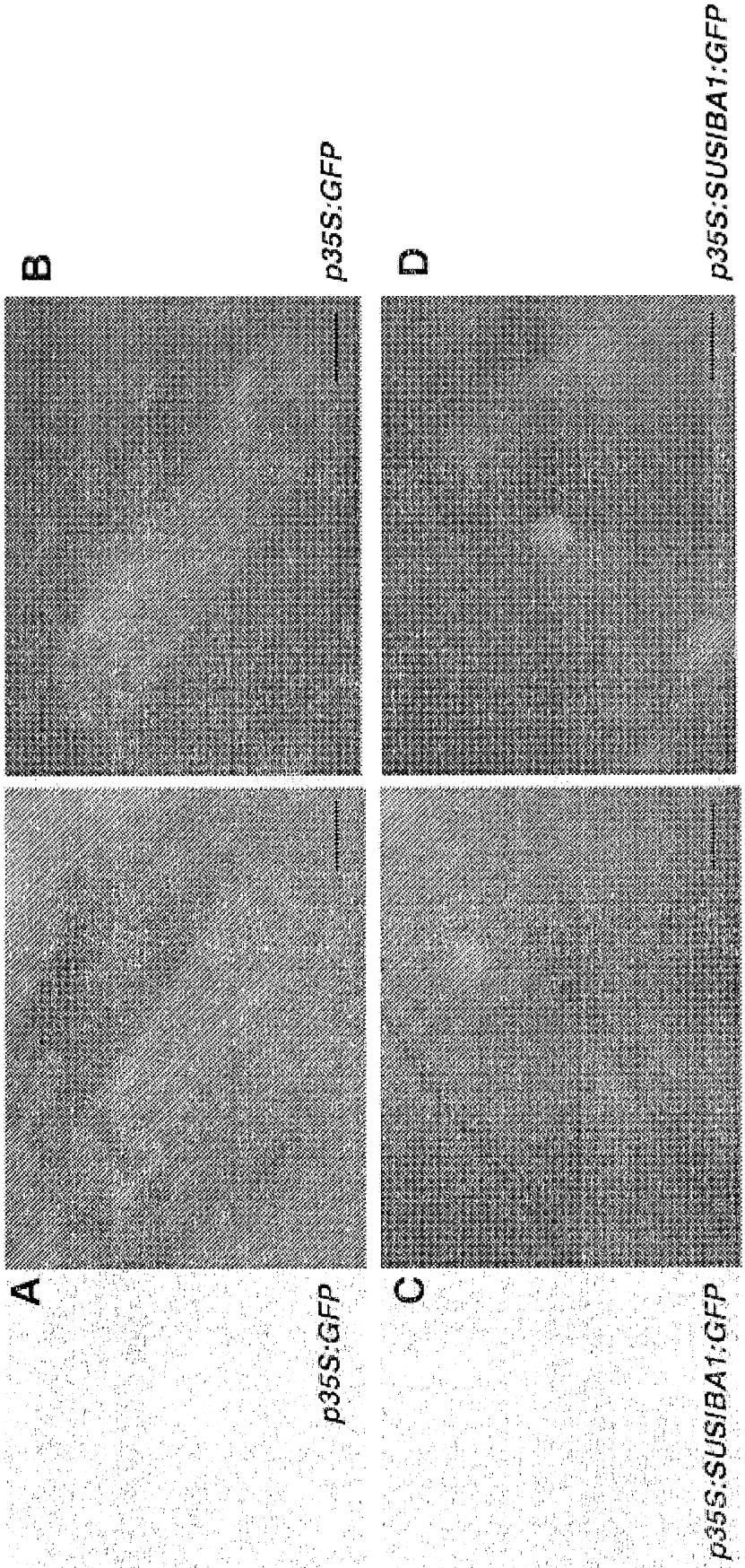
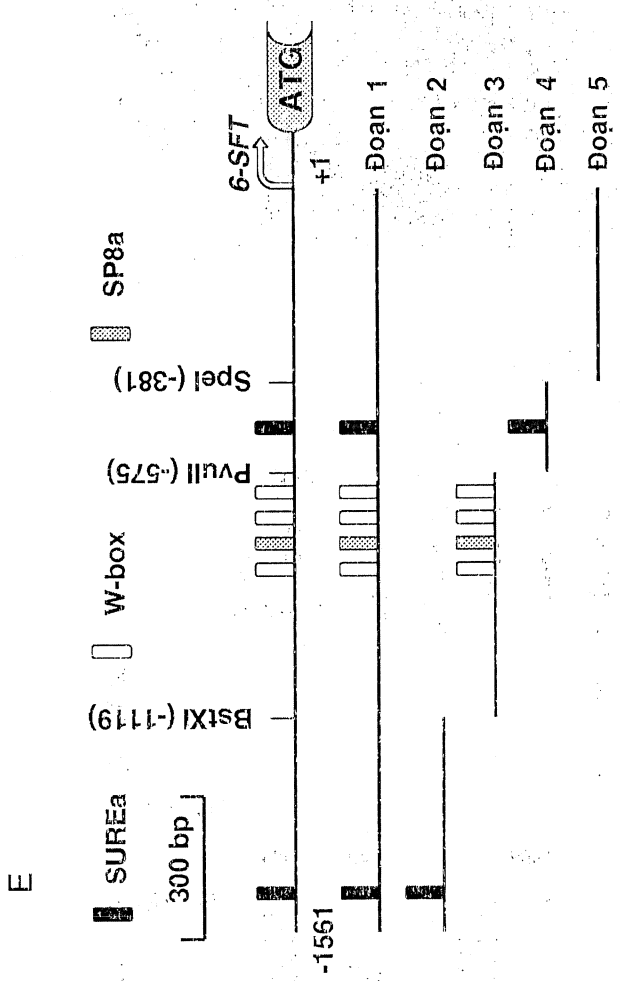


Fig. 8


E
SUREa
300 bp
BstXI (-1119)
W-box
PvuII (-575)
SpeI (-381)
SP8a
-1561
6-SFT
ATG
+1
Đoạn 1
Đoạn 2
Đoạn 3
Đoạn 4
Đoạn 5

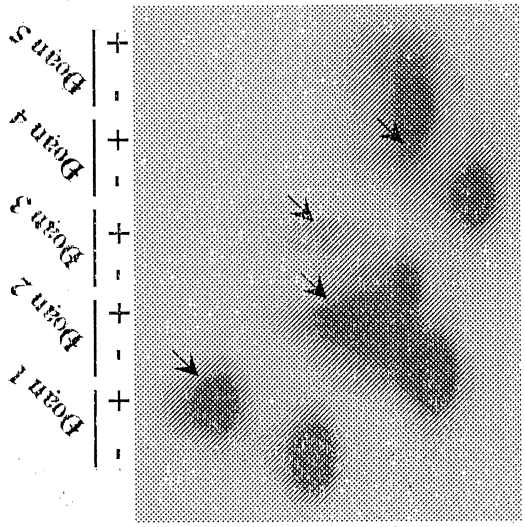
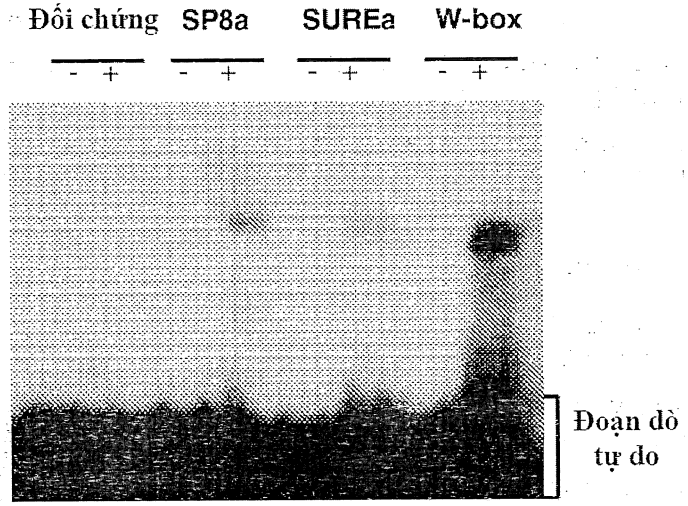

F
Đoạn 1
Đoạn 2
Đoạn 3
Đoạn 4
Đoạn 5

Fig. 8

G

Đối chứng	CAAAAAAAAAAAAAAAAAAC		
	GTTTTTTTTTTTTTTTTTTG		
SP8a	-685	CTGTACTGTGTTTTTAGCCT	-665
		GACATGACACAAAAATCGGA	
SUREa	-467	CACACATGGCACGCCAAAAC	-447
		GTGTGTACCGTGCGGTTTTG	
W-box	-712	TTATTTTGACCATATATACG	-692
		AATAAAACTGGTATATATGC	

H



I

SP8a M	CTGTAAAAAAAATTTAGCCT
	GACATTTTTTTTAAATCGGA
W-box M	TTATTAAAAAAATATATACG
	AATAATTTTTTTATATATGC
SUREa M1	CAAAAATGGCACGCCAAAAC
	GTTTTTTCCGTGCGGTTTTG
SUREa M2	CACACAAAAAACGCCAAAAC
	GTGTGTTTTTTGCGGTTTTG
SUREa M3	CACACATGGCAAAAAAAAAC
	GTGTGTACCGTTTTTTTTTG
SUREa M4	CAAAAAAAAAAAAAAAAAAC
	GTTTTTTTTTTTTTTTTTTG

Fig. 8

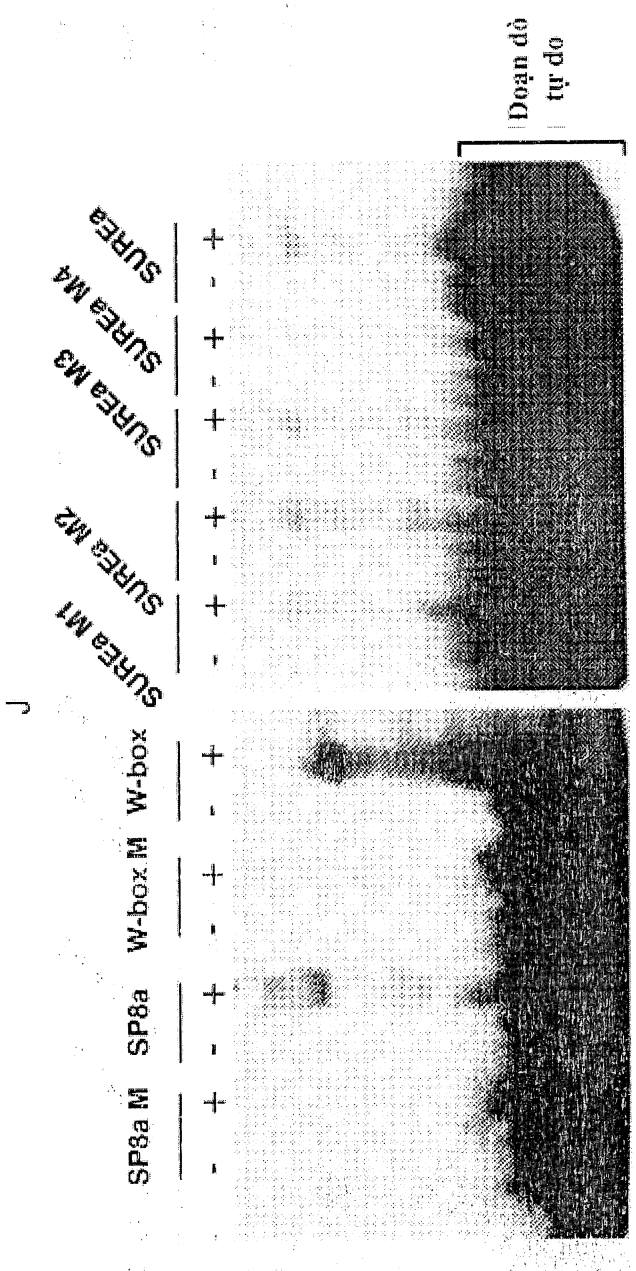

SP8a M
SP8a
W-box M
W-box
SUREA M1
SUREA M2
SUREA M3
SUREA M4
SUREA
Đoạn dò tự do

Fig. 8

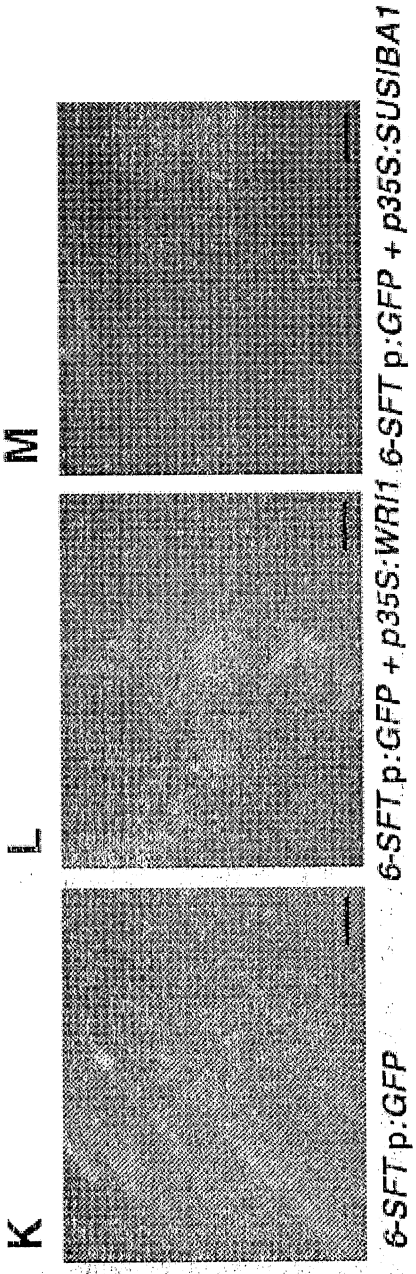

K
L
M
6-SFT p:GFP
trong 100 mM Suc
6-SFT p:GFP + p35S:WRI1
trong 100 mM Suc
6-SFT p:GFP + p35S:SUSIBA1
trong 100 mM Suc

Fig. 8

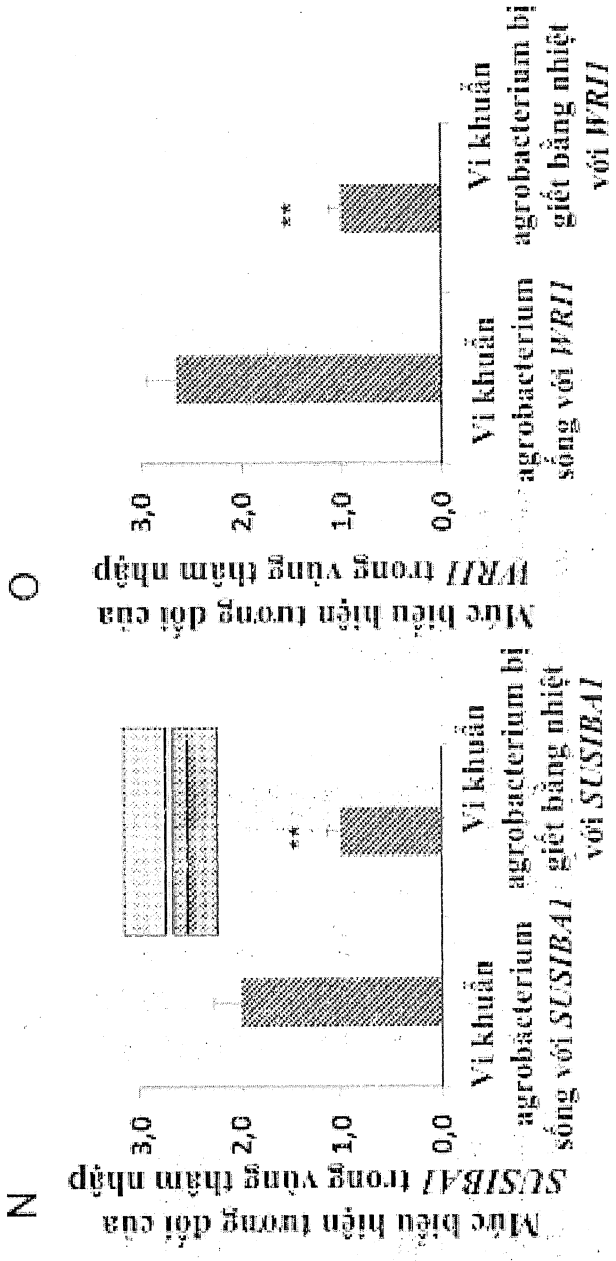

N
Mức biểu hiện tương đối của SUSIBA1 trong vùng thâm nhập
3,0
2,0
1,0
0,0
**
Vi khuẩn agrobacterium sống với SUSIBA1
Vi khuẩn agrobacterium bị giết bằng nhiệt với SUSIBA1
O
Mức biểu hiện tương đối của WRI1 trong vùng thâm nhập
3,0
2,0
1,0
0,0
**
Vi khuẩn agrobacterium sống với WRI1
Vi khuẩn agrobacterium bị giết bằng nhiệt với WRI1

Fig. 8

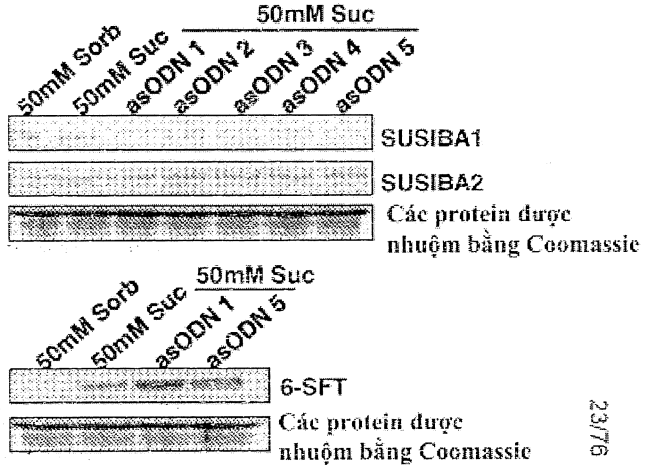
Số truy cập Ngân hàng Gen AY323206

A

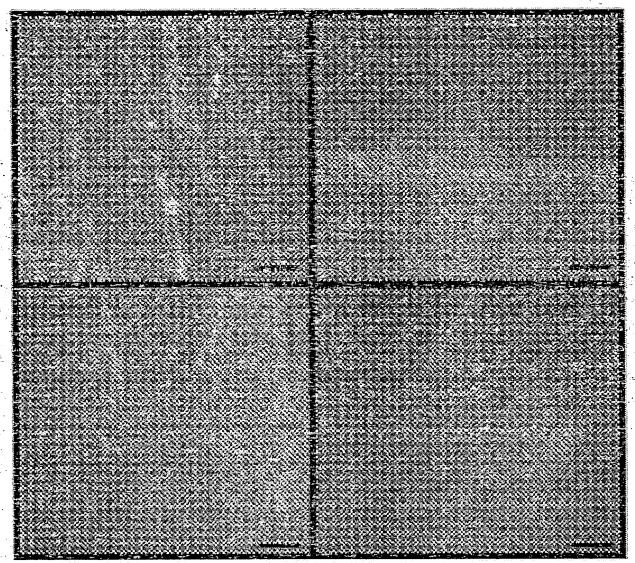
```
nt 739-756 ccgcagcagatgaatagc
   asODN 1 ggcgtcgtctacttatcg

nt 983-1000 agccccagcccaatagga
   asODN 2 tcggggtcgggttatcct

nt 1115-1132 cgcctggtatggttgagc
   asODN 3 gcggaccataccaactcg

nt 1166-1183 atgctggaggtggaagac
   asODN 4 tacgacctccaccttctg

nt 1237-1254 aaaatggagtctgctggt
   asODN 5 ttttacctcagacgacca
```

Fig. 9

B



C



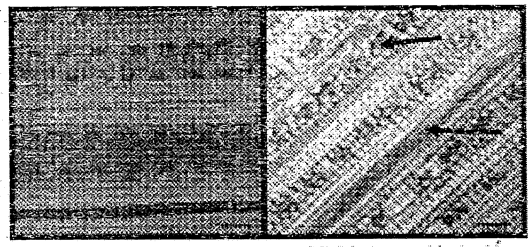
SUSIBA2 intron2-5′-exon3:GFP + 50 mM Suc

SUSIBA2 intron2-5′-exon3:GFP + 100 mM Suc

SUSIBA2 intron2-5′-exon3:GFP + sODN trong 50 mM Suc

SUSIBA2 intron2-5′-exon3:GFP + asODN 1 trong 50 mM Suc

D



50 mM Suc

asODN được đánh dấu bằng huỳnh quang trong 50 mM Suc

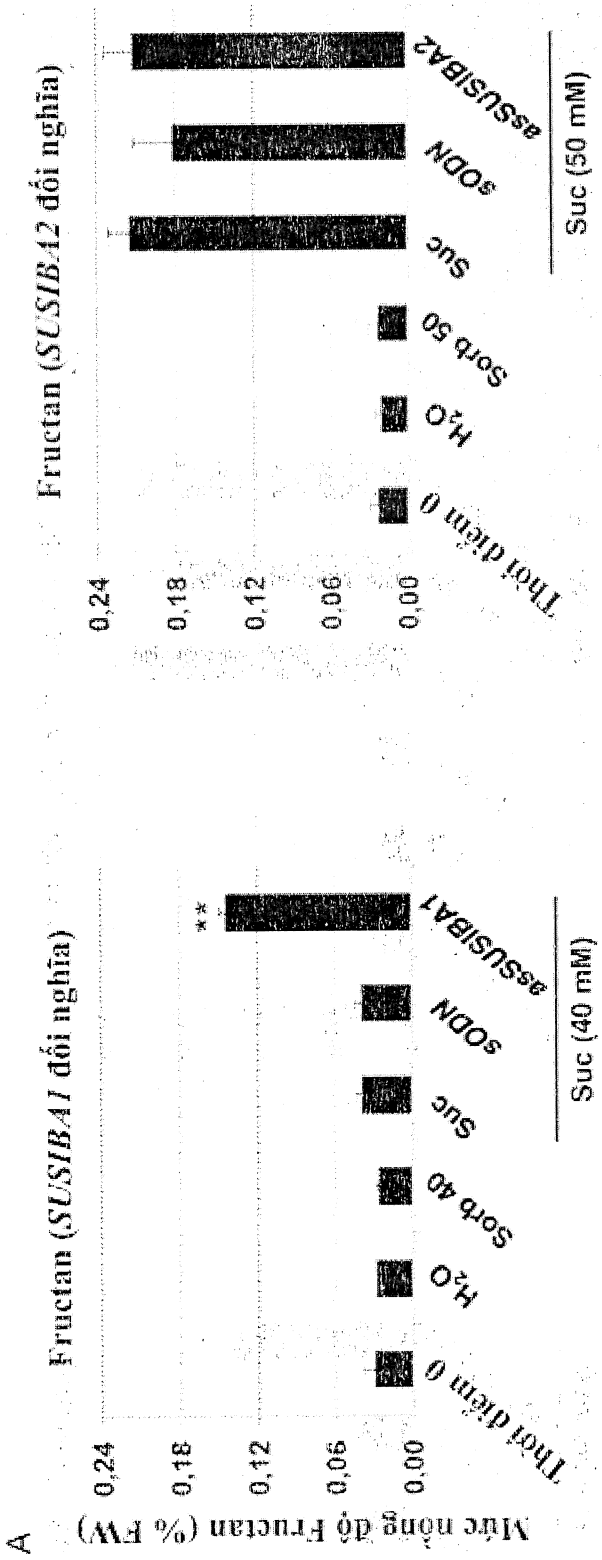

A
Mức nồng độ Fructan (% FW)
0,24
0,18
0,12
0,06
0,00
Fructan (SUSIBA1 đối nghĩa)
**
Thời điểm 0
H2O
Sorb 40
Suc
sODN
asSUSIBA1
Suc (40 mM)
Fructan (SUSIBA2 đối nghĩa)
Thời điểm 0
H2O
Sorb 50
Suc
sODN
asSUSIBA2
Suc (50 mM)

Fig. 10

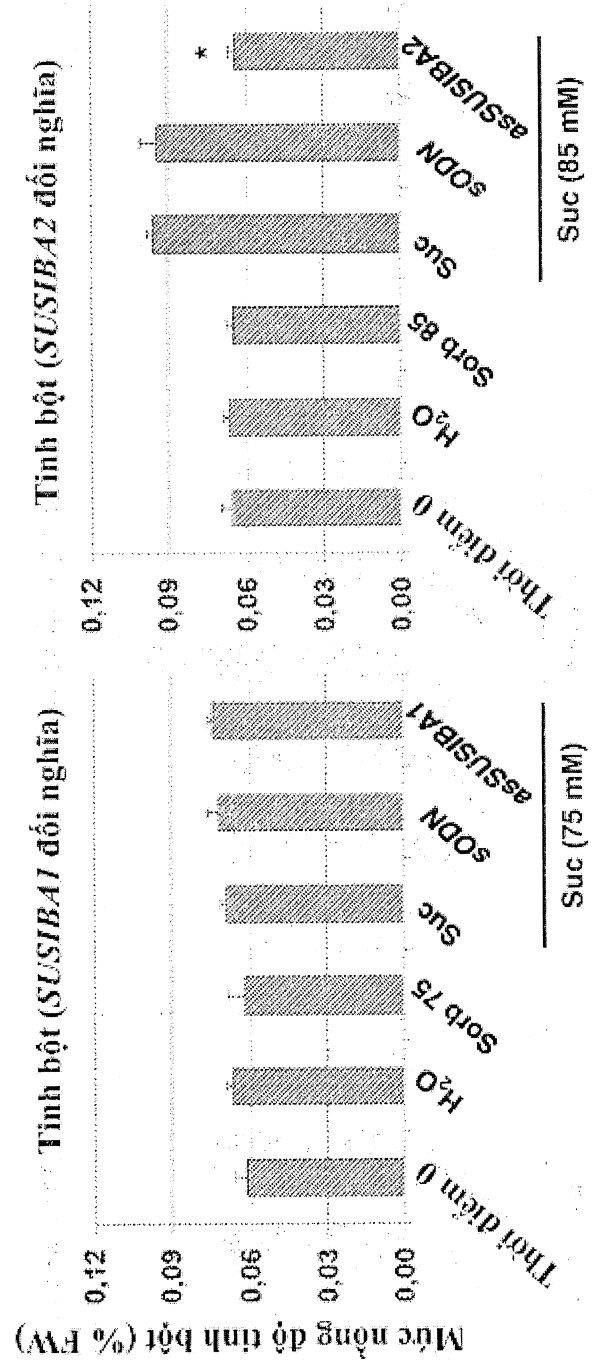

B
Mức nồng độ tinh bột (% FW)
0,12
0,09
0,06
0,03
0,00
Tinh bột (SUSIBA1 đối nghĩa)
Thời điểm 0
H2O
Sorb 75
Suc
SODN
asSUSIBA1
Suc (75 mM)
Tinh bột (SUSIBA2 đối nghĩa)
Thời điểm 0
H2O
Sorb 85
Suc
SODN
asSUSIBA2
Suc (85 mM)
*

Fig. 10

A

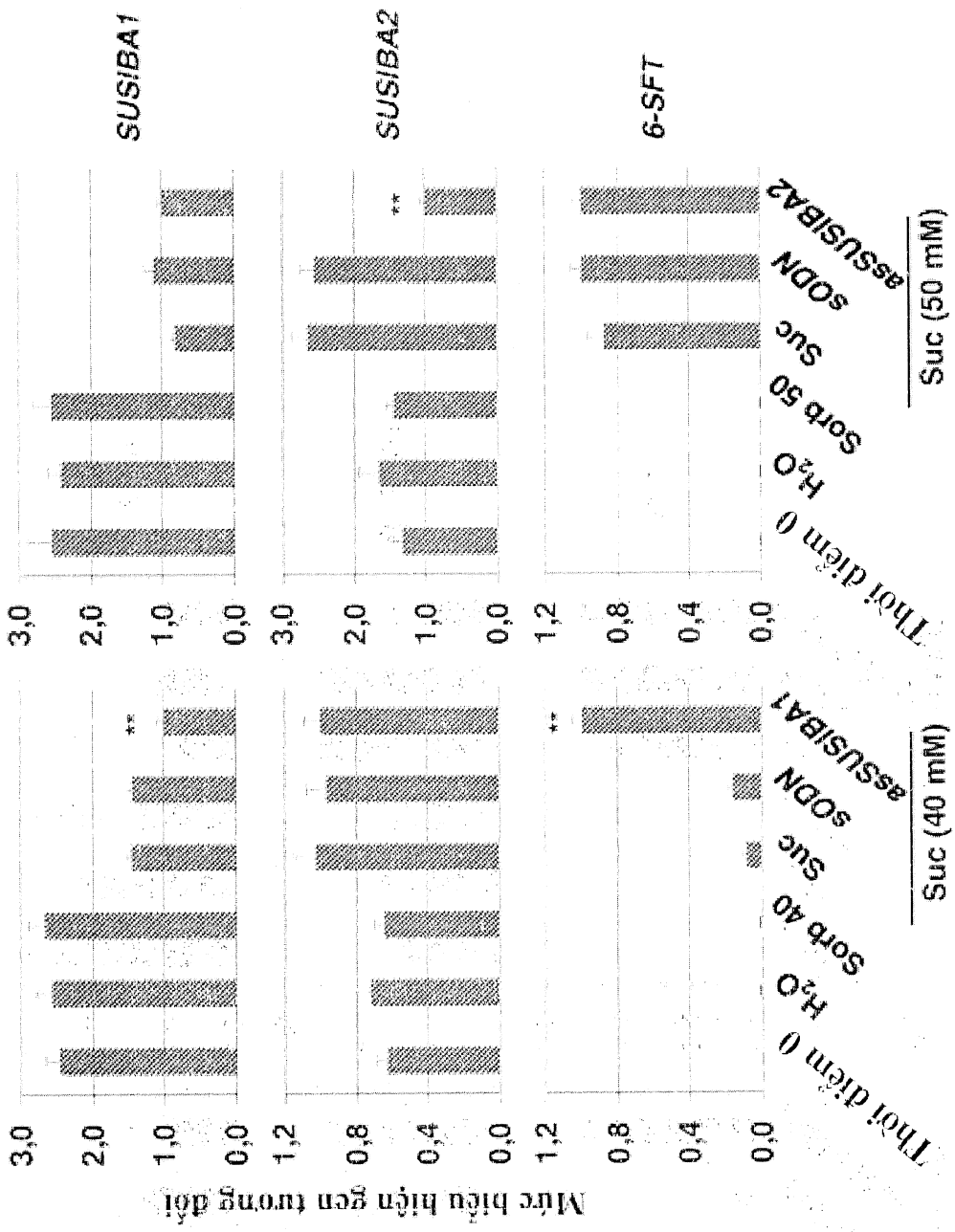

SUSIBA1
SUSIBA2
6-SFT
Mức biểu hiện gen tương đối
3,0
2,0
1,0
0,0
1,2
0,8
0,4
0,0
**
Thời điểm 0
H2O
Sorb 40
Suc
SODN
asSUSIBA1
Suc (40 mM)
Sorb 50
asSUSIBA2
Suc (50 mM)

Fig. 11

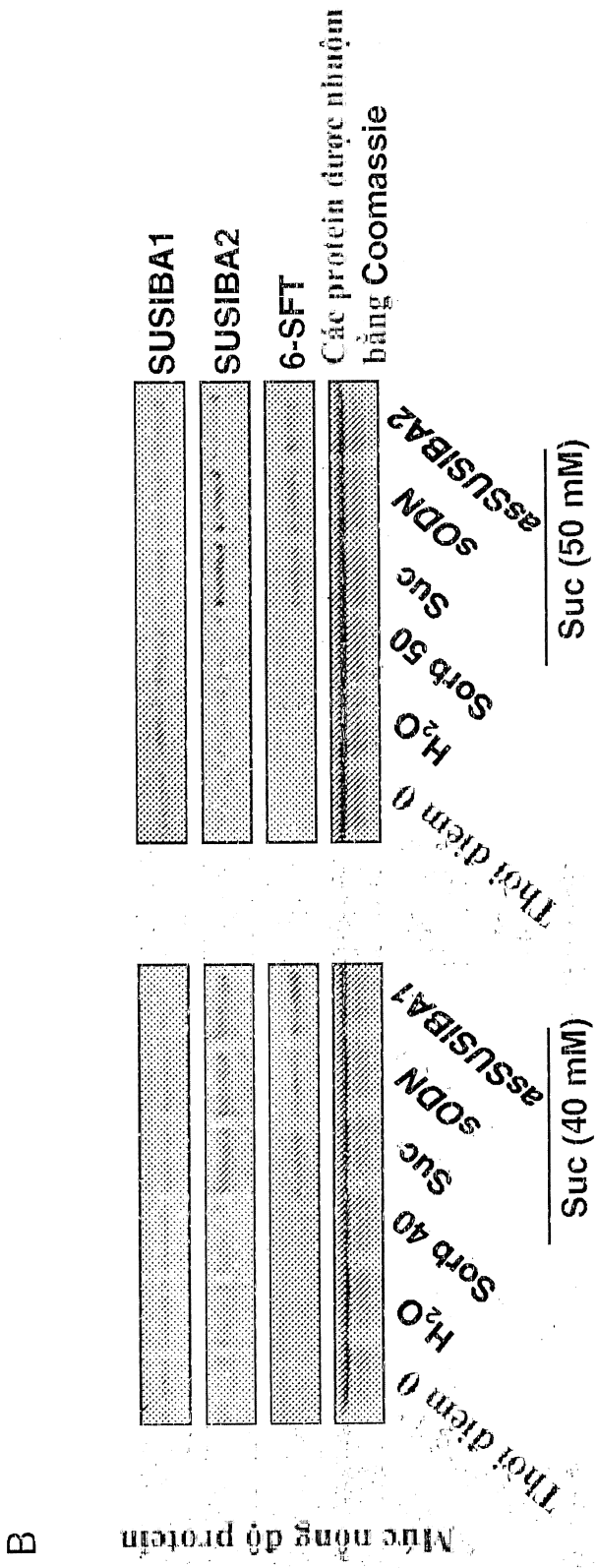

B
Mức nồng độ protein
Thời điểm 0
H2O
Sorb 40
Suc
SODN
assUSIBA1
Suc (40 mM)
Thời điểm 0
H2O
Sorb 50
Suc
SODN
assUSIBA2
Suc (50 mM)
SUSIBA1
SUSIBA2
6-SFT
Các protein được nhuộm bằng Coomassie

Fig. 11

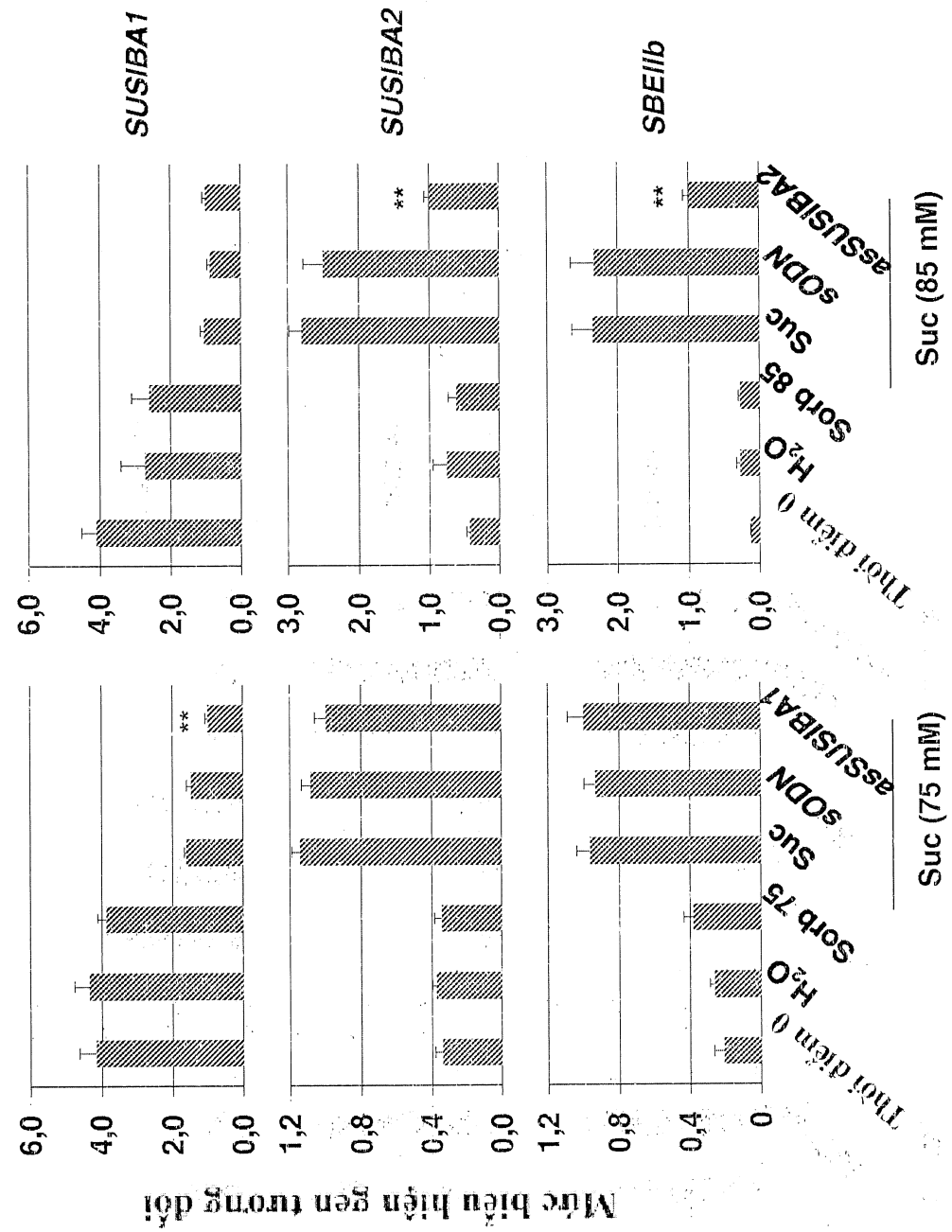

A
Mức biểu hiện gen trong đôi
SUSIBA1
SUSIBA2
SBEIIb
6,0
4,0
2,0
0,0
3,0
2,0
1,0
0,0
1,2
0,8
0,4
0
**
Thời điểm 0
H2O
Sorb 75
Suc
sODN
assUSIBA1
Suc (75 mM)
Sorb 85
assUSIBA2
Suc (85 mM)

Fig. 12

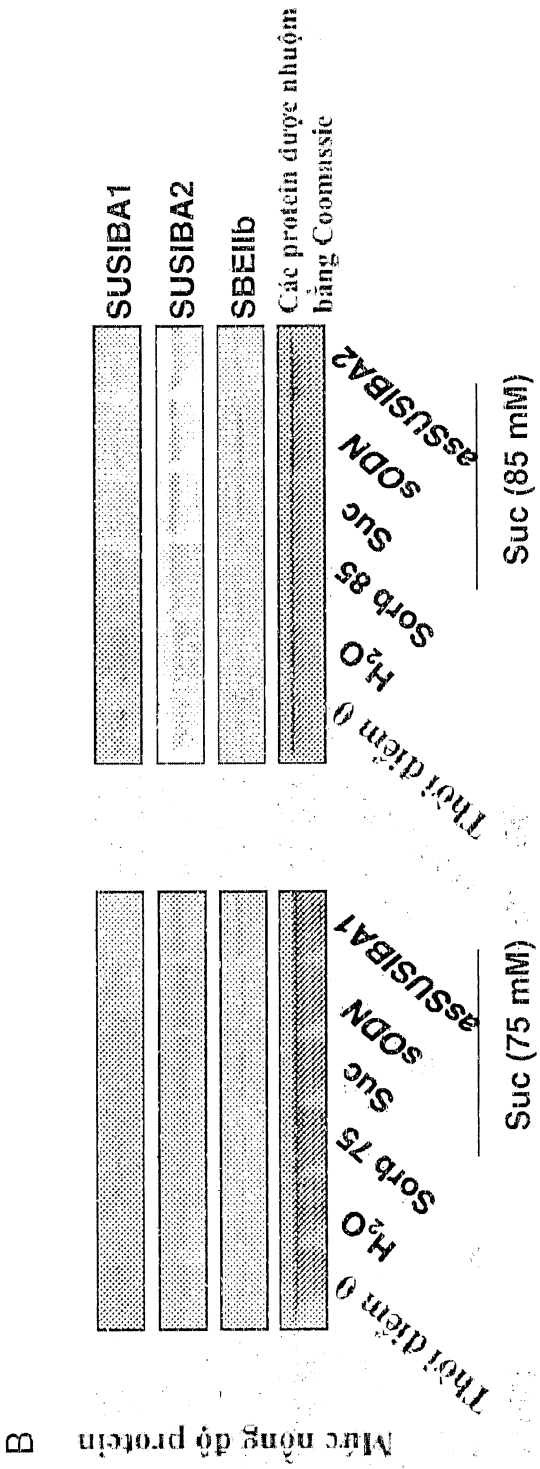

B
Mức nồng độ protein
Thời điểm 0
H2O
Sorb 75
Suc
SODN
asSUSIBA1
Suc (75 mM)
Thời điểm 0
H2O
Sorb 85
Suc
SODN
asSUSIBA2
Suc (85 mM)
SUSIBA1
SUSIBA2
SBEIIb
Các protein được nhuộm bằng Coomassie

Fig. 12

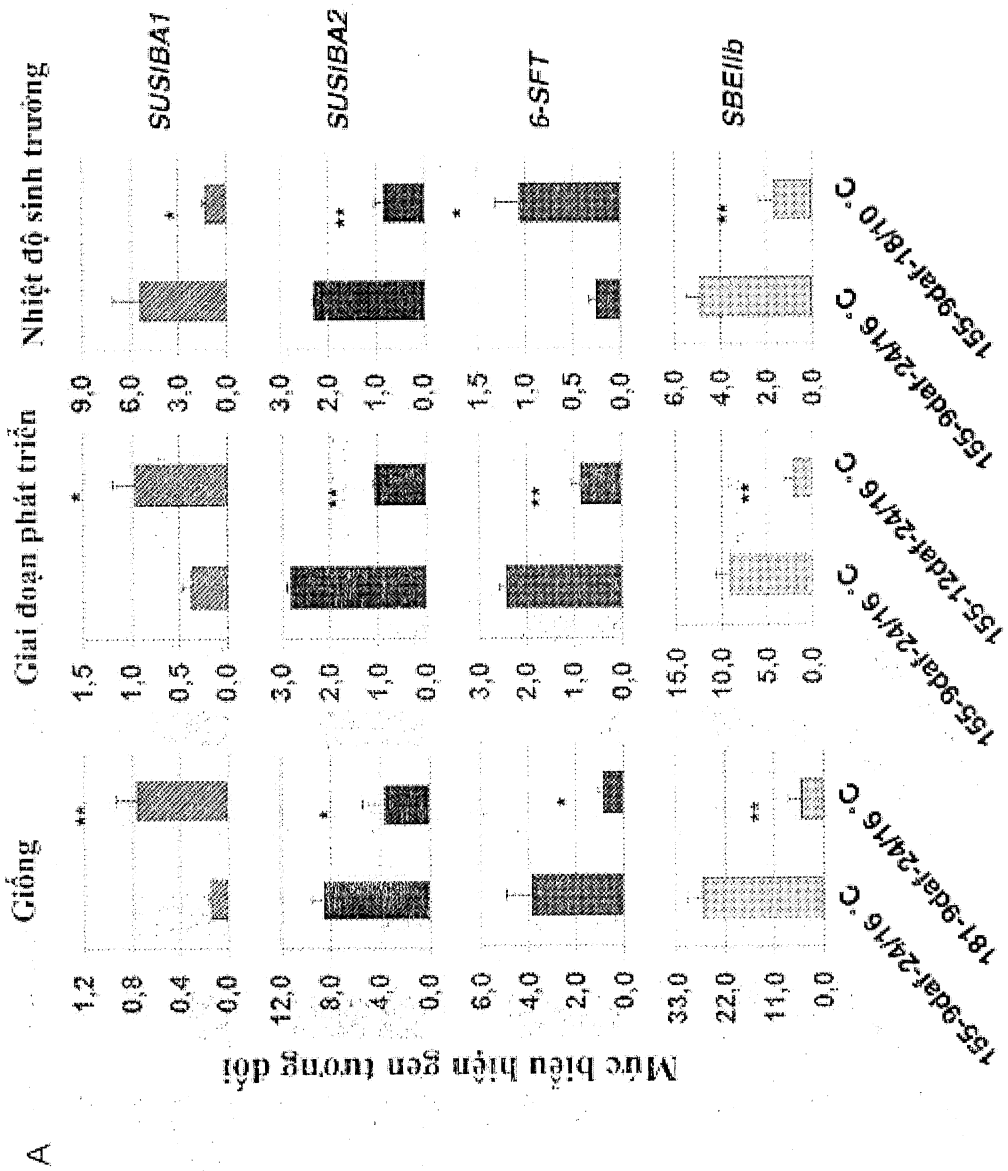

A
Giống
Giai đoạn phát triển
Nhiệt độ sinh trưởng
Mức biểu hiện gen tương đối
SUSIBA1
SUSIBA2
6-SFT
SBEIIb
155-9daf-24/16 °C
181-9daf-24/16 °C
155-9daf-24/16 °C
155-12daf-24/16 °C
155-9daf-24/16 °C
155-9daf-18/10 °C

Fig. 13

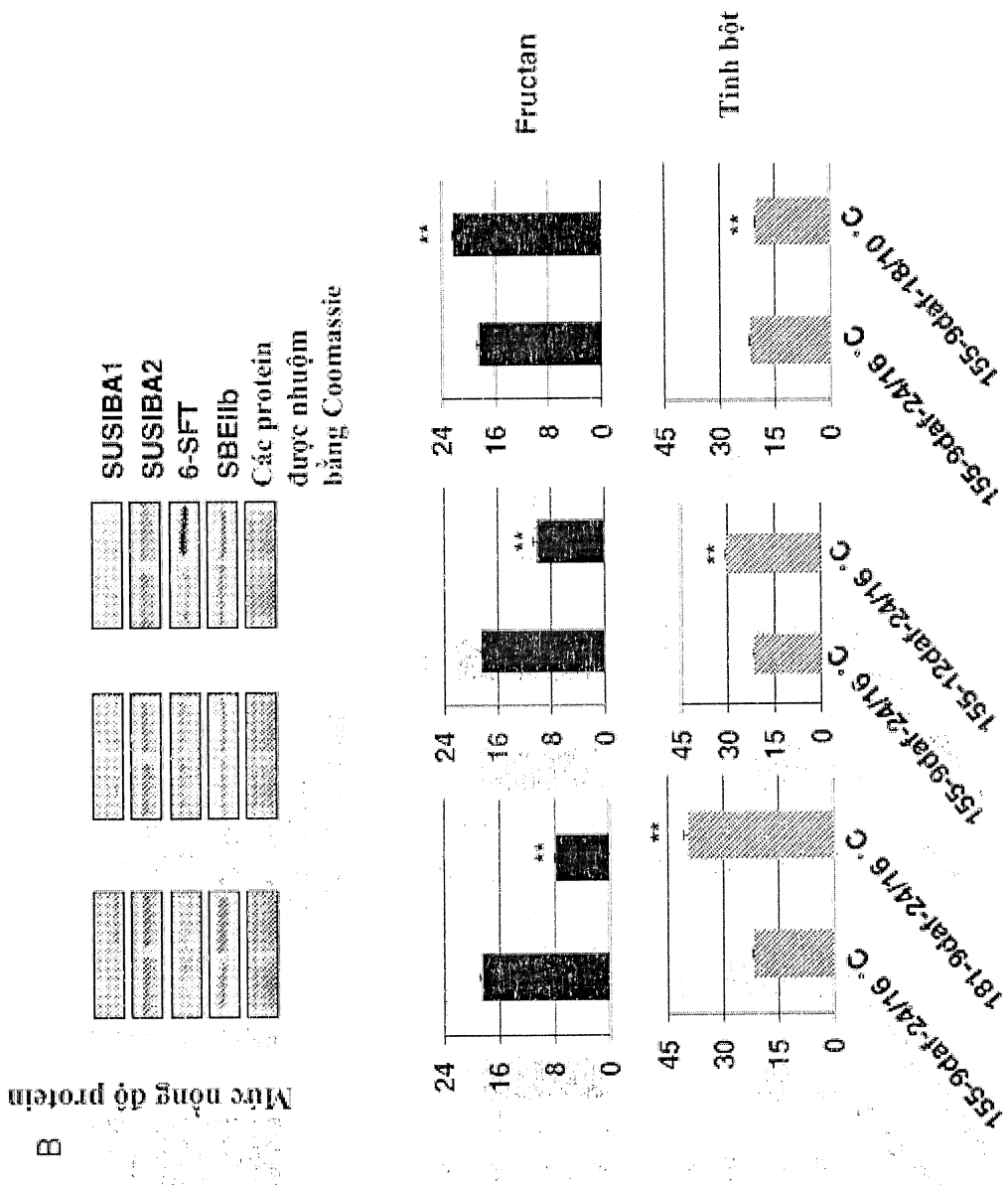

B
SUSIBA1
SUSIBA2
6-SFT
SBEIIb
Các protein được nhuộm bằng Coomassie
Mức nồng độ protein
C
Mức nồng độ (% DW)
Fructan
Tinh bột
155-9dat-24/16 °C
155-9dat-18/10 °C
155-12dat-24/16 °C
155-9dat-24/16 °C
181-9dat-24/16 °C
155-9dat-24/16 °C
24
16
8
0
45
30
15
0
**

Fig. 13

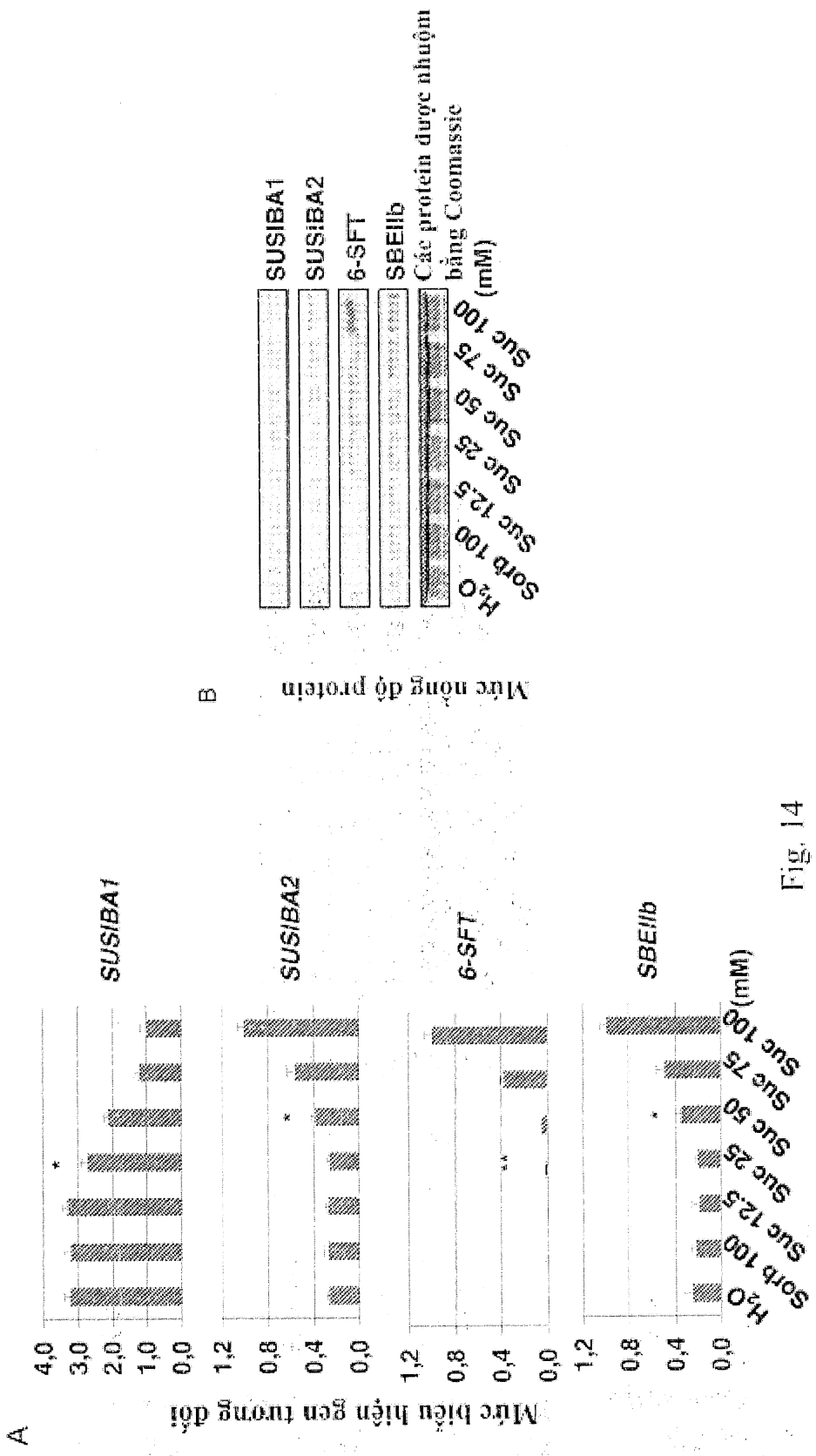

A
Mức biểu hiện gen tương đối
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
1,2
0,8
0,4
0,0
SUSIBA1
SUSIBA2
6-SFT
SBEIIb
H2O
Sorb 100
Suc 12,5
Suc 25
Suc 50
Suc 75
Suc 100
(mM)
B
Mức nồng độ protein
SUSIBA1
SUSIBA2
6-SFT
SBEIIb
Các protein được nhuộm bằng Coomassie
H2O
Sorb 100
Suc 12,5
Suc 25
Suc 50
Suc 75
Suc 100
(mM)

Fig. 14

A

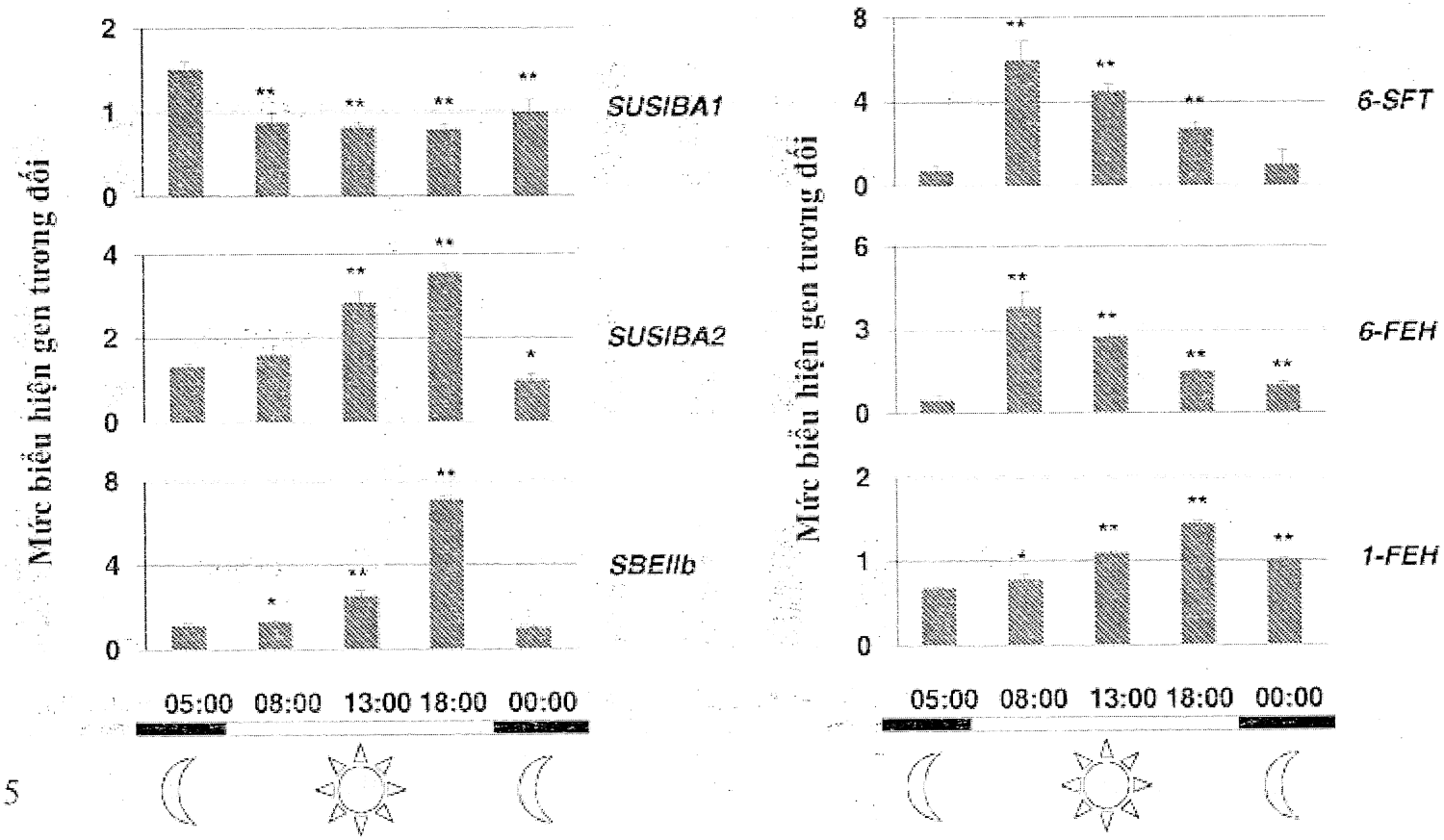

Mức biểu hiện gen tương đối
SUSIBA1
SUSIBA2
SBEIIb
6-SFT
6-FEH
1-FEH
05:00 08:00 13:00 18:00 00:00

Fig. 15

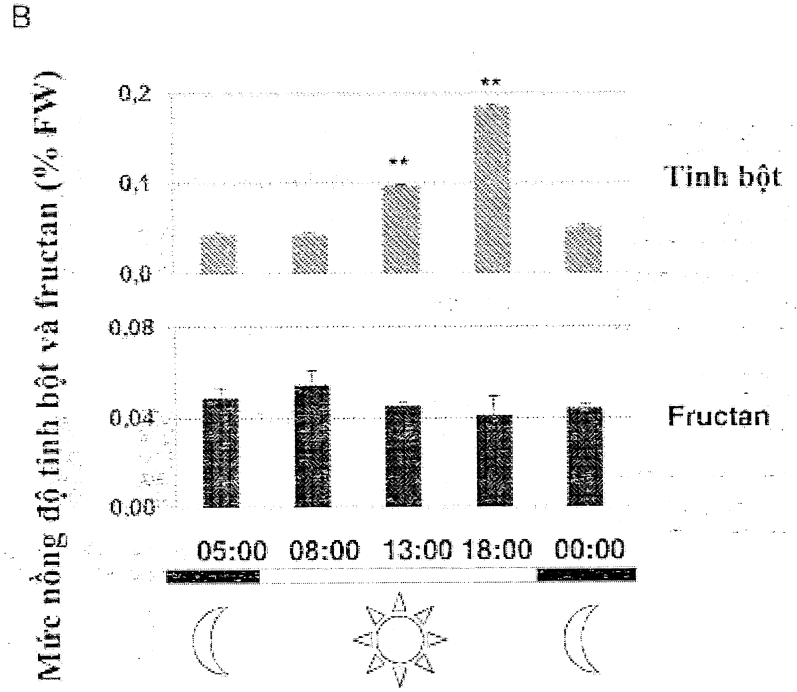

B
Mức nồng độ tinh bột và fructan (% FW)
0,2
0,1
0,0
0,08
0,04
0,00
**
**
Tinh bột
Fructan
05:00
08:00
13:00
18:00
00:00

Fig. 15

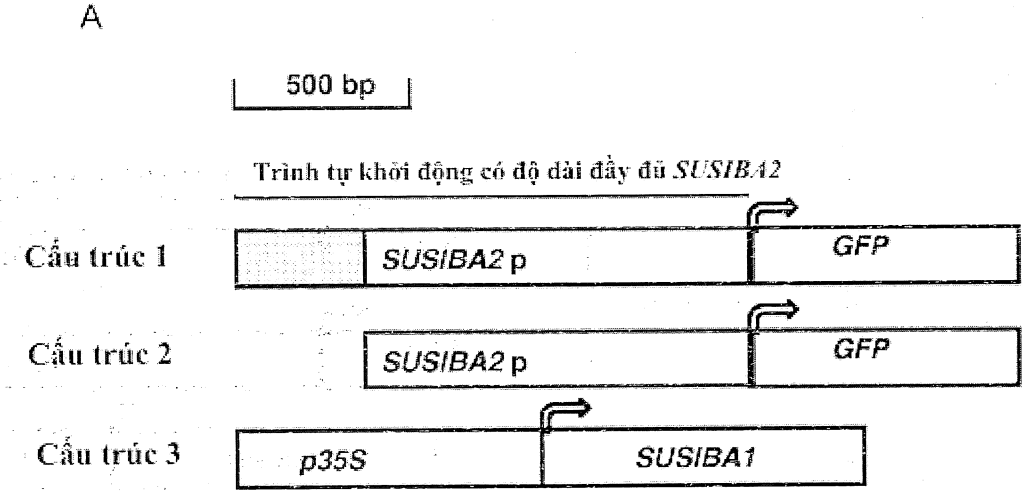

A
500 bp
Trình tự khởi động có độ dài đầy đủ SUSIBA2
Cấu trúc 1
SUSIBA2 p
GFP
Cấu trúc 2
SUSIBA2 p
GFP
Cấu trúc 3
p35S
SUSIBA1

Fig. 16

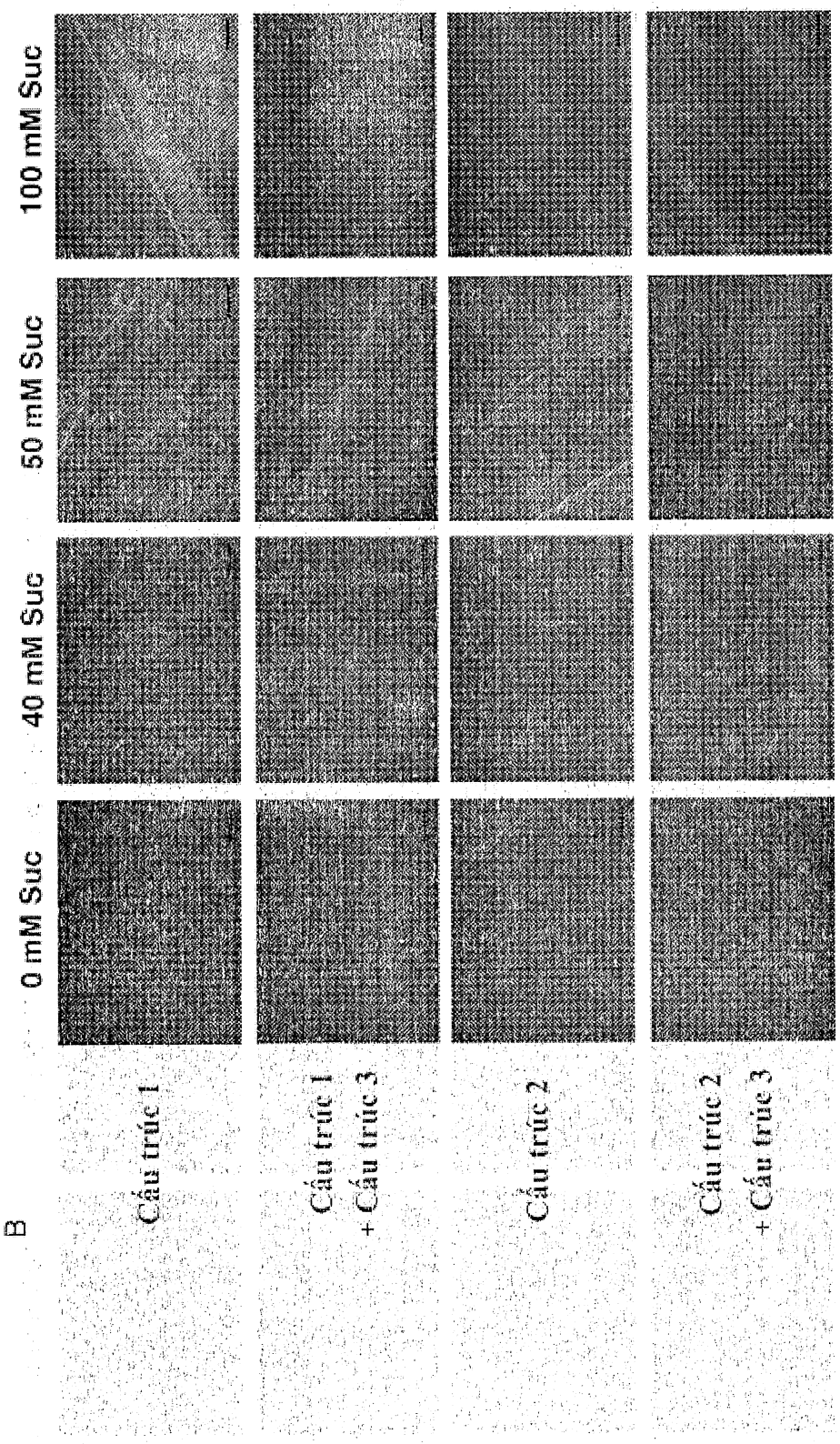

B
0 mM Suc
40 mM Suc
50 mM Suc
100 mM Suc
Cấu trúc 1
Cấu trúc 1
+ Cấu trúc 3
Cấu trúc 2
Cấu trúc 2
+ Cấu trúc 3

Fig. 16

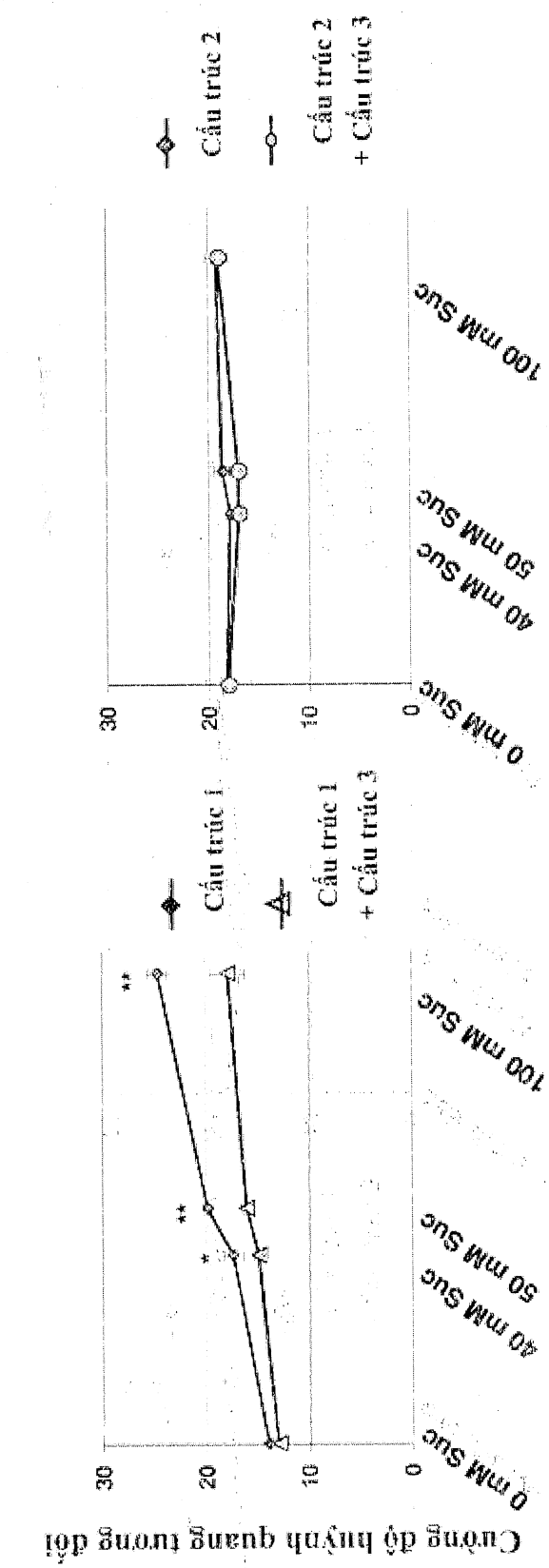

Cường độ huỳnh quang tương đối
30
20
10
0
0 mM Suc
40 mM Suc
50 mM Suc
100 mM Suc
Cấu trúc 1
Cấu trúc 1
+ Cấu trúc 3
Cấu trúc 2
Cấu trúc 2
+ Cấu trúc 3

Fig. 16

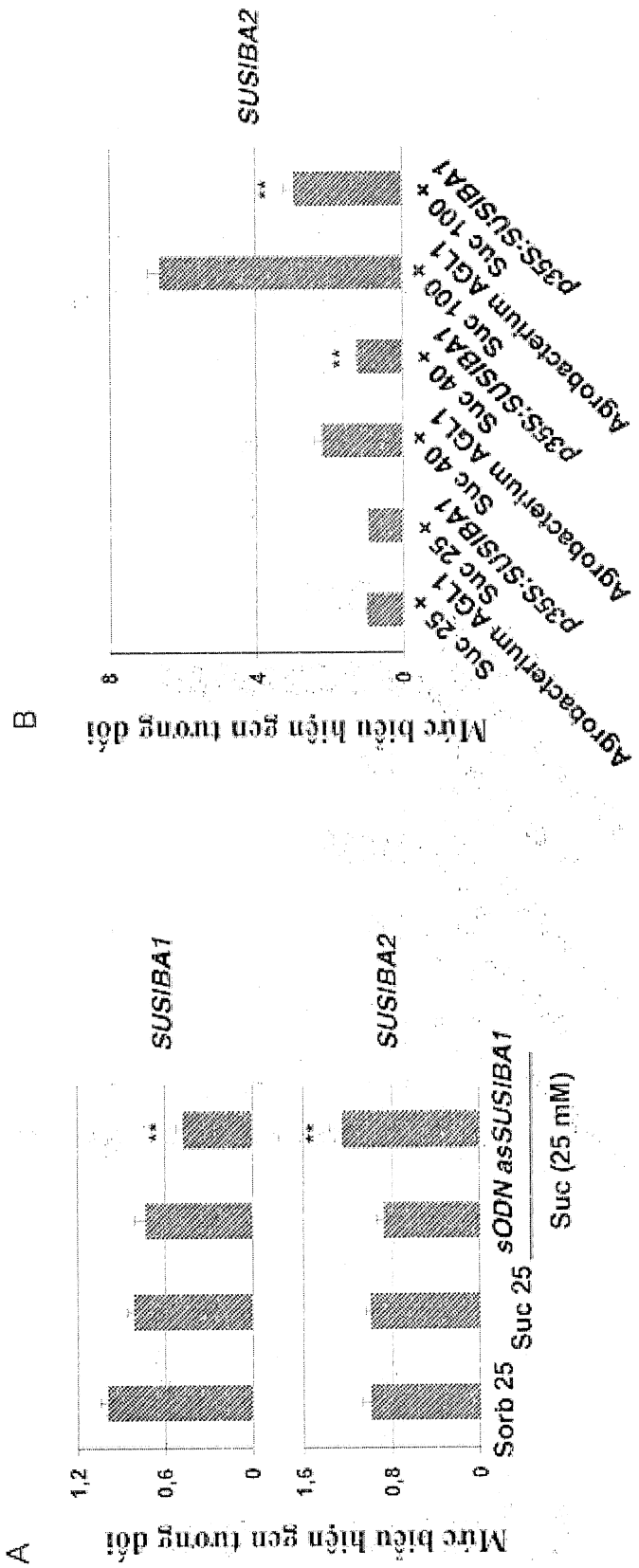

A
Mức biểu hiện gen trong đó
1,2
0,6
0
SUSIBA1
**
1,6
0,8
0
SUSIBA2
**
Sorb 25
Suc 25
sODN asSUSIBA1
Suc (25 mM)
B
Mức biểu hiện gen trong đó
8
4
0
SUSIBA2
**
Agrobacterium
Suc 25 +
p35S:SUSIBA1
Suc 25 +
Agrobacterium AGL1
Suc 40 +
p35S:SUSIBA1
Suc 40 +
Agrobacterium AGL1
Suc 100 +
p35S:SUSIBA1
Suc 100 +

Fig. 17

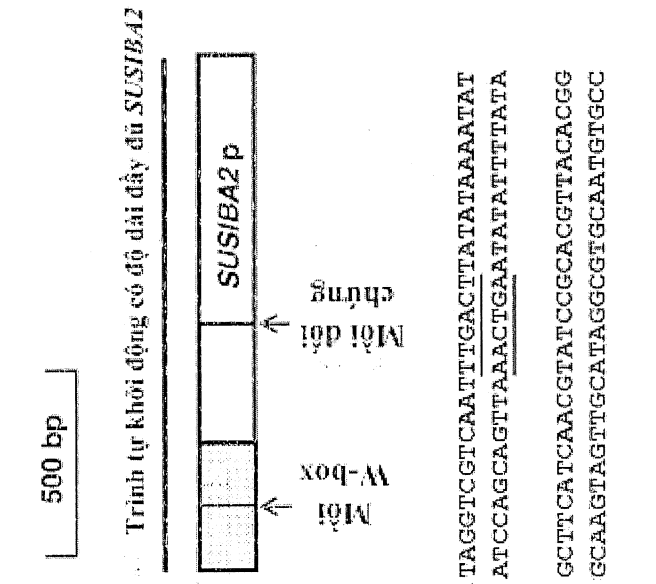

A
500 bp
Trình tự khởi động có độ dài đầy đủ SUSIBA2
Cấu trúc 1
Mồi W-box
Mồi đối chứng
SUSIBA2 p
Mồi W-box
TAGGTCGTCAATTTGACTTATATAAAATAT
ATCCAGCAGTTAAACTGAATATATTTTATA
Mồi đối chứng
GCTTCATCAACGTATCCGCACGTTACACGG
GCAAGTAGTTGCATAGGCGTGCAATGTGCC

Fig. 18

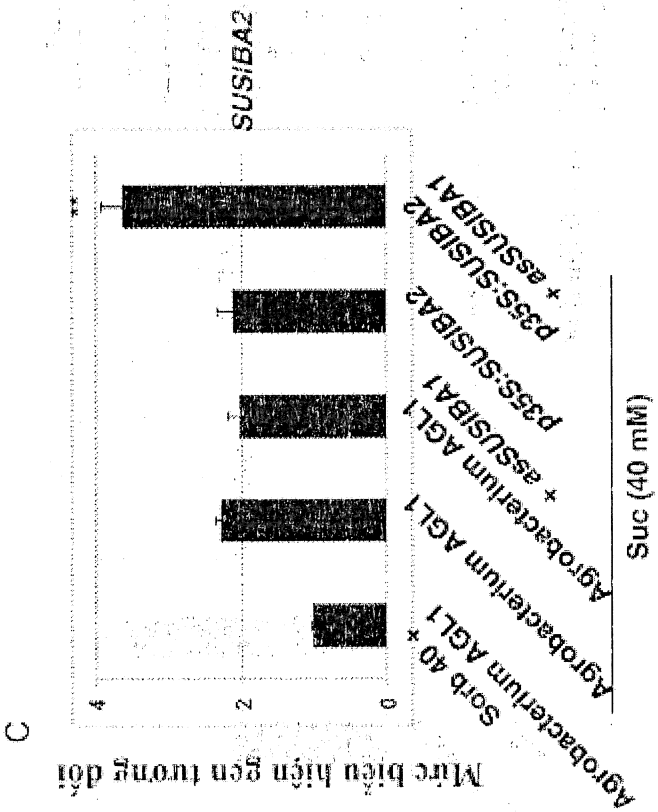
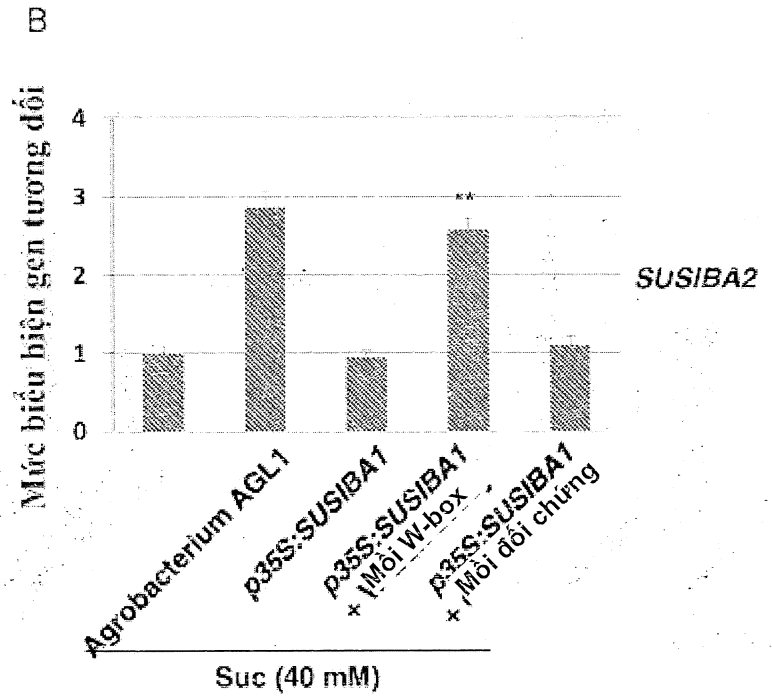

C
Mức biểu hiện gen tương đối
4
2
0
**
SUSIBA2
Agrobacterium AGL1
Agrobacterium AGL1 + Sorb 40
Agrobacterium AGL1
Agrobacterium AGL1 + assUSIBA1
p35S-SUSIBA1
p35S-SUSIBA2
p35S-SUSIBA2 + assUSIBA1
Suc (40 mM)

Fig. 17


B
Mức biểu hiện gen tương đối
4
3
2
1
0
**
SUSIBA2
Agrobacterium AGL1
p35S:SUSIBA1
p35S:SUSIBA1
+ Mồi W-box
p35S:SUSIBA1
+ Mồi đối chứng
Suc (40 mM)

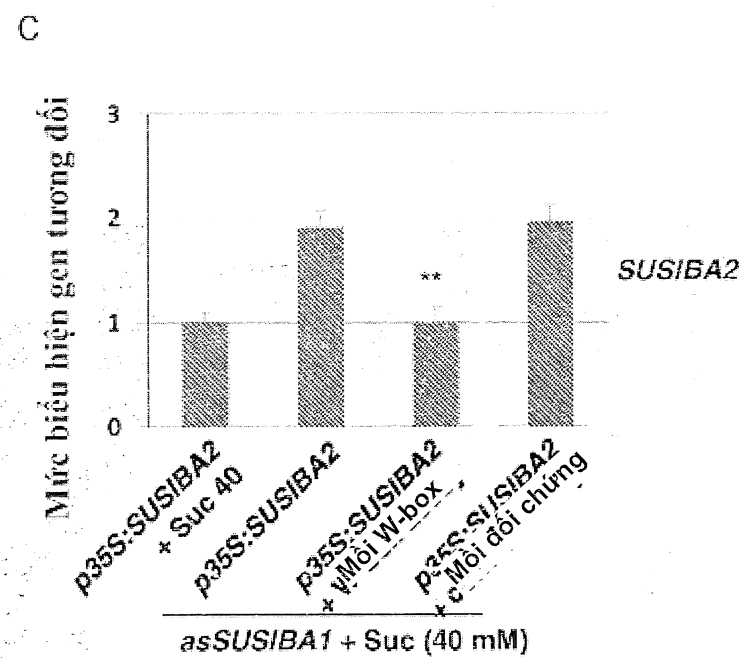

C
Mức biểu hiện gen tương đối
3
2
1
0
**
SUSIBA2
p35S:SUSIBA2
+ Suc 40
p35S:SUSIBA2
p35S:SUSIBA2
+ Mồi W-box
p35S:SUSIBA2
+ Mồi đối chứng
asSUSIBA1 + Suc (40 mM)

Fig. 18

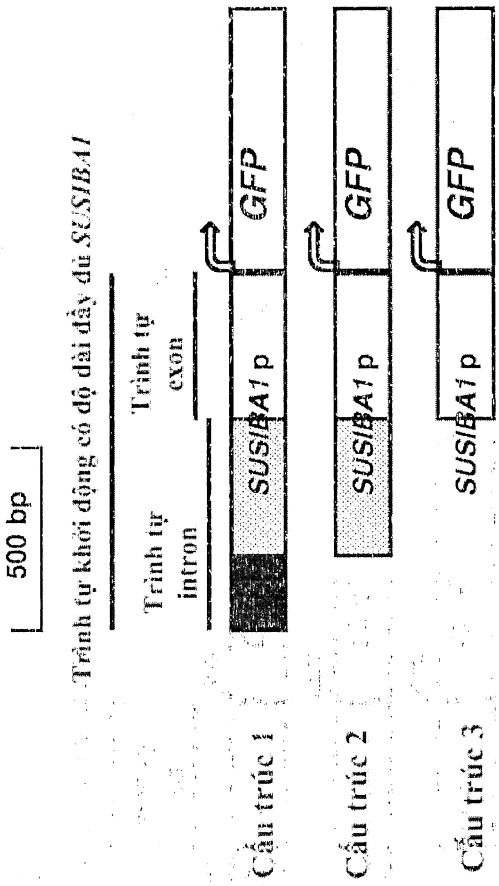

A
500 bp
Trình tự khởi động có độ dài đầy đủ SUSIBA1
Trình tự intron
Trình tự exon
SUSIBA1 p
GFP
Cấu trúc 1
Cấu trúc 2
Cấu trúc 3

Fig. 22

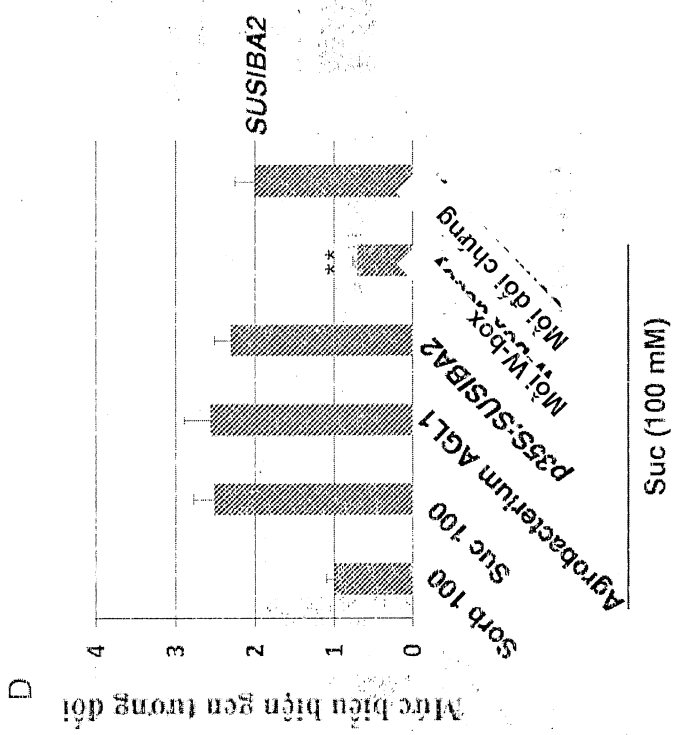

D
Mức biểu hiện gen tương đối
4
3
2
1
0
SUSIBA2
**
Sorb 100
Suc 100
Agrobacterium AGL1
p35S:SUSIBA2
Mồi W-box
Mồi đối chứng
Suc (100 mM)

Fig. 18

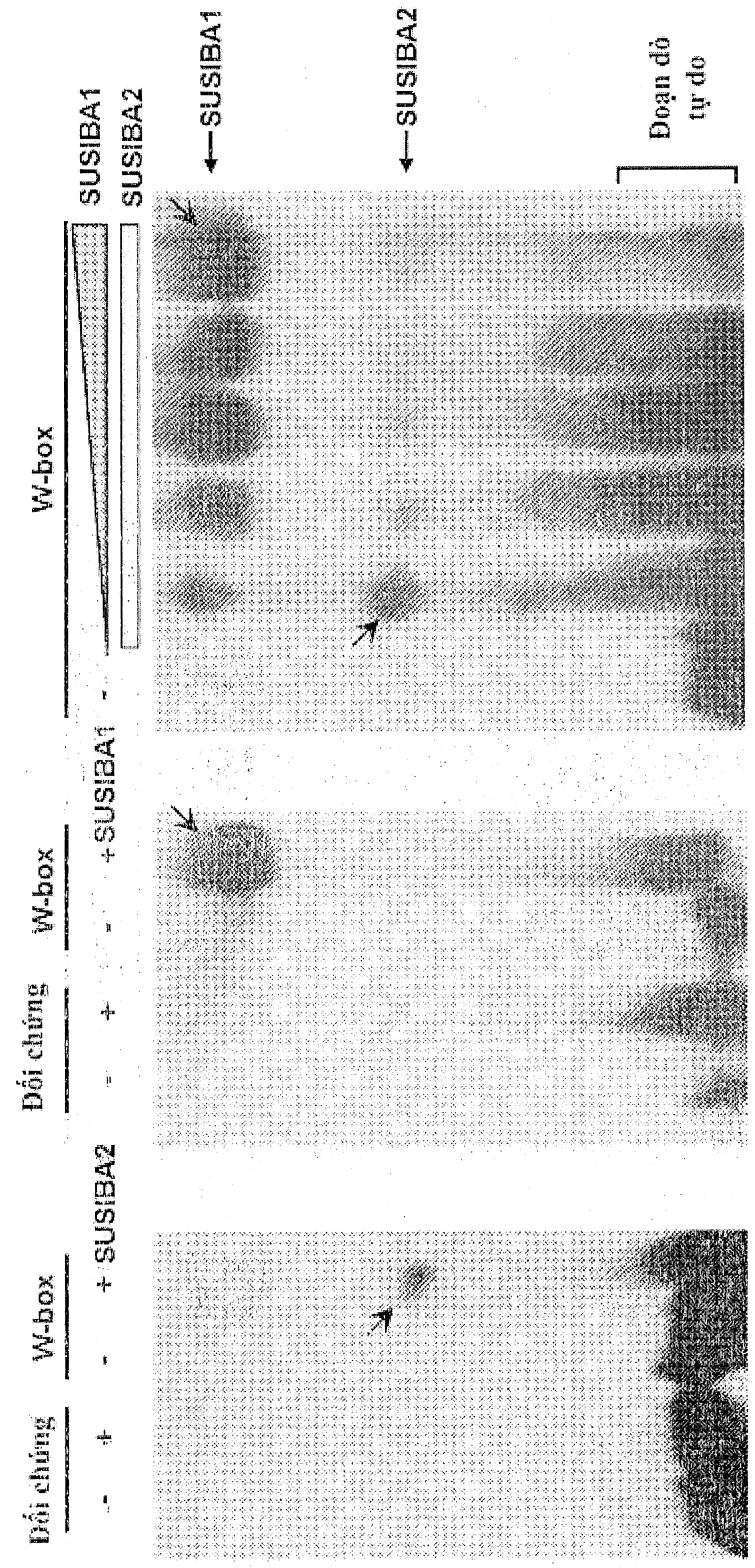

E
Đối chứng
W-box
+ SUSIBA2
Đối chứng
W-box
+ SUSIBA1
W-box
SUSIBA1
SUSIBA2
SUSIBA1
SUSIBA2
Đoạn dò
tự do

Fig. 18

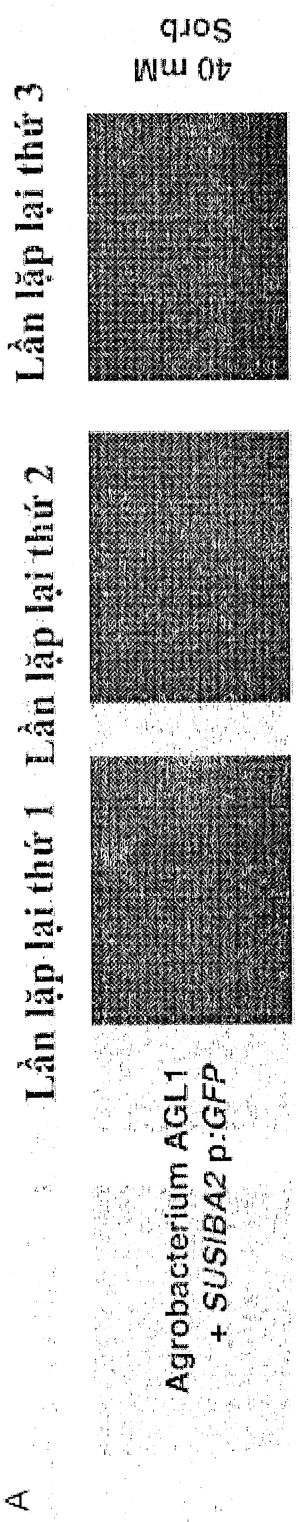

A
Agrobacterium AGL1
+ SUSIBA2 p:GFP
Lần lặp lại thứ 1
Lần lặp lại thứ 2
Lần lặp lại thứ 3
40 mM
Sorb

Fig. 19

40 mM Suc

A

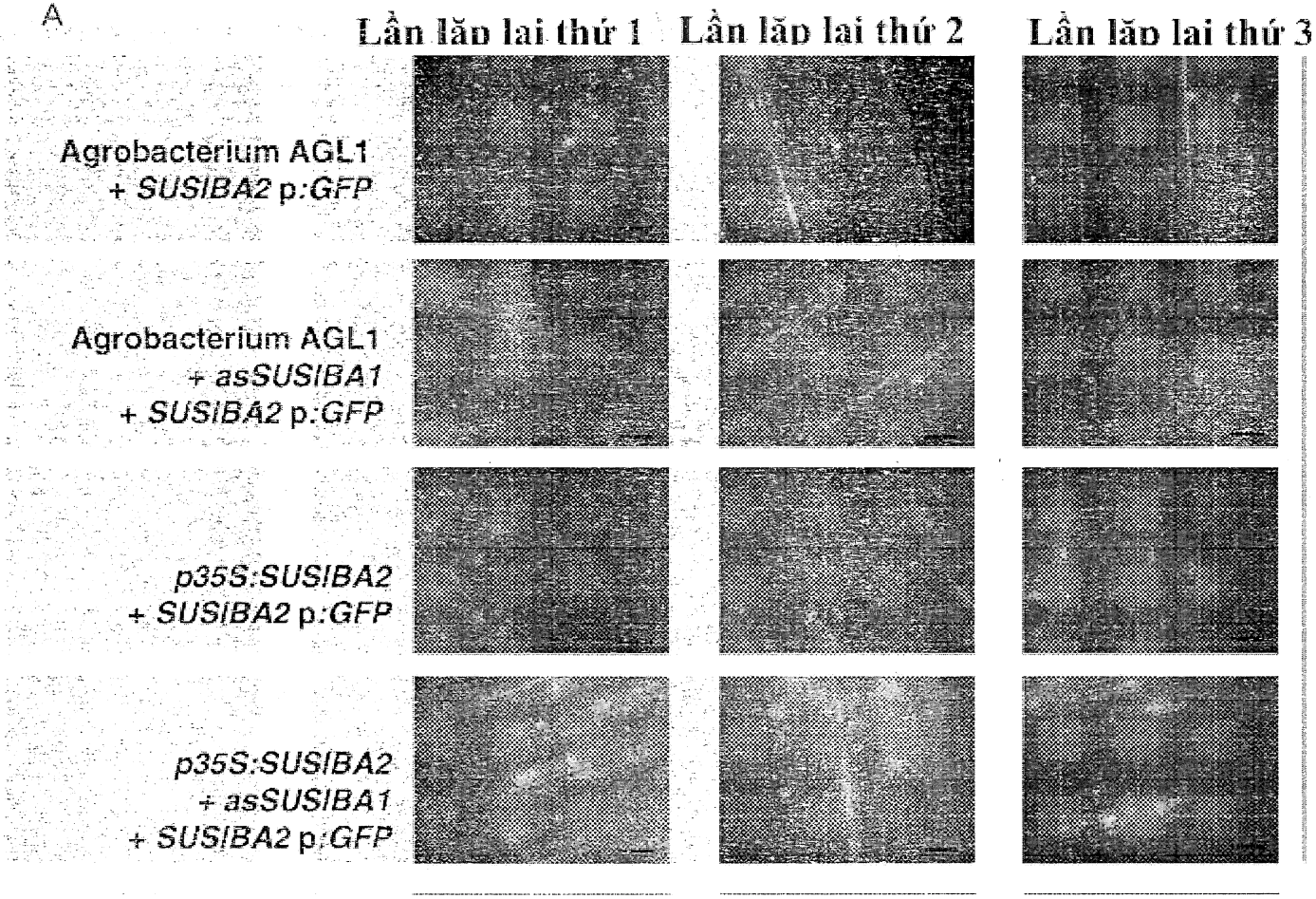


Fig. 19

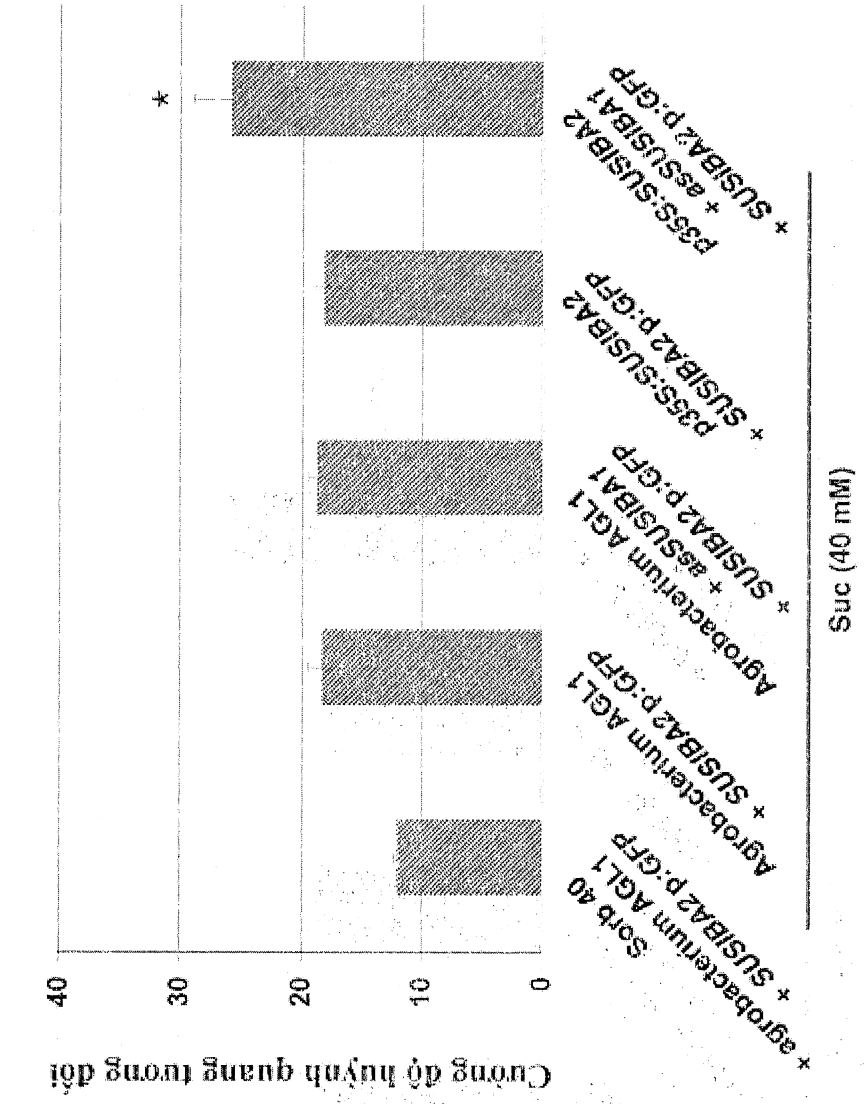

B
Cường độ huỳnh quang tương đối
40
30
20
10
0
*
Sorb 40
+ agrobacterium AGL-1
+ SUSIBA2 p:GFP
Agrobacterium AGL-1
+ SUSIBA2 p:GFP
Agrobacterium AGL-1
+ asSUSIBA1
+ SUSIBA2 p:GFP
p35S:SUSIBA2
+ SUSIBA2 p:GFP
p35S:SUSIBA2
+ asSUSIBA1
+ SUSIBA2 p:GFP
Suc (40 mM)

Fig. 19

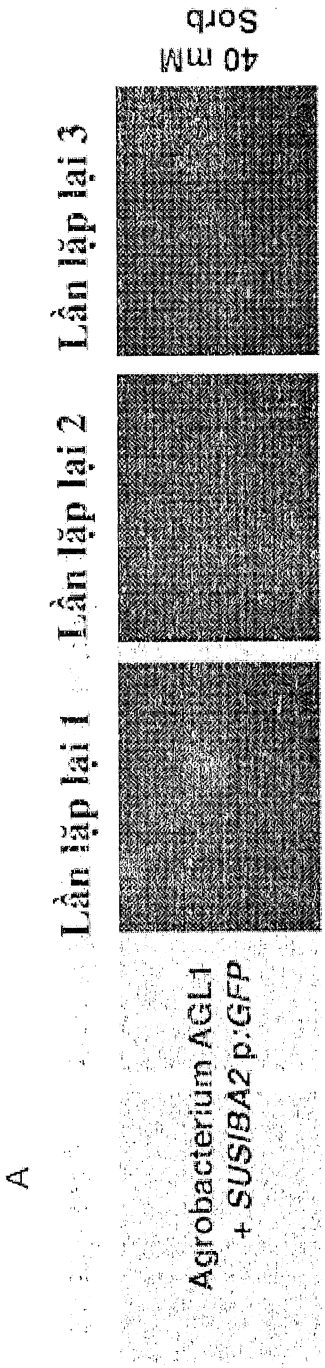

A
Agrobacterium AGL1
+ SUSIBA2 p:GFP
Lần lặp lại 1
Lần lặp lại 2
Lần lặp lại 3
40 mM
Sorb

Fig. 20

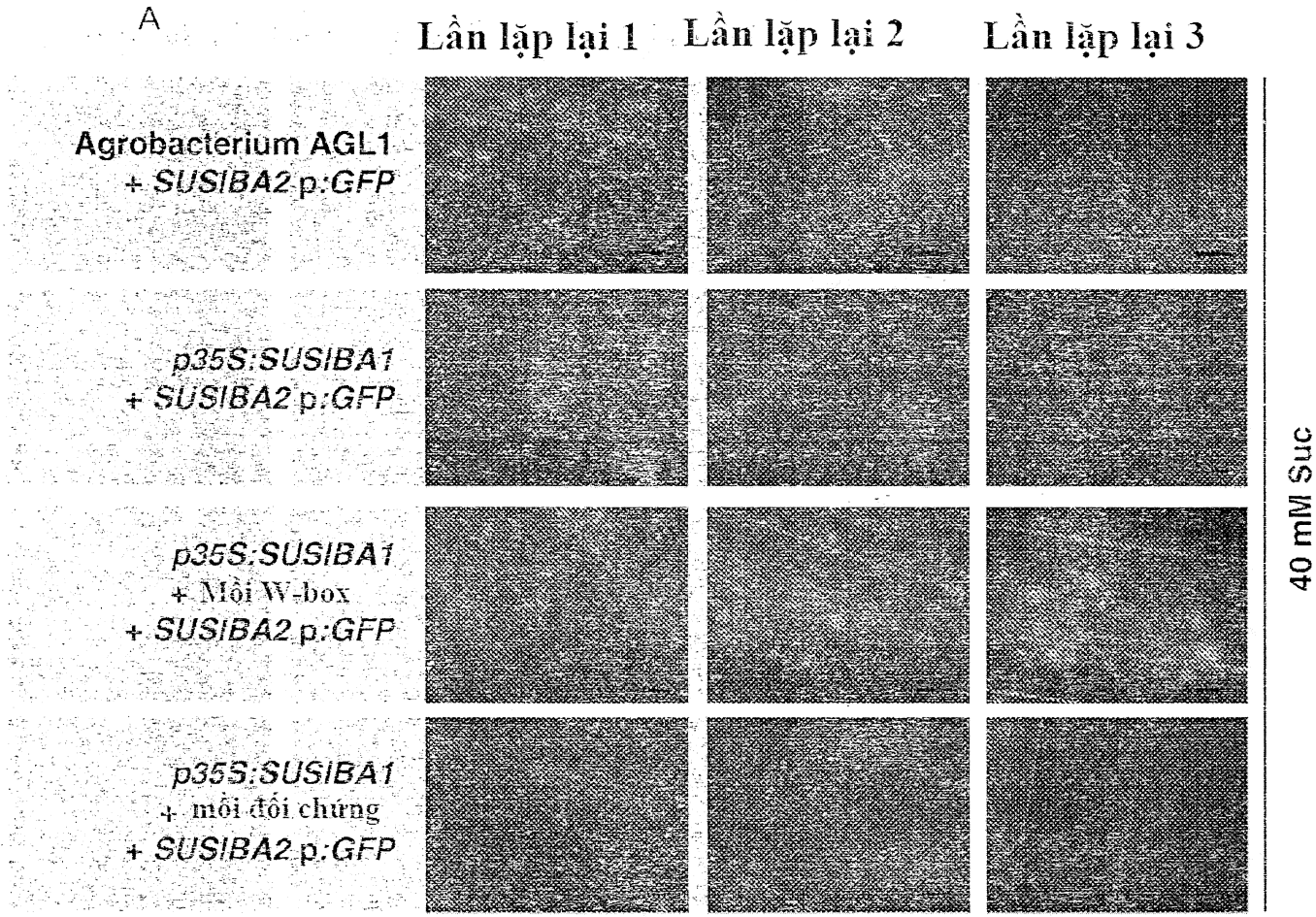

A
Lần lặp lại 1
Lần lặp lại 2
Lần lặp lại 3
Agrobacterium AGL1
+ SUSIBA2 p:GFP
p35S:SUSIBA1
+ SUSIBA2 p:GFP
p35S:SUSIBA1
+ Mồi W-box
+ SUSIBA2 p:GFP
p35S:SUSIBA1
+ mồi đối chứng
+ SUSIBA2 p:GFP
40 mM Suc

Fig. 20

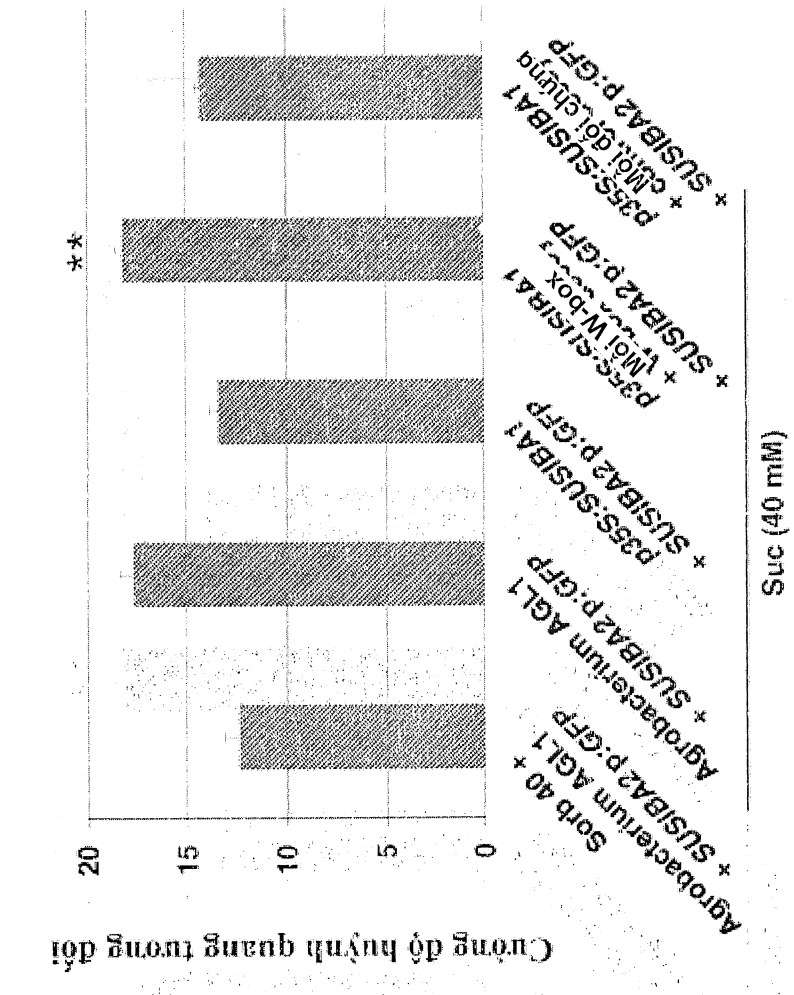

B
Cường độ huỳnh quang trong đôi
20
15
10
5
0
**
Agrobacterium AGL-1 + SUSIBA2 p:GFP
Sorb 40 + Agrobacterium AGL-1 + SUSIBA2 p:GFP
p35S:SUSIBA1 + SUSIBA2 p:GFP
p35S:SUSIBA1 + Mol W-box + SUSIBA2 p:GFP
p35S:SUSIBA1 + Mol dôi chuỗi + SUSIBA2 p:GFP
Suc (40 mM)

Fig. 20

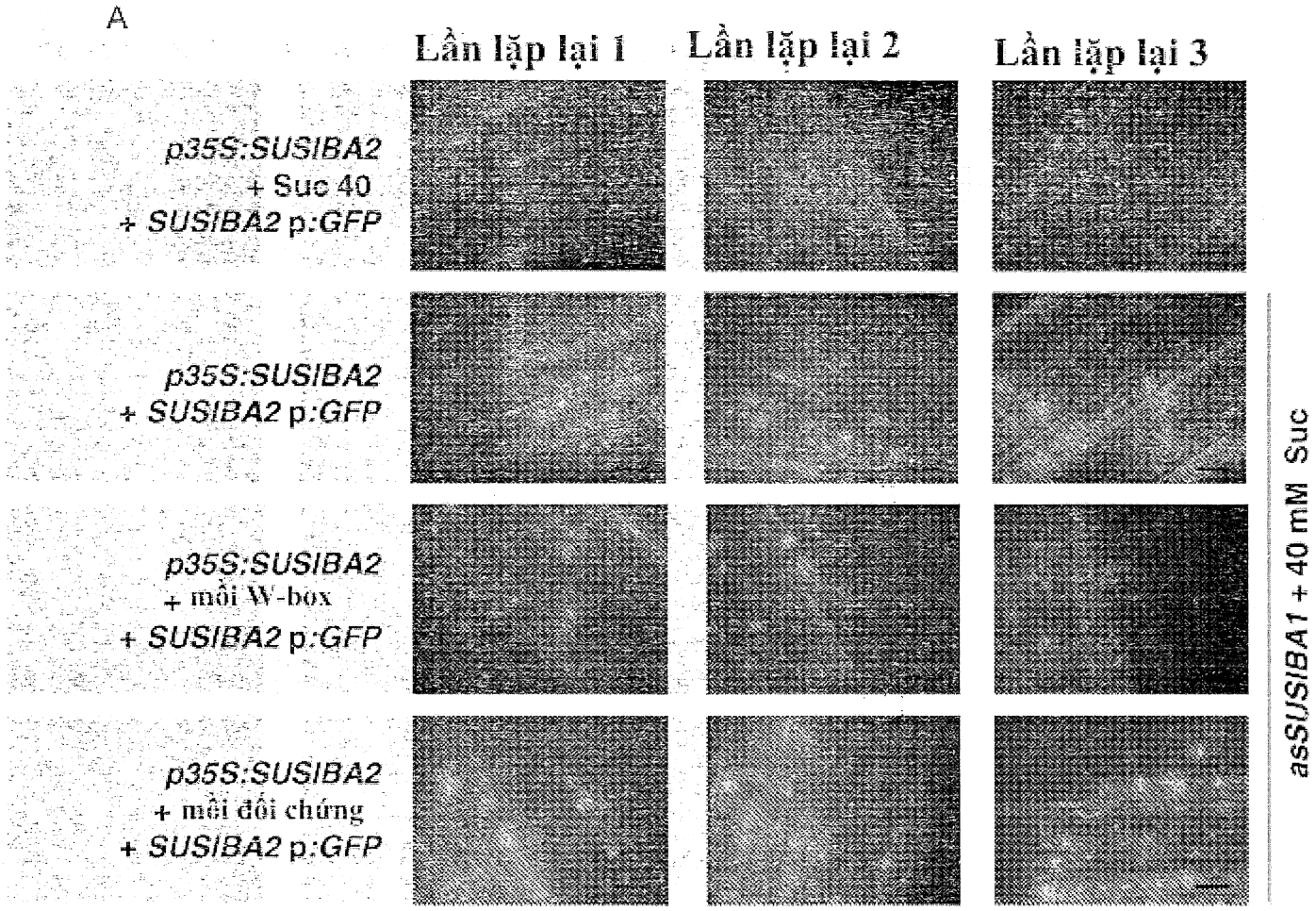

A
Lần lặp lại 1
Lần lặp lại 2
Lần lặp lại 3
p35S:SUSIBA2
+ Suc 40
+ SUSIBA2 p:GFP
p35S:SUSIBA2
+ SUSIBA2 p:GFP
p35S:SUSIBA2
+ mồi W-box
+ SUSIBA2 p:GFP
p35S:SUSIBA2
+ mồi đối chứng
+ SUSIBA2 p:GFP
asSUSIBA1 + 40 mM Suc

Fig. 21

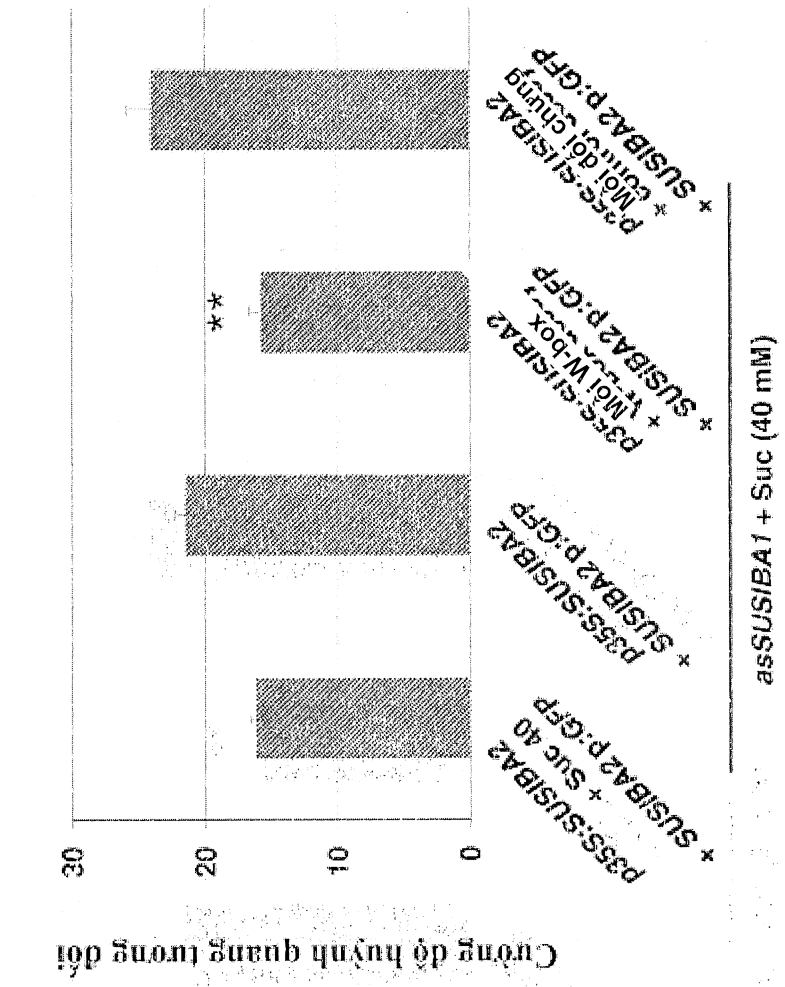

B
Cường độ huỳnh quang trong đó
30
20
10
0
p35S:SUSIBA2 + Suc 40
SUSIBA2 p:GFP
p35S:SUSIBA2
SUSIBA2 p:GFP
p35S:SUSIBA2
SUSIBA2 p:GFP
p35S:SUSIBA2
SUSIBA2 p:GFP
**
asSUSIBA1 + Suc (40 mM)

Fig. 21

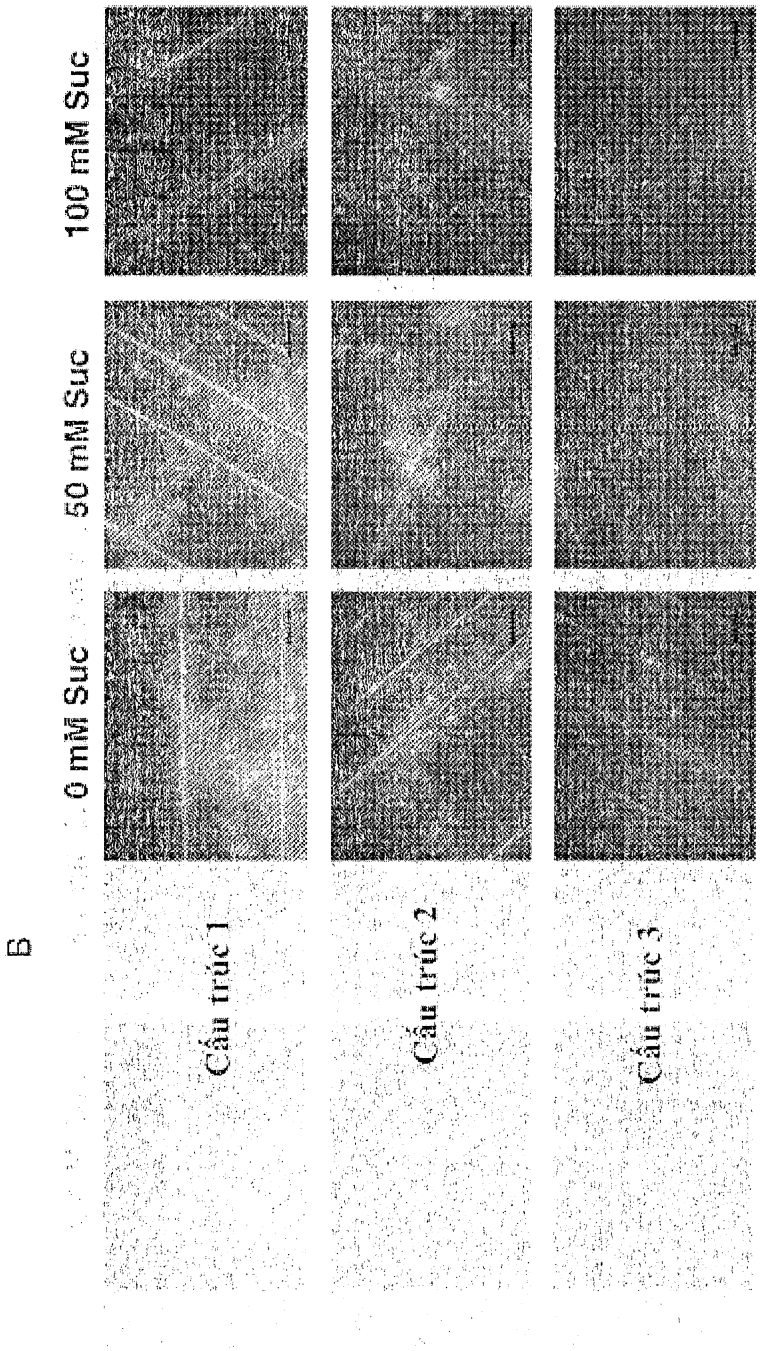


Fig. 22

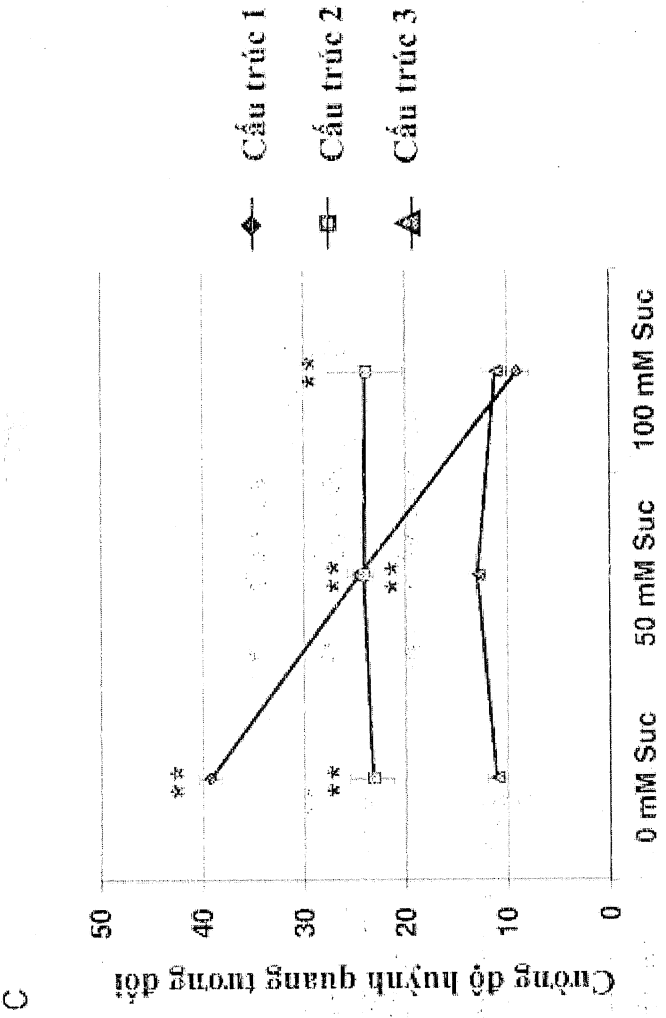

Cường độ huỳnh quang tương đối
50
40
30
20
10
0
**
**
**
**
0 mM Suc
50 mM Suc
100 mM Suc
Cấu trúc 1
Cấu trúc 2
Cấu trúc 3

Fig. 22

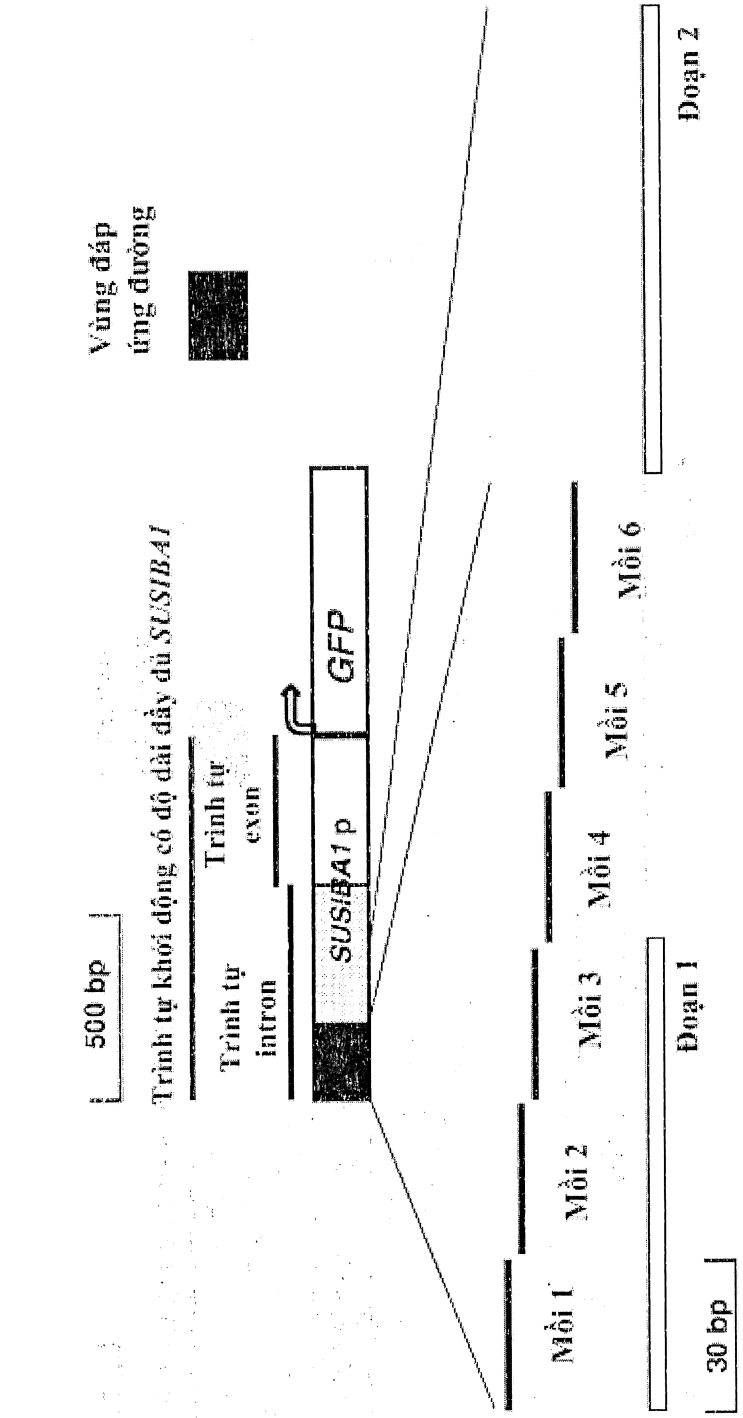

A
500 bp
Trình tự khởi động có độ dài đầy đủ SUSIBA1
Trình tự intron
Trình tự exon
SUSIBA1 p
GFP
Vùng đáp ứng đường
Mồi 1
Mồi 2
Mồi 3
Mồi 4
Mồi 5
Mồi 6
Đoạn 1
Đoạn 2
30 bp

Fig. 23

B

Mồi 1 GTACACAACCTTTAATTTTCTTTTCTG
CATGTGTTGGAAATTAAAAGAAAAGAC

Mồi 2 TGTCCTATAGAGATTAATGCACTTTATCTT
ACAGGATATCTCTAATTACGTGAAATAGAA

Mồi 3 GCAGAACATTAAGATGAAATTTAAGCATTT
CGTCTTGTAATTCTACTTTAAATTCGTAAA

Mồi 4 TGTTTCTAGATGACCCTGCAACTTTTTTTG
ACAAAGATCTACTGGGACGTTGAAAAAAAC

Mồi 5 GCCTTTATTGTGCATATTATATAATTTGGC
CGGAAATAACACGTATAATATATTAAACCG

Mồi 6 CAGGTTCTTGAATTGTTGCATAATTCATAA
GTCCAAGAACTTAACAACGTATTAAGTATT

C

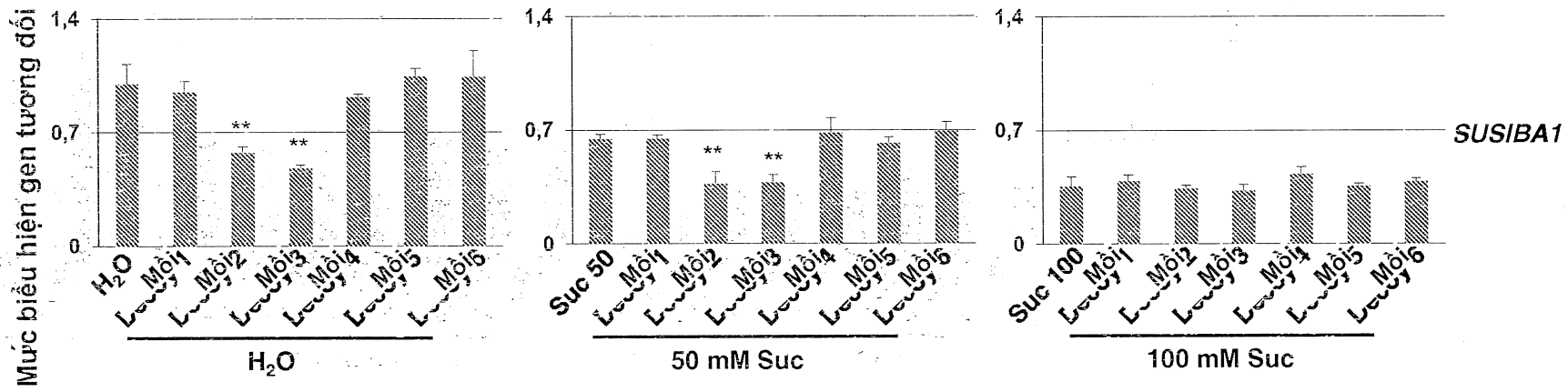


Fig. 23

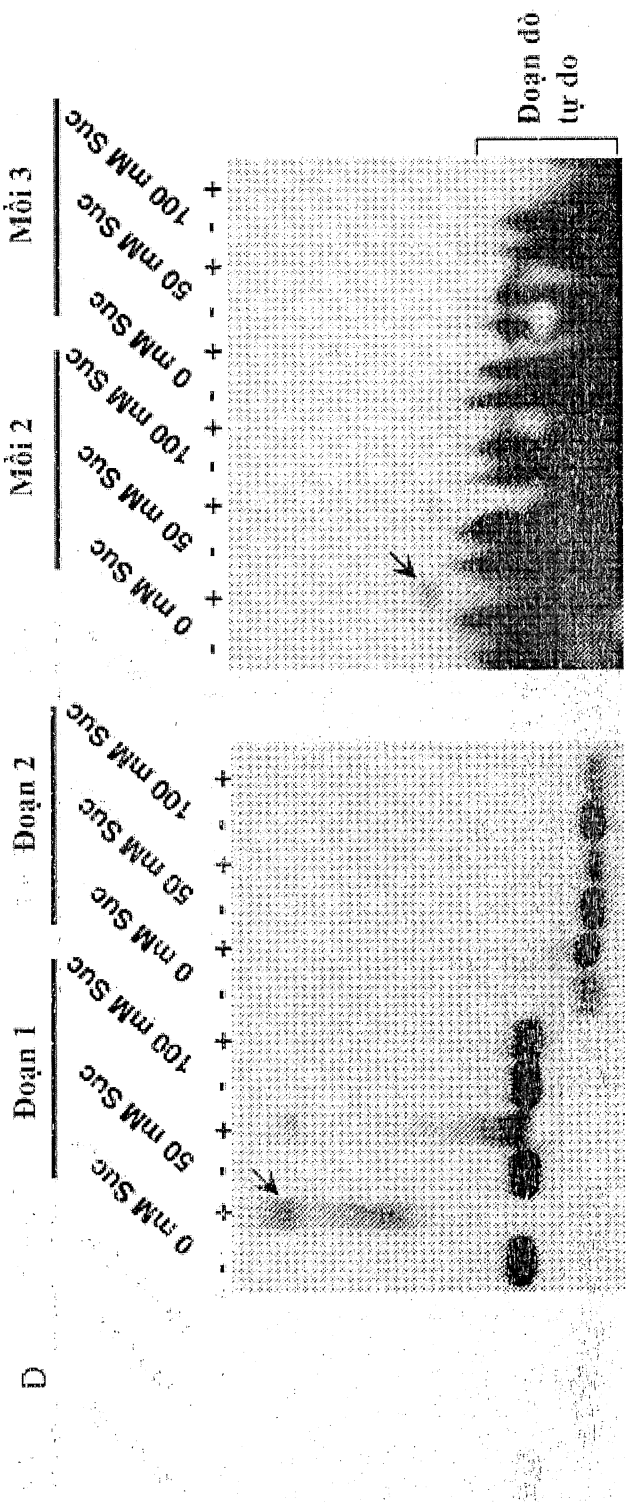

D
Đoạn 1
Đoạn 2
Mồi 2
Mồi 3
0 mM Suc
50 mM Suc
100 mM Suc
0 mM Suc
50 mM Suc
100 mM Suc
0 mM Suc
50 mM Suc
100 mM Suc
Đoạn đò tự do

Fig. 23

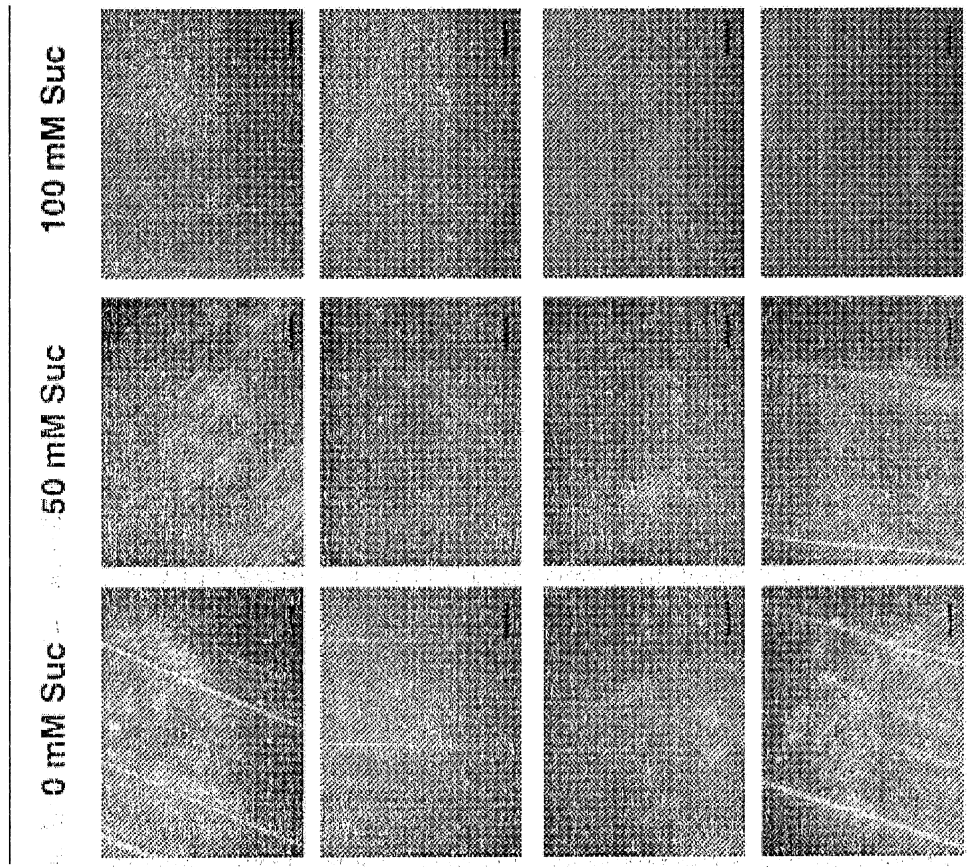

A
Lần lặp lại 1
0 mM Suc
50 mM Suc
100 mM Suc
SUSIBA1 p:GFP
SUSIBA1 p:GFP
+ Mồi 2
SUSIBA1 p:GFP
+ Mồi 3
SUSIBA1 p:GFP
+ Mồi 6

Fig. 24

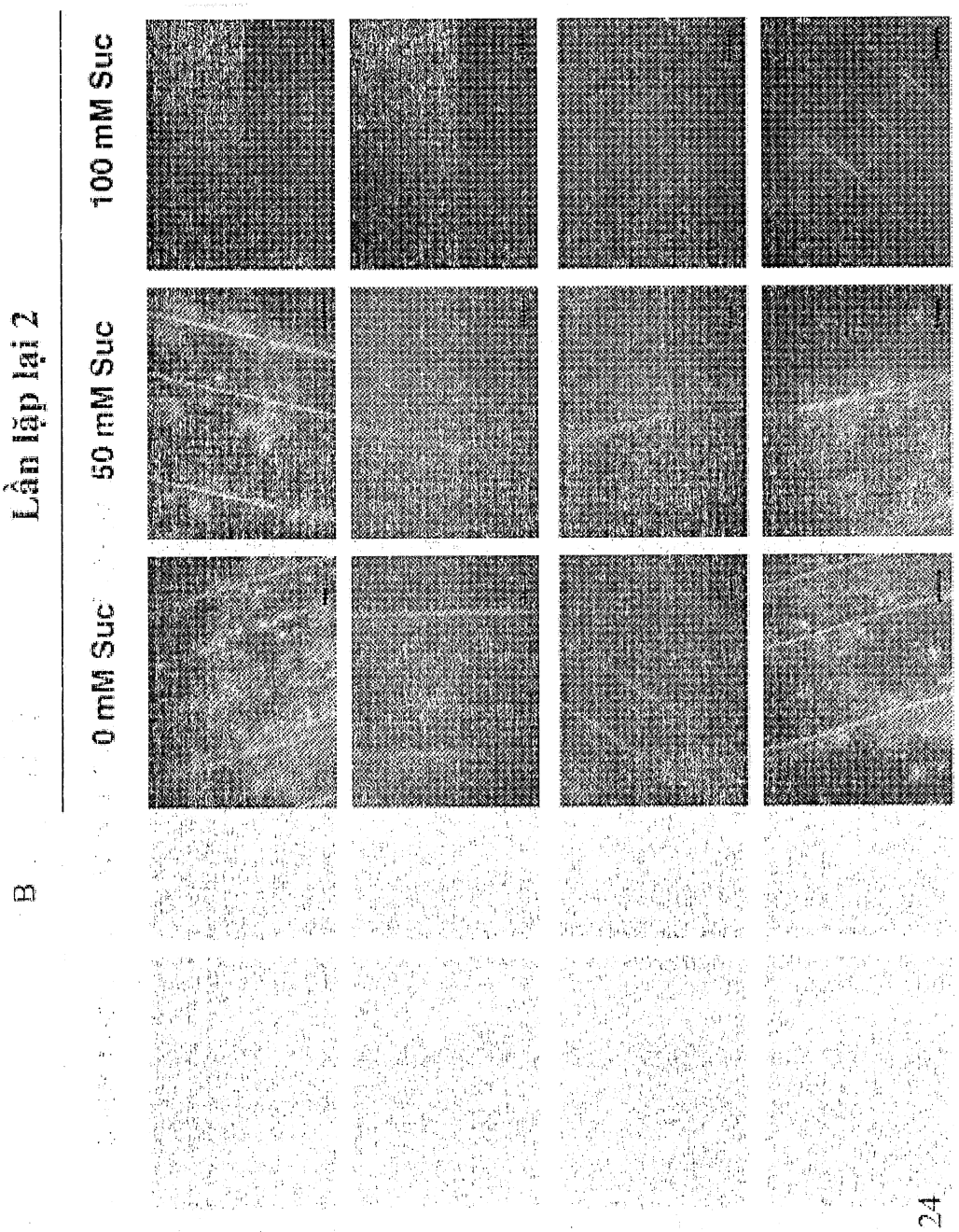


Fig. 24

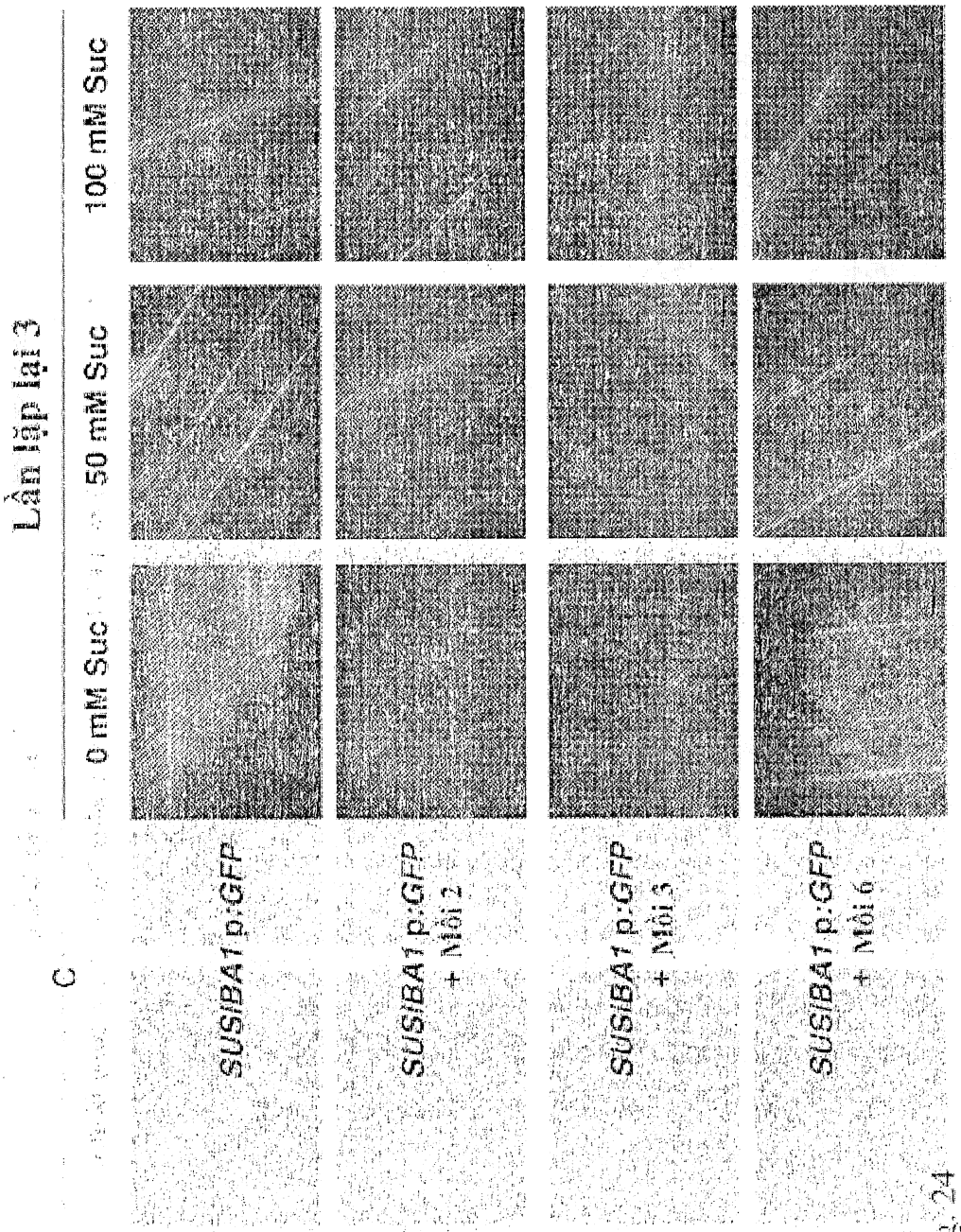

C
Lần lặp lại 3
0 mM Suc
50 mM Suc
100 mM Suc
SUSIBA1 p:GFP
SUSIBA1 p:GFP
+ Mồi 2
SUSIBA1 p:GFP
+ Mồi 3
SUSIBA1 p:GFP
+ Mồi 6

Fig. 24

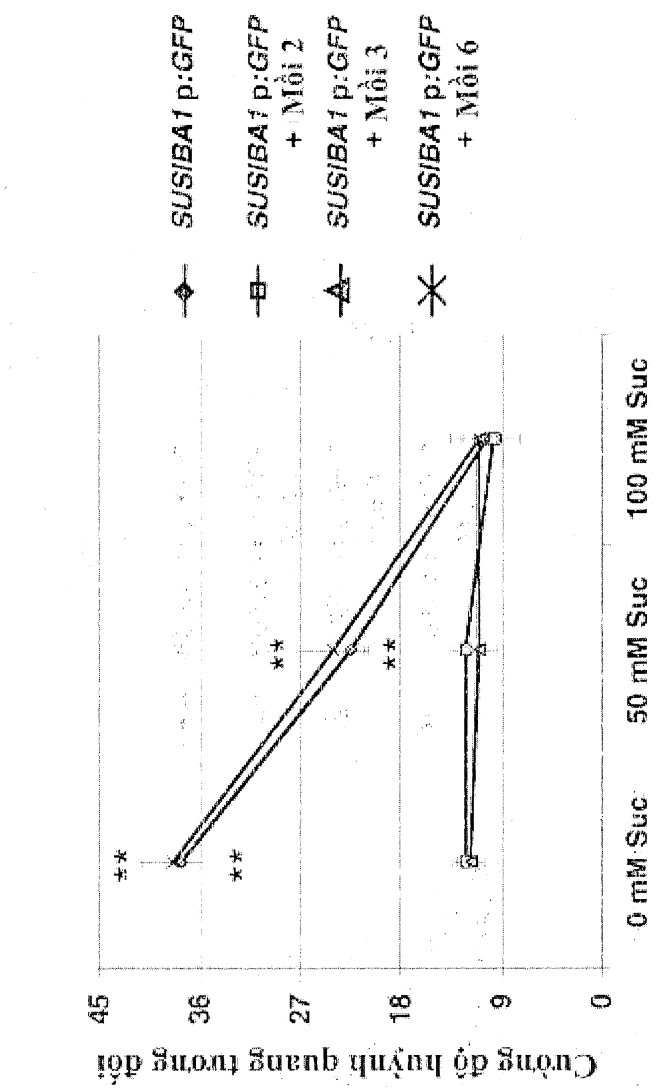

D
Cường độ huỳnh quang trung đối
45
36
27
18
9
0
**
**
**
0 mM Suc
50 mM Suc
100 mM Suc
SUSIBA1 p:GFP
SUSIBA1 p:GFP + Mồi 2
SUSIBA1 p:GFP + Mồi 3
SUSIBA1 p:GFP + Mồi 6

Fig. 24

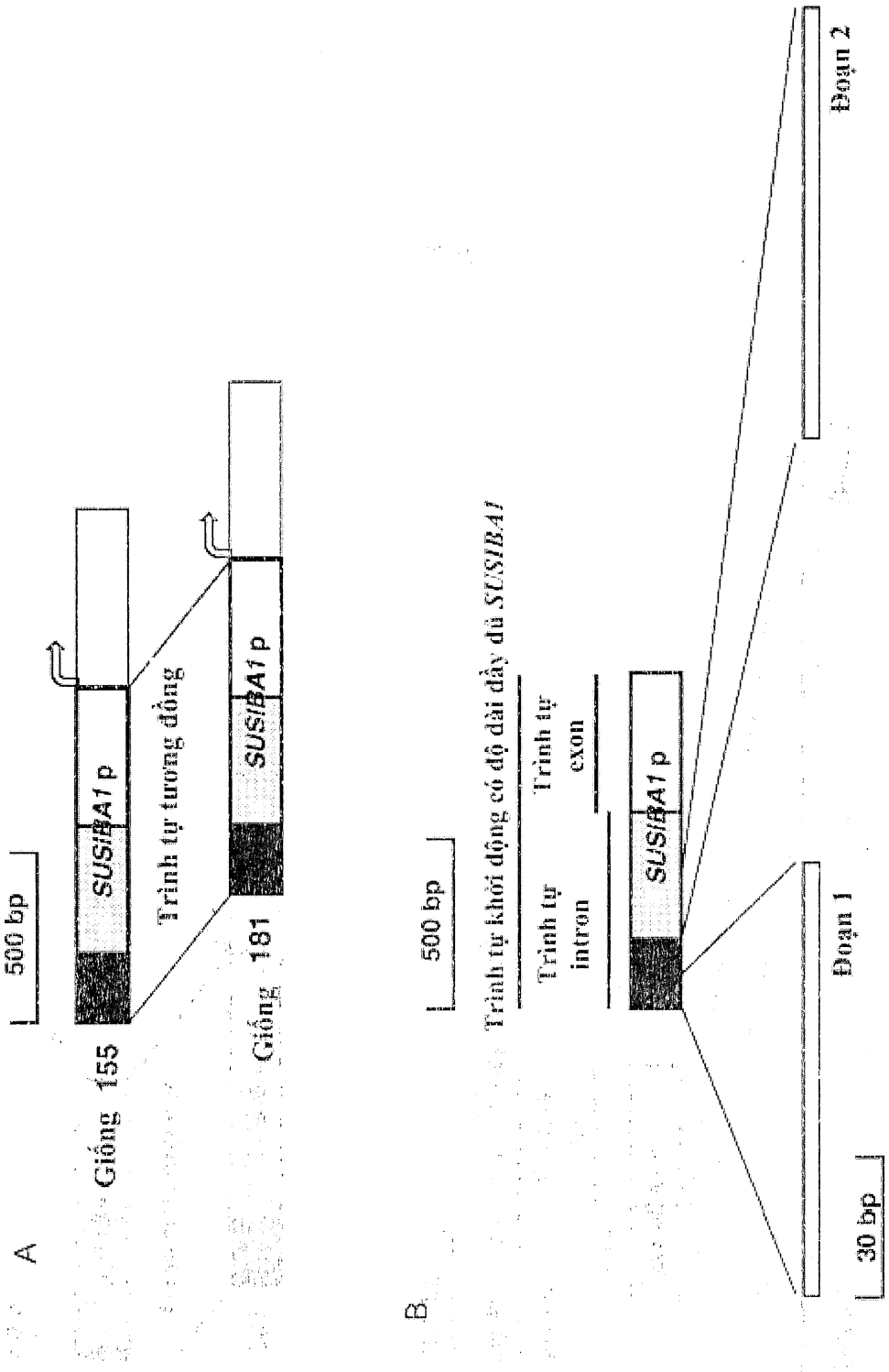

A
500 bp
Giống 155
SUSIBA1 p
Trình tự tương đồng
Giống 181
SUSIBA1 p
B
500 bp
Trình tự khởi động có độ dài đầy đủ SUSIBA1
Trình tự intron
Trình tự exon
SUSIBA1 p
Đoạn 1
Đoạn 2
30 bp

Fig. 25

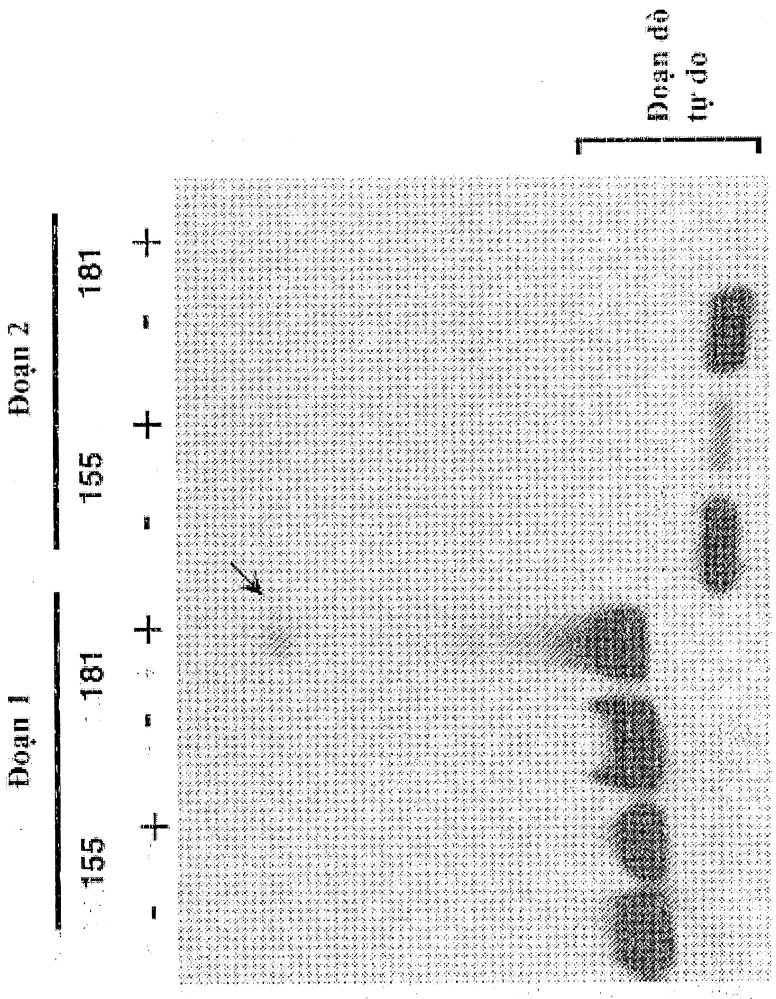


Fig. 25

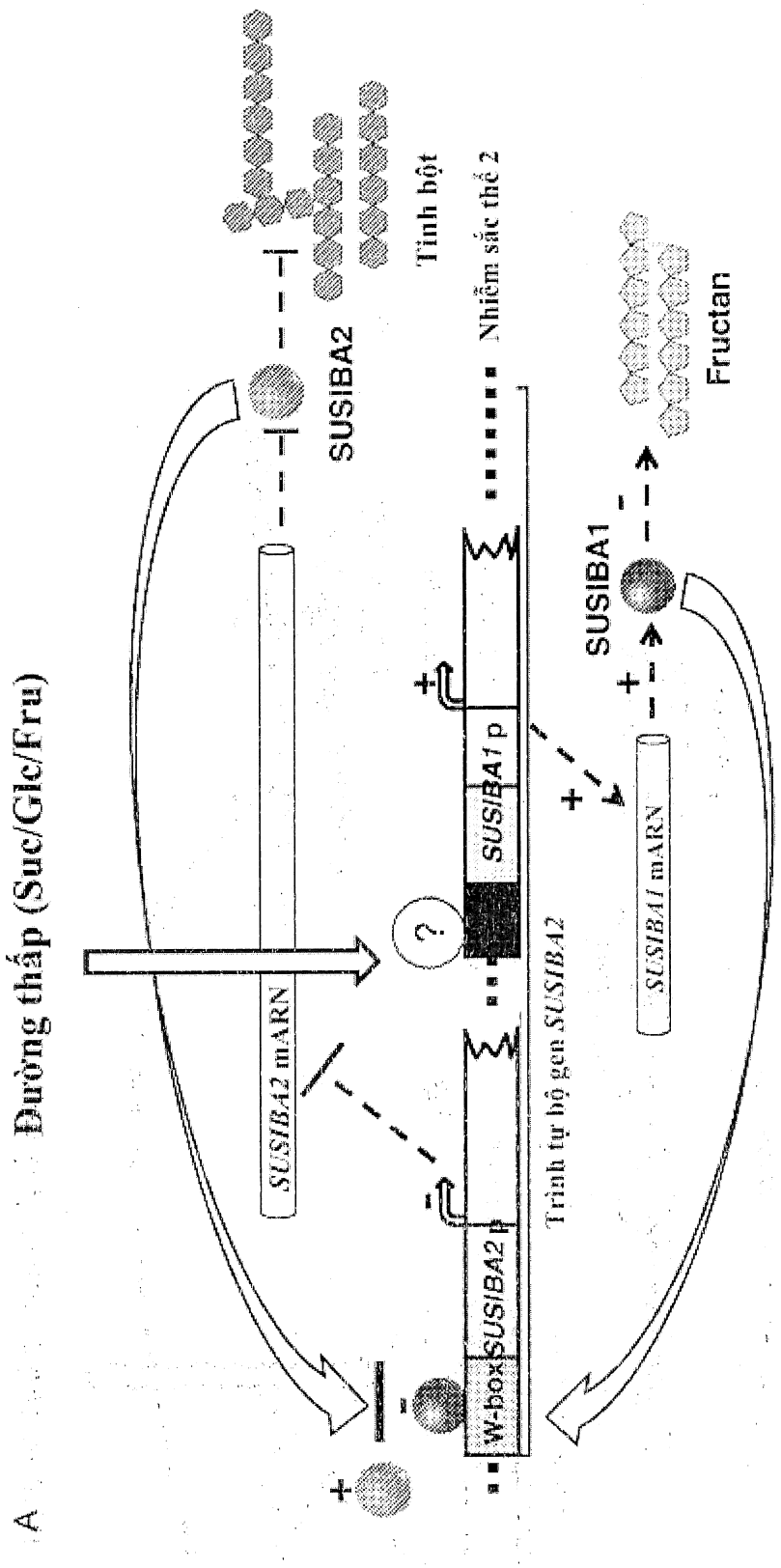

A
Đường thấp (Suc/Glc/Fru)
SUSIBA2 mARN
SUSIBA2
Tinh bột
Nhiễm sắc thể 2
W-box
SUSIBA2 p
SUSIBA1 p
Trình tự bộ gen SUSIBA2
SUSIBA1
SUSIBA1 mARN
Fructan
?

Fig. 26

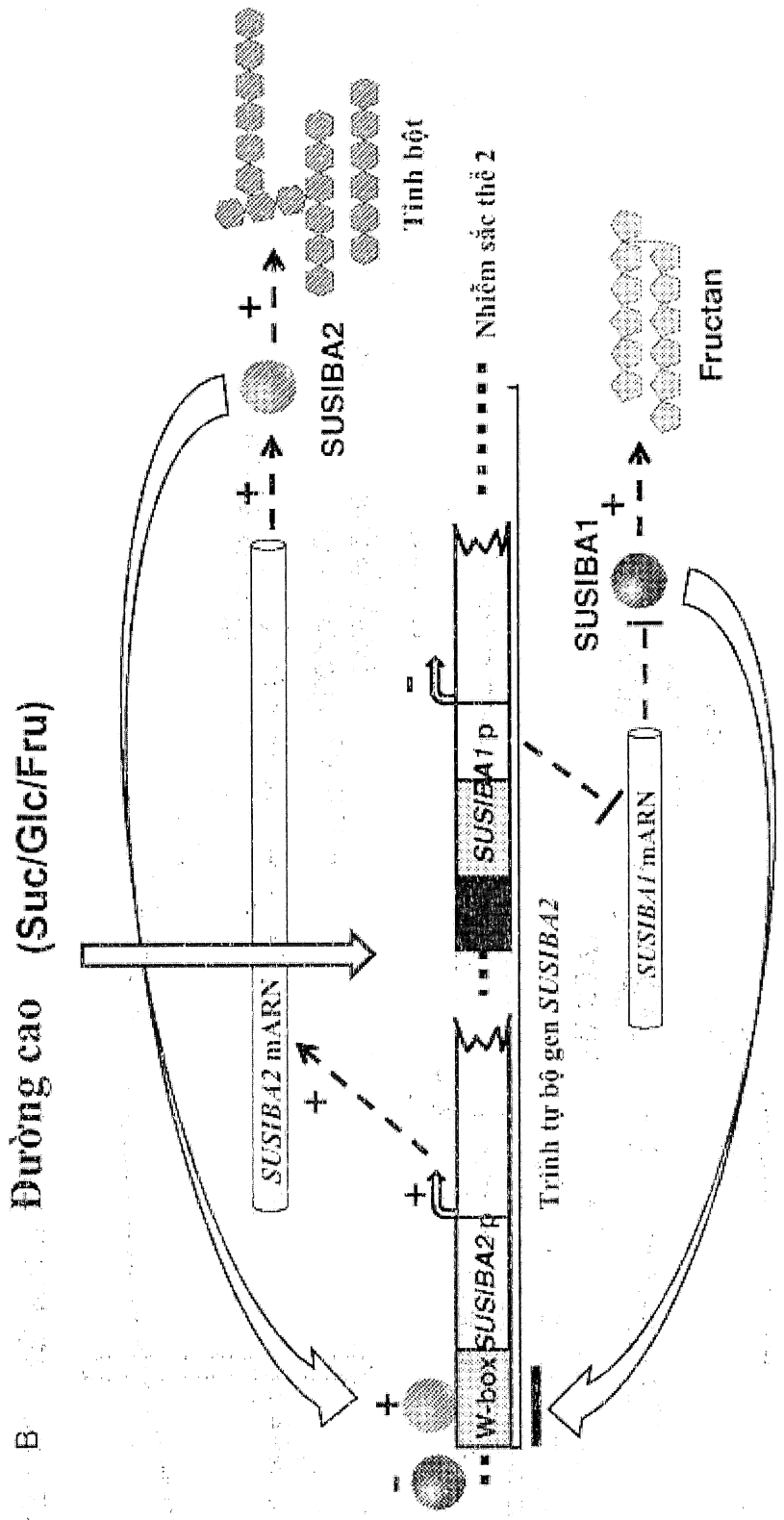

B
Đường cao (Suc/Glc/Fru)
SUSIBA2 mARN
SUSIBA2
Tinh bột
W-box
SUSIBA2 p
SUSIBA1 p
Nhiễm sắc thể 2
Trình tự bộ gen SUSIBA2
SUSIBA1 mARN
SUSIBA1
Fructan

Fig. 26

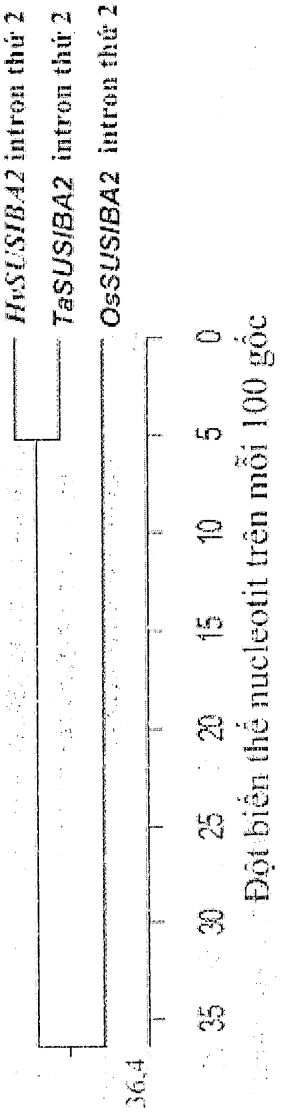

HvSUSIBA2 intron thứ 2
TaSUSIBA2 intron thứ 2
OsSUSIBA2 intron thứ 2
36,4
35
30
25
20
15
10
5
0
Đột biến thế nucleotit trên mỗi 100 gốc

Fig. 27

```
ĐA SỐ          XXTXXAGGTTGAACCXTCXCCXACAACTGGTAXTCTGXGCATGGCTGCXATTXTGXACAAGAGXGCXXATCCAGACATXC
                         10        20        30        40        50        60        70        80
EXON ĐẠI MẠCH 2 CTTCCAGGTTGAACCTTCAGCAACAACTGGTAGTCTGGGGATGGCTGCGATTCTGCACAAGAGCGCTCATCCAGACATGC  80
EXON LÚA 2     TGTTTAGGTTGAACCCTCTCCGACAACTGGTACTCTGAGCATGGCTGCAATTATGAACAAGAGTGCAAATCCAGACATAC  80

ĐA SỐ          TXCCTTCGCCXXGGGATAAAXCXXXTXGTAXXXCCCATGAAGATXGXGGXTCTXGXGATTTTGAATTCAAGCCTCATCTG
                         90       100       110       120       130       140       150       160
EXON ĐẠI MẠCH 2 TGCCTTCGCCACGGGATAAATCTGTTCGTAATGCCCATGAAGATAGGGGTTCTAGGGATTTTGAATTCAAGCCTCATCTG 160
EXON LÚA 2     TTCCTTCGCCTAGGGATAAAACATCTGGTAGCACCCATGAAGATGGTGGCTCTCGAGATTTTGAATTCAAGCCTCATCTG 160

ĐA SỐ          AATTCXTCXTCTCAATCXXXG
                        170       180
               AATTCGTCTTCTCAATCACTG                                                              181
EXON ĐẠI MẠCH 2 AATTCATCCTCTCAATCGACG                                                             181
EXON LÚA 2
```

Fig. 28

```
ĐA SỐ        GCTXCTGCTATXAXTGATCXXAAAAAXCATGAXXXTTCTATGXAAAATXAXAGXXTGAATXCXXXCXXXTCATCTXXCXA
                      10        20        30        40        50        60        70        80
EXON ĐẠI MẠCH 3  GCTCCTGCTATGAGTGATCTAAAAAAACATGAGCATTCTATGCAAAATCAGAGTATGAATCCCAGCTCATGATCTAGCAA  80
EXON LÚA 3       GCTTCTGCTATCAATGATCCCAAAAAGCATGAAACTTCTATGAAAAATGAAAGCCTGAATACTGCCCTGTCATCTGACGA  80

ĐA SỐ        TATGXTGAXXGAXAAXAXACCTCXXTGTTCXCGTGAGTCXAXTCTXXCAGTXAATXTXXXAAGTGCXCXGAXCCAACXXG
                      90       100       110       120       130       140       150       160
EXON ĐẠI MẠCH 3  TATGGTGAATGAAAACAGACCTCCCTGTTCACGTGAGTGGAGTGTTACAGTGAATGT---AAGTGCTCAGAACCAACCTG  157
EXON LÚA 3       TATGATGATCGACAATATACCTCTATGTTCTCGTGAGTCAACTCTCGCAGTCAATATTTCAAGTGCCCCGAGCCAACTGG  160

ĐA SỐ        TTGGAATGGTTGGTTTXACTGACAGCXXXCCTGCTGAAGTTGGTACATCTGAGXXGCAXCAGATGAATAGCTCTGXXAAT
                     170       180       190       200       210       220       230       240
EXON ĐẠI MẠCH 3  TTGGAATGGTTGGTTTGACTGACAGCATGCCTGCTGAAGTTGGTACATCTGAGCCGCAGCAGATGAATAGCTCTGACAAT  237
EXON LÚA 3       TTGGAATGGTTGGTTTAACTGACAGCTCACCTGCTGAAGTTGGTACATCTGAGTTGCATCAGATGAATAGCTCTGGAAAT  240

ĐA SỐ        GCXATGCAXGAGXCXCAGXCTGAAAXTGTXGCTGAXAAGTCXGCAGAXGATGGXTAXAACTGGCGXAAATAXGGGCAXAA
                     250       260       270       280       290       300       310       320
EXON ĐẠI MẠCH 3  GCCATGCAAGAGCCGCAGTCTGAAAATGTTGCTGACAAGTCGGCAGATGATGGCTACAACTGGCGGAAATACGGGCAGAA  317
EXON LÚA 3       GCTATGCAGGAGTCACAGCCTGAAAGTGTGGCTGAAAAGTCTGCAGAGGATGGTTATAACTGGCGCAAATATGGGCAAAA  320
```

Fig. 29

```
ĐA SỐ          GCATGTXAAGGGAAGTGAXAACCCXAGAAGXTAXTACAAGTGCACACATCCTAAXTGTGAXGTAAAAAAGCTATTGGAGC
                        330       340       350       360       370       380       390       400
EXON ĐẠI MẠCH 3 GCATGTCAAGGGAAGTGAAAACCCTAGAAGTTACTACAAGTGCACACATCCTAATTGTGAAGTAAAAAAGCTATTGGAGC 397
EXON LÚA 3     GCATGTTAAGGGAAGTGAGAACCCGAGAAGCTATTAGAAGTGCACACATCCTAACTGTGATGTAAAAAAGCTATTGGAGC 400

ĐA SỐ          GTXCXXTTGATGGTCXGATXACXGAAGTXGTXTATAAXGGXCGXCACAATCAXCCTAAGCCCCAXCCCAATAGGAGGXTX
                        410       420       430       440       450       460       470       480
EXON ĐẠI MẠCH 3 GTGCAGTTGATGGTCTGATCACGGAAGTTGTCTATAAGGGACGCCACAATCATCCTAAGCCCCAGCCCAATAGGAGGTTA 477
EXON LÚA 3     GTTCGCTTGATGGTCAGATTACTGAAGTGGTTTATAAAGGGCGTCACAATCACCCTAAGCGCCAACCCAATAGGAGGCTG 480

ĐA SỐ          XCTGXXGGTGCAGTTCCTXCAAXCCAGGGTGAAGAAXGATATGAXGGXGXXXCAXCTXCTGATG
                        490       500       510       520       530       540
EXON ĐẠI MẠCH 3 GCTGGTGGTGCAGTTCCTTCAAACCAGGGTGAAGAACGATATGACGGCGCTTCAGCTGCTGATG 541
EXON LÚA 3     TCTGCCGGTGCAGTTCCTCCAATCCAGGGTGAAGAAAGATATGATGGTGTGGCAACTACTGATG 544
```

Fig. 29
(tiếp)

```
ĐA SỐ              XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
                            10        20        30        40        50        60        70        80
INTRON ĐẠI MẠCH 2  --------------------------------------------------------------------------------    0
INTRON LÚA 2       GTATGGATCCTTTCTTTGAGTGATTACCTGGTATCGTGTAATTCTTCATTTGTGTATACTGTATTTGAGAGTTTGAAAAA   80

ĐA SỐ              XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
                            90       100       110       120       130       140       150       160
INTRON ĐẠI MẠCH 2  --------------------------------------------------------------------------------    0
INTRON LÚA 2       ATTTCCATAGAAAATAATAACATTTGTTGTTTACAAATGGTCCCGCCAAAACAGTGGAATTTATATTGGGGATGTACATA  160

ĐA SỐ              XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
                           170       180       190       200       210       220       230       240
INTRON ĐẠI MẠCH 2  --------------------------------------------------------------------------------    0
INTRON LÚA 2       AAAGGAGTGTAAAGTTCTAATGTGCTTATGCTAACTTCCTTTCCATGATCTAAAGTTGTTACCTTACGGTATGCTATTTA  240

ĐA SỐ              XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
                           250       260       270       280       290       300       310       320
INTRON ĐẠI MẠCH 2  --------------------------------------------------------------------------------    0
INTRON LÚA 2       TTGGATCTATATTGCATTTTACTTGGTAAATCTATCTGAGGTTCCAGCTTTTGATATTTAAGTTTTCCTATGTTTAATTC  320
```

Fig. 30

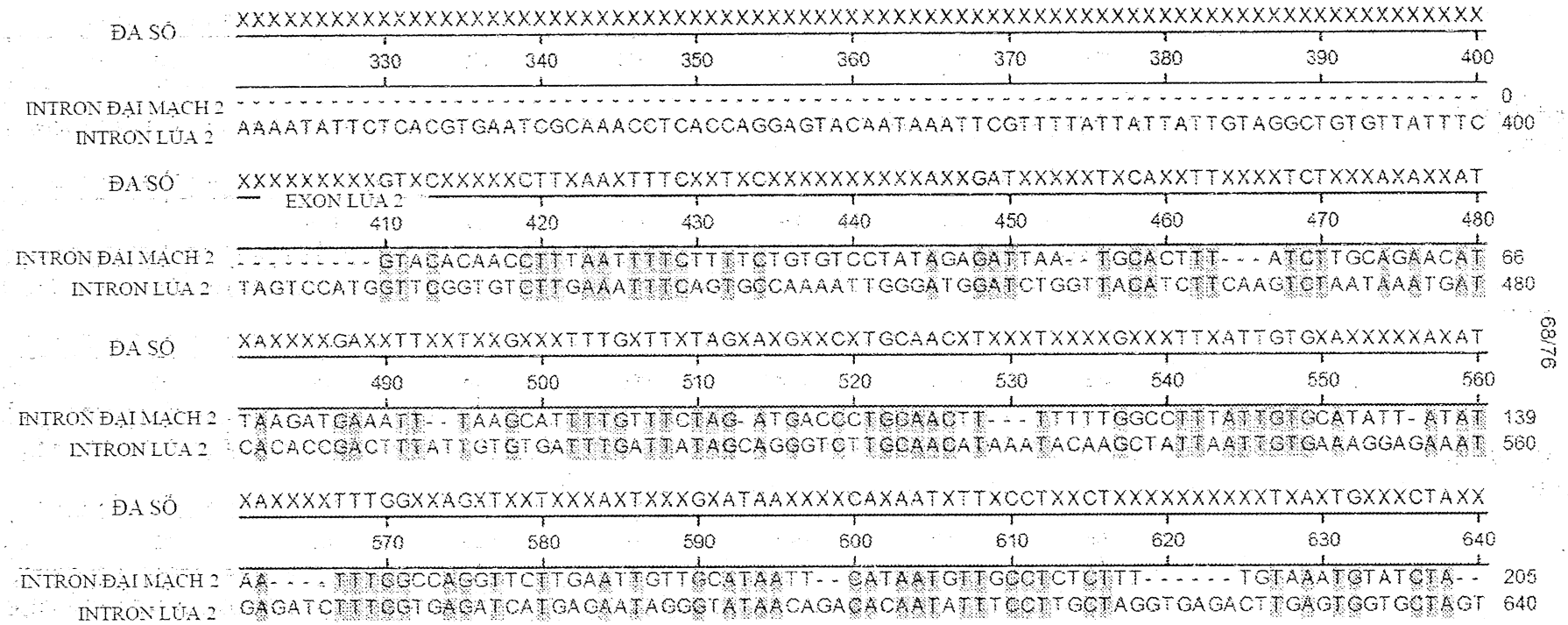

ĐA SỐ
330 340 350 360 370 380 390 400
INTRON ĐẠI MẠCH 2
INTRON LÚA 2
AAAATATTCTCACGTGAATCGCAAACCTCACCAGGAGTACAATAAATTCGTTTTATTATTATTGTAGGCTGTGTTATTTC
ĐA SỐ
EXON LÚA 2
410 420 430 440 450 460 470 480
INTRON ĐẠI MẠCH 2
INTRON LÚA 2
TAGTCCATGGTTCGGTGTCTTGAAATTTCAGTGCCAAAATTGGGATGGATCTGGTTACATCTTCAAGTCTAATAAATGAT
ĐA SỐ
490 500 510 520 530 540 550 560
INTRON ĐẠI MẠCH 2
INTRON LÚA 2
ĐA SỐ
570 580 590 600 610 620 630 640
INTRON ĐẠI MẠCH 2
INTRON LÚA 2

Fig. 30
(tiếp)

```
ĐA SỐ          XXXGXTXCAXATTTXXXXXXXTATXXXXAXATTTXXXXTXXGXATXXXAGXAAXXXAAXGXXCXAXTCXAXXXXXXTXXX
                         650       660       670       680       690       700       710       720
INTRON ĐẠI MẠCH 2  TGAGTTACATATTT-------TATTCTGATATTT----TTTGGATGATAGGAAGGTAACG--CTATTCCAGATGCATGGC  272
INTRON LÚA 2  2    CTGGCTGCAAATTTATAGAAGTATGTGAAAATTTGAGGTCAGAATACAAGTAATTGAATGGACCAATCTAATGAGTTCTG  720

ĐA SỐ          XAXXXTXAXXATAAXXXXXXTTAACXTXAAXATXXXTXXXXXXXATXAXXTCXTTCXXCATXTTGTXGXXAAXXXXXXXX
                         730       740       750       760       770       780       790       800
INTRON ĐẠI MẠCH 2  AAATCTCAATATAAAACTCATTAAC-TCAATATTCATGTGCAGCATTACTTCTTTC-ACATGTTGTGGAGAA--------  342
INTRON LÚA 2       TAGCTTTAGAATAATTAATGTTAACATAAAAATATGTTCATGAAATCAGGTCCTTCTGCATTTTGTTGTTAACCGAATTC  800

ĐA SỐ          XXXXTTXXTXTXTAXXTXXXAXAXXTXXAXXXAAGTATXTTGXAATGGXXGXXXXXTTTXXGGAAAACXXXCTXXXXTAC
                         810       820       830       840       850       860       870       880
INTRON ĐẠI MẠCH 2  ---GTTTCTTTATAAATGGTAGAGTTTGAAGGAAGTATTTTG-AATGGCAG-----TTTGGGGAAAAC---CTATGGTAC  410
INTRON LÚA 2       CACATTCTTCTTTAGTTCTCACAAGTACAGACAAGTATCTTGTAATGGTGGATTCTTTTTTGGAAAACAAACTTCATTAC  880

ĐA SỐ          ATATXTXGTXXGATCXATCTXTGCXTXXTXXXXTXGTXACXTXXTTTXCXXXAXXCXTTGXXTTXTXTTXXXXTAXTTAG
                         890       900       910       920       930       940       950       960
INTRON ĐẠI MẠCH 2  ATATGTAGTTAGATCTATCTGTGCTTGCTATATTAGTCACATCCTTT-GTTAATTCGTTGACTTGTTTTTACATATTTAG  489
INTRON LÚA 2       ATATTTTGTGTGATCCATCTATGCCTTGTGCCCTTGTTACCTTTTTTTCCCTACACCTTGTTTTCTCTT---GTACTTAG  957

ĐA SỐ          TTTTGCATTGTXTAACXTTTXXXTGXXXTCXTXTXTTGTACTGXAG
                         970       980       990       1000
INTRON ĐẠI MẠCH 2  TTTTGCATTGTGTAACATTTG--TGATGTGATATTTTGTACTGCAG  533
INTRON LÚA 2       TTTTGCATTGTATAACCTTTTGCTGTACTGGTGTCTTGTACTGTAG  1003
```

Fig. 30
(tiếp)

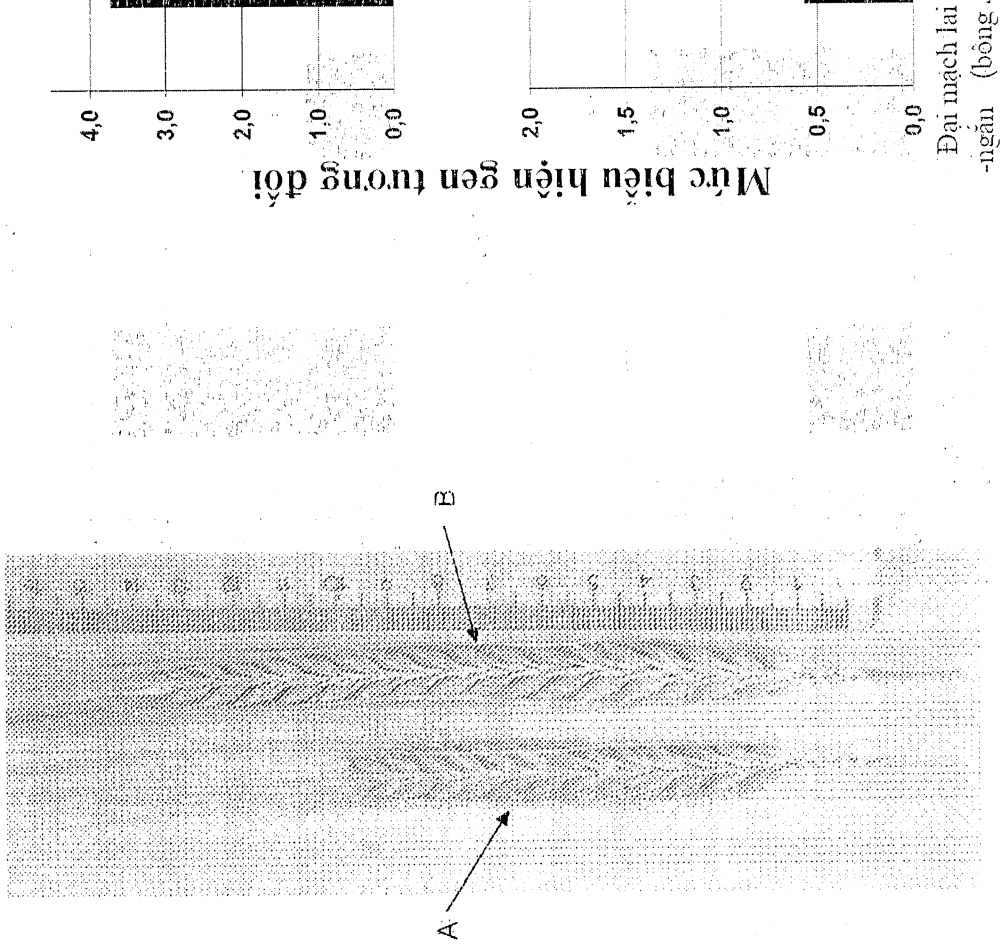

A
B

Fig. 31

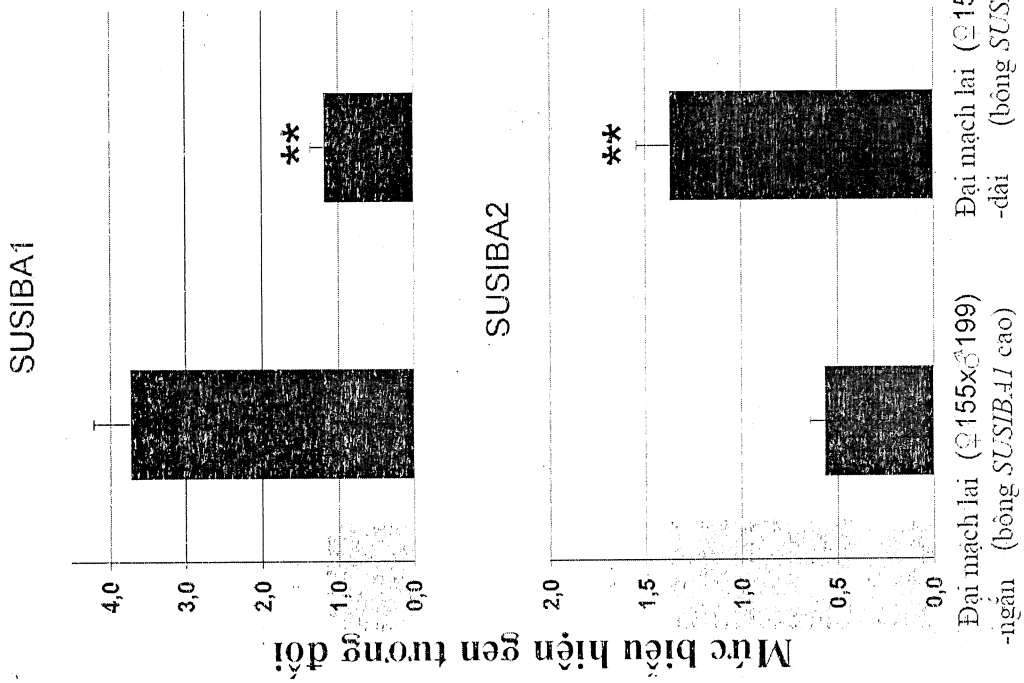

SUSIBA1
SUSIBA2
Mức biểu hiện gen tương đối
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
**
**
Đại mạch lai (♀155x♂199) -ngắn (bông SUSIBA1 cao)
Đại mạch lai (♀155x♂199) -dài (bông SUSIBA2 cao)

Fig. 32

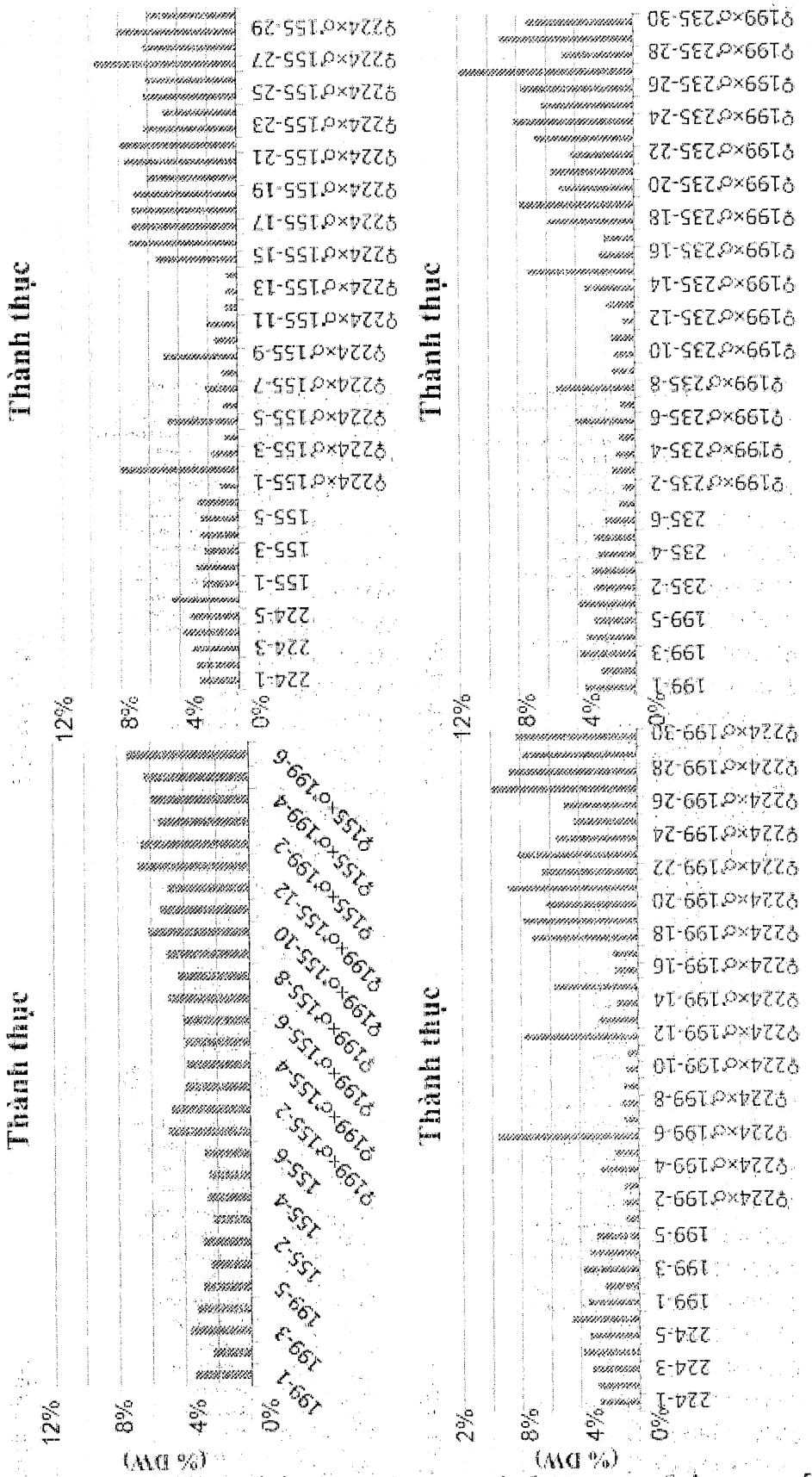


Fig. 33 Hàm lượng fructan trong hạt thành thục. Hàm lượng fructan trong hạt thành thục

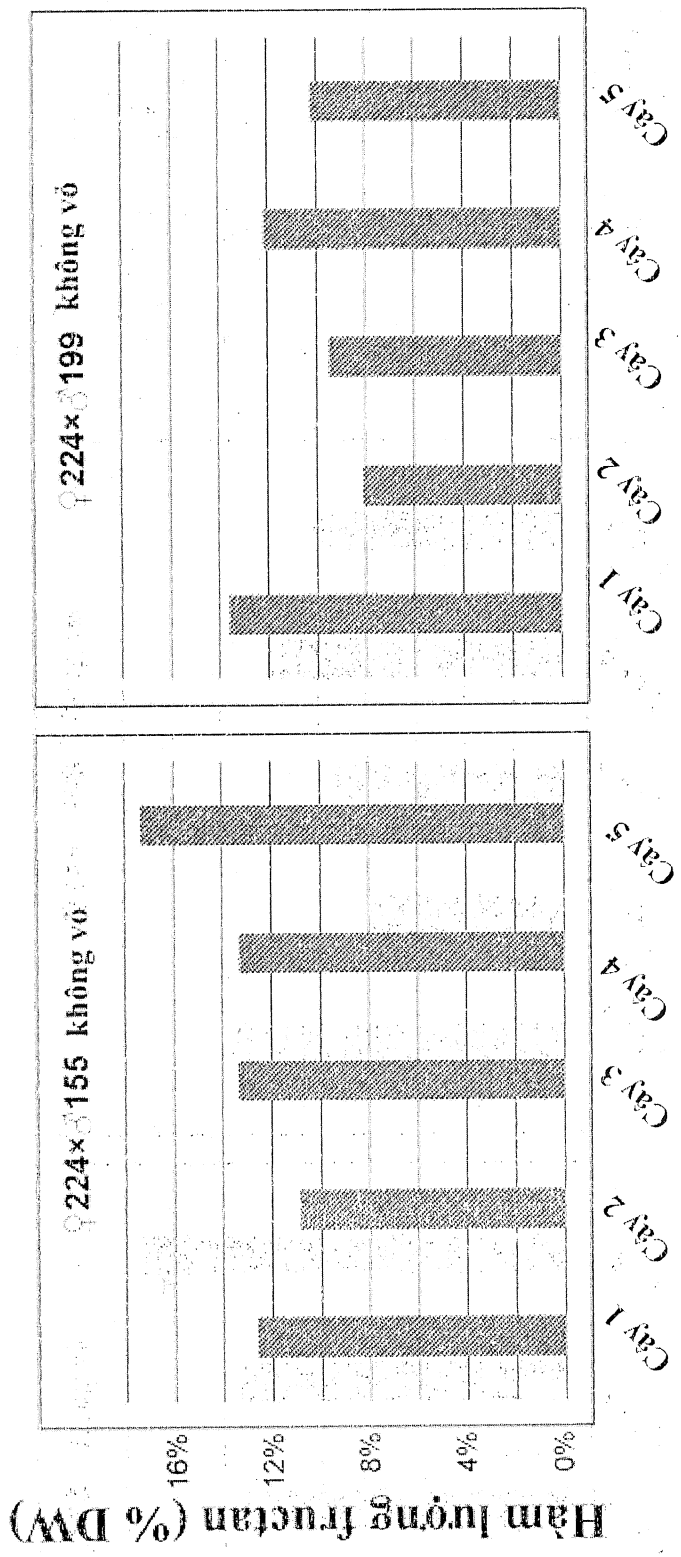

Hàm lượng fructan (% DW)
16%
12%
8%
4%
0%
224×155 không vỏ
224×199 không vỏ
Cây 1
Cây 2
Cây 3
Cây 4
Cây 5

Fig. 34

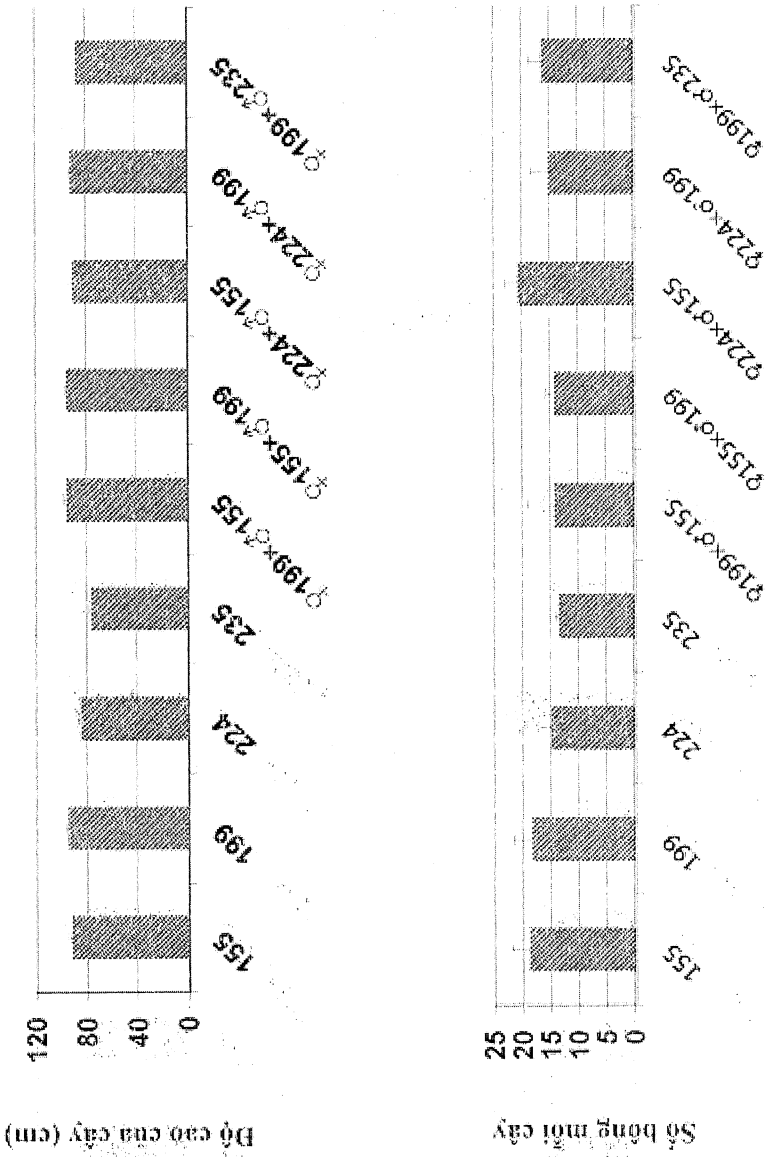
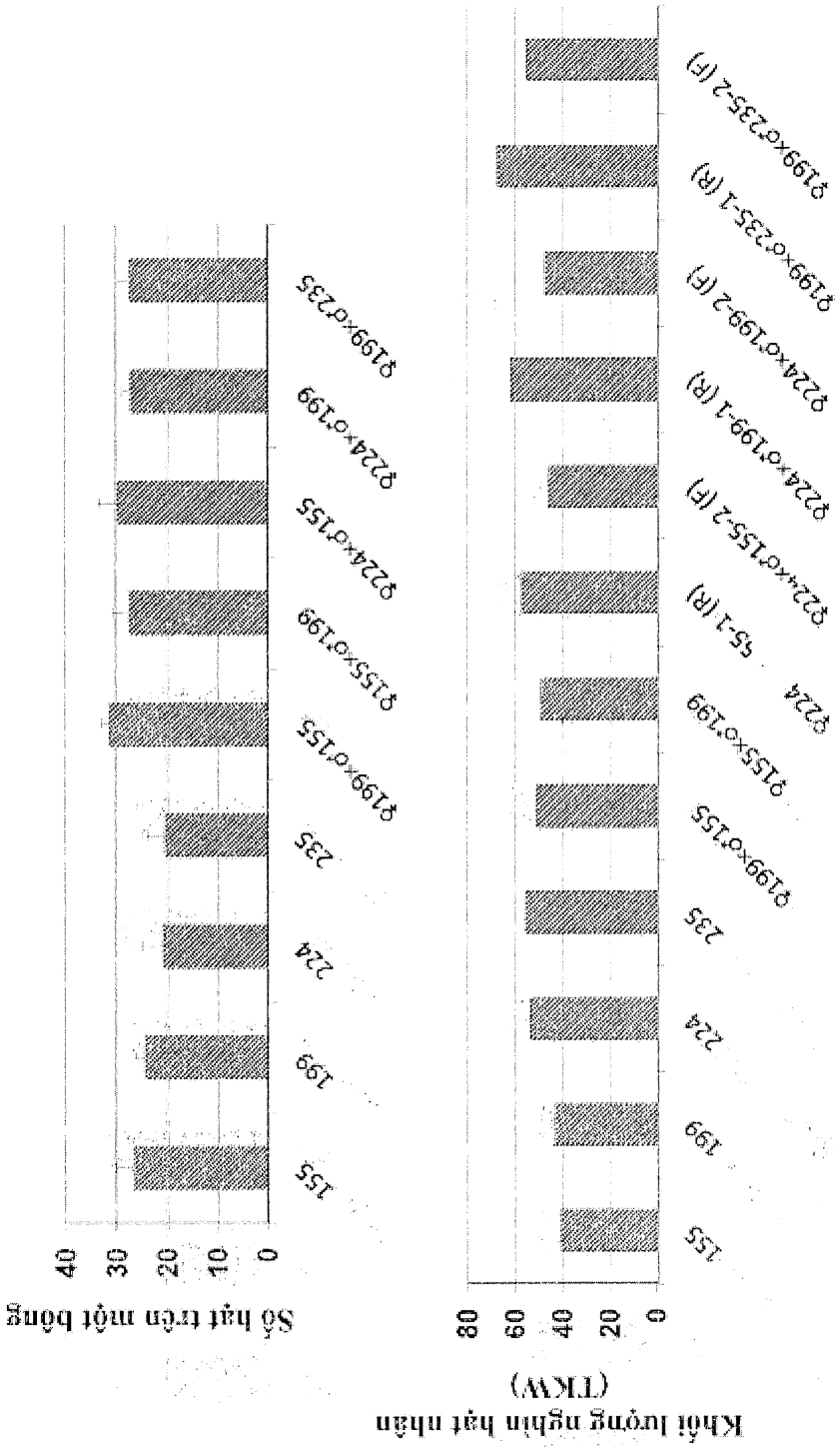

Độ cao của cây (cm)
120
80
40
0
155
199
224
235
♀199×♂155
♀155×♂199
♀224×♂155
♀224×♂199
♀199×♂235
Số bông mỗi cây
25
20
15
10
5
0
155
199
224
235
♀199×♂155
♀155×♂199
♀224×♂155
♀224×♂199
♀199×♂235

Fig. 35


Số hạt trên một bông
40
30
20
10
0
155
199
224
235
♀199×♂155
♀155×♂199
♀224×♂155
♀224×♂199
♀199×♂235
Khối lượng nghìn hạt nhân
(TKW)
80
60
40
20
0
155
199
224
235
♀199×♂155
♀155×♂199
♀224
♀224 ♂5-1 (R)
♀224×♂155-2 (F)
♀224×♂199-1 (R)
♀224×♂199-2 (F)
♀199×♂235-1 (R)
♀199×♂235-2 (F)

Hình 35

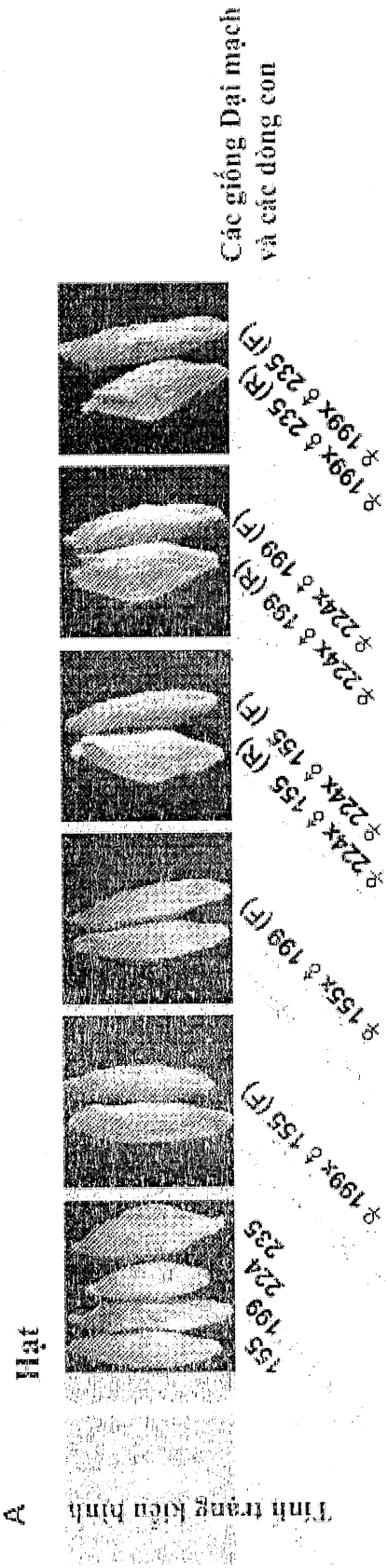

A
Tính trạng kiểu hình
Hạt
155
199
224
235
♀199x♂155 (F)
♀199x♂155 (F)
♀224x♂155 (R)
♀224x♂155 (F)
♀224x♂199 (R)
♀224x♂199 (F)
♀199x♂235 (R)
♀199x♂235 (F)
Các giống Đại mạch
và các dòng con

Fig. 36

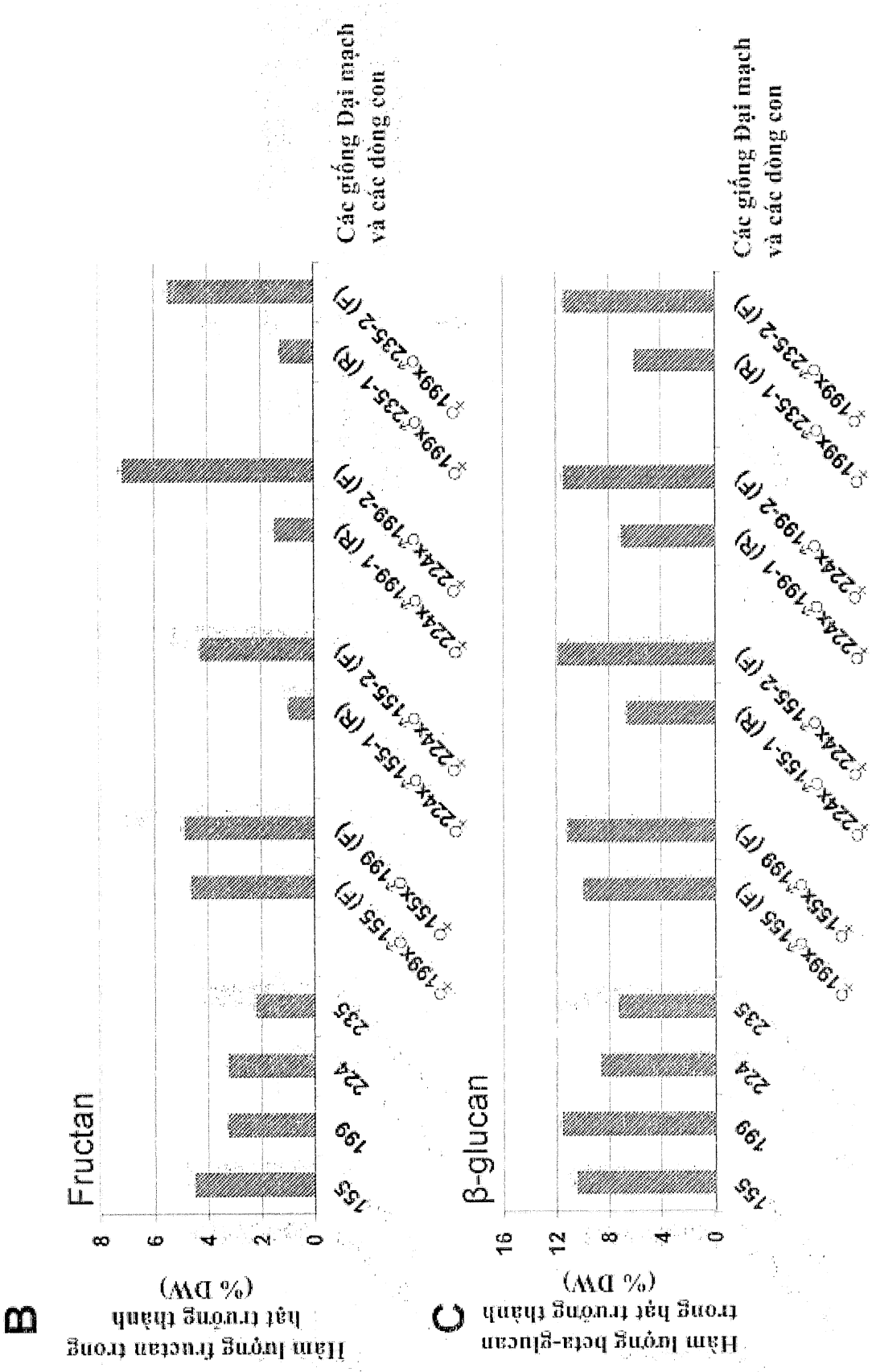

B
Hàm lượng fructan trong hạt trường thành (% DW)
Fructan
8
6
4
2
0
155
199
224
235
♀199x♂155 (F)
♀155x♂199 (F)
♀224x♂155-1 (R)
♀224x♂155-2 (F)
♀224x♂199-1 (R)
♀224x♂199-2 (F)
♀199x♂235-1 (R)
♀199x♂235-2 (F)
Các giống Đại mạch và các dòng con
C
Hàm lượng beta-glucan trong hạt trường thành (% DW)
β-glucan
16
12
8
4
0
155
199
224
235
♀199x♂155 (F)
♀155x♂199 (F)
♀224x♂155-1 (R)
♀224x♂155-2 (F)
♀224x♂199-1 (R)
♀224x♂199-2 (F)
♀199x♂235-1 (R)
♀199x♂235-2 (F)
Các giống Đại mạch và các dòng con

Fig. 36