

Các họ gene mã hóa protein vận chuyển kim loại ở cây họ Đậu (Fabaceae): II. Các gene mã hóa protein trao đổi cation (CAX)

• Cao Phi Bằng

Trường Đại học Hùng Vương–Phú Thọ

• Lê Thị Vân Anh

Viện Công nghệ Sinh học–Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

(Bài nhận ngày 21 tháng 10 năm 2016, nhận đăng ngày 26 tháng 07 năm 2017)

TÓM TẮT

Các protein trao đổi cation (CAtion eXchangers, CAX) thuộc về siêu họ protein vận chuyển ngược chiều Ca^{2+} /cation. Các gene mã hóa CAX trong hệ gene của sáu loài cây họ Đậu đã được xác định trong nghiên cứu này. Ở các loài nghiên cứu, CAX là một họ đa gene nhỏ, đậu tương (có 17 gene), đậu Cove và đậu triều (cùng 6 gene), cỏ ba lá thập tự và đậu gà (5 gene), và đậu đại (3 gene). Kích thước của các gene CAX ở trong khoảng 1213 đến 11561 bp và chứa 4–11 intron. Phần lớn các protein CAX suy diễn (39/42 protein) có giá trị pI nhỏ hơn 7. Mô hình cấu trúc bậc hai cho thấy các protein CAX của cây họ Đậu có mang 3–11 vùng xoắn xuyên màng, trong đó có tới 23/42 CAX có 11 vùng

xoắn. Phân tích cây phả hệ cho thấy các CAX của cây họ Đậu được chia thành hai nhóm lớn, A và B, mỗi nhóm gồm hai phân nhóm. Hiện tượng nhân gene xảy ra trong hệ gene cây tổ tiên của các cây họ đậu. Các hiện tượng nhân gene CAX mới sau quá trình biệt hóa loài chỉ phát hiện ở cây đậu tương. Cả 3 gene CAX của cây Đậu đại biểu hiện ở tất cả các mô nghiên cứu. Ngược lại, sự biểu hiện của các gene CAX ở cây đậu triều không được phát hiện. Ở 4 loài còn lại, mức độ biểu hiện của các gene trong họ CAX không giống nhau ở các loại mô khác nhau. Trong đó, hiện tượng biểu hiện ưu thế của một số gene ở các mô chuyên biệt được quan sát ở 5 trong số 6 loài.

Từ khóa: protein trao đổi cation, họ Đậu (Fabaceae), cây phả hệ, biểu hiện gene, đặc tính gene

MỞ ĐẦU

Các protein trao đổi cation (CAtion eXchangers, CAX) là một nhóm các protein xuất cation khỏi tế bào chất để duy trì các nồng độ ion tối thích trong tế bào. Các CAX được cung cấp năng lượng từ gradient pH vốn được thiết lập nhờ các bơm proton như H^+ -ATPase hoặc H^+ -pyrophosphatase [1]. Các CAX là một trong năm họ của siêu họ protein vận chuyển ngược chiều Ca^{2+} /cation. Các protein này có mặt ở thực vật, động vật có xương sống bậc thấp, nấm, vi khuẩn. Dựa trên phân tích cây phả hệ, họ CAX được chia thành ba nhóm, trong đó các CAX của thực vật ở trong nhóm I (có cả các CAX của các nhóm sinh vật

khác), nhóm II gồm các CAX của nấm, động vật có xương sống bậc thấp và nhóm III chỉ tìm thấy ở vi khuẩn [2]. Ở thực vật, hầu hết CAX là các protein gắn với màng không bào, chỉ một số ít CAX hiện biết có mặt ở màng tế bào [3–5]. Cấu trúc của protein CAX được đặc trưng bởi 11 xoắn xuyên màng cũng như một số amino acid bảo thủ [2, 3]. Nhiều protein CAX ở thực vật giữ vai trò vận chuyển và duy trì cân bằng nội môi Ca^{2+} , nhưng một số trong số chúng được báo cáo có liên quan đến vận chuyển và duy trì cân bằng ion kim loại khác, đặc biệt là Mn^{2+} [2]. Các CAX được cho là có nhiều chức năng quan trọng đối với sự

sinh trưởng và phát triển của thực vật [6], có thể vai. Ngoài ra, một số báo cáo đã chỉ ra CAX còn liên quan đến sự đáp ứng với các điều kiện bất lợi của môi trường như mặn, kim loại nặng [2, 4, 8-10].

Ở thực vật, các gene CAX là thành viên một họ đa gene nhỏ. Ở *Arabidopsis thaliana* và lúa (*Oryza sativa*) có sáu gene CAX được báo cáo [11]. Trong khi hệ gene của cây dương (*Populus trichocarpa*) có bảy gene [11]. Tuy nhiên, ở các cây họ Đậu chỉ gene *GmCAX1* được báo cáo [5]. Gene này quy định protein có chiều dài 449 amino acid, gắn trên màng tế bào, liên quan đến sự vận chuyển Na^+ , K^+ và có vai trò làm tăng khả năng chịu mặn ở cây *A. thaliana* [5].

Trong công trình này, chúng tôi hướng tới xác định được các gene của họ protein trao đổi cation trong hệ gene của các cây họ Đậu có hệ gene đã được giải trình tự. Phân loại và bước đầu phân tích chức năng của các gene thông qua phân tích cây phả hệ và sự biểu hiện của chúng bằng cách tiếp cận *in silico*. Kết quả nghiên cứu sẽ cung cấp các đặc trưng của các gene CAX của cây họ Đậu; mở đường cho các phân tích chức năng cũng như công tác chọn tạo giống cây trồng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Cơ sở dữ liệu về các trình tự gene của các cây họ Đậu

Hệ gene của các cây họ Đậu đã được giải trình tự bởi nhiều nhóm nghiên cứu khác nhau, gồm đậu tương (*Glycine max*) [12], đậu Cove (*Phaseolus vulgaris*) [13], đậu gà (*Cicer arietinum*) [14], Đậu triều (*Cajanus cajan*) [15, 16] và cỏ ba lá thập tự (*Medicago truncatula*) [17, 18], đậu đại (*Lotus japonicus*) [19].

Xác định các gene CAX của các cây họ Đậu

Các gene CAX trong hệ gene của các cây họ đậu được xác định bằng cách sử dụng protein CAX1 của cây *A. thaliana* [20] được sử dụng làm khuôn dò, chương trình TBLASTN được sử dụng để tìm kiếm

trò này có liên quan đến sự vận chuyển auxin [7]. các gene tương đồng trên dữ liệu nucleotide của toàn hệ gene của các loài Đậu tương (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=BLAST&method=Org_Gmax), Đậu Cove (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=BLAST&method=Org_Pvulgaris_er), cỏ ba lá thập tự (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=BLAST&method=Org_Mtruncatula) và các loài đậu gà, đậu triều, đậu đại (<http://legumeinfo.org/blast/protein/nucleotide>).

Tạo cây phả hệ

Cây phả hệ được xây dựng từ 62 protein CAX của các cây họ Đậu, Rêu, Dương xỉ, *A. thaliana*, dương và lúa nhờ phần mềm MEGA5, với các tham biến: thuật toán Maximum Likelihood, mô hình Jones-Taylor-Thornton (JTT), phương pháp Bootstrap với 1000 lần lặp lại theo phương pháp đã được mô tả [21].

Phân tích *in silico* các protein CAX

Các đặc điểm vật lý, hóa học của các protein được phân tích nhờ các phần mềm của ExPASy [22]. Mô hình cấu trúc được xây dựng bằng cách sử dụng phần mềm Psipred [23]

Phân tích sự biểu hiện gene

Sự biểu hiện của các gene CAX được phân tích qua ngân hàng RNAseq của cây đậu tương [24], đậu cove [25], hoặc ngân hàng Microarray của cây cỏ ba lá thập tự [26], đậu đại [27] và đậu gà [28, 29]. Sự biểu hiện của các CAX ở cây đậu triều được phân tích qua ngân hàng EST (expressed sequence tag) [30]. Nhờ vào sự có sẵn của các ngân hàng phiên mã này, sự biểu hiện của các gene CAX được khảo sát ở cả các mô sinh dưỡng và mô sinh sản, tuy nhiên, số lượng các mô được phân tích không giống nhau giữa các loài.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định các gene mã hóa CAX ở hệ gene của các cây họ Đậu

Nhờ sử dụng protein trao đổi cation CAX1 của cây *A. thaliana* [20] làm khuôn dò để tìm kiếm các gene tương đồng, chúng tôi đã xác định được tổng số 42 gene mã hóa cho các protein CAX trong hệ gene của sáu loài cây họ Đậu được nghiên cứu. Các protein suy diễn đều có mang đoạn trình tự bảo tồn *Na₂Ca₂ex* (PF01699) đặc trưng cho các protein CAX đã biết [2].

Các gene CAX thuộc về họ đa gene nhỏ ở trong hệ gene của các cây họ Đậu với số lượng không giống nhau ở các loài khác nhau (Bảng 1). Cây đậu đại có ít gene CAX nhất (03 gene) khi so sánh với các cây họ đậu khác. Cây cỏ thập tự ba lá và cây đậu gà cùng có năm gene. Tương tự hai loài đậu triều và đậu Cove cùng có sáu gene. Trong khi đó, cây đậu tương (đa bội) có nhiều gene CAX nhất (17 gene). Các cây họ đậu lưỡng bội có số lượng gene CAX tương đương với một số loài thực vật khác như *A. thaliana* (6 gene), dương (7 gene), lúa (6 gene) và cây nho (4 gene) [11].

Đặc điểm các gene CAX của các cây họ Đậu

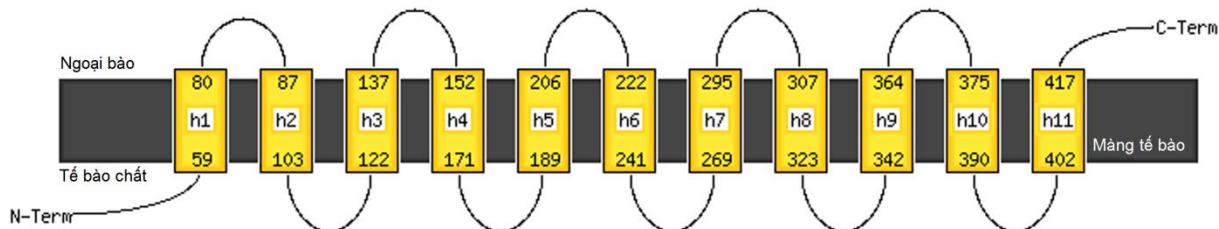
Bảng 1. Các gene CAX của cây họ đậu và đặc điểm của chúng

Loài	Gene	Tên locus	Kích thước gene (bp)	Chiều dài protein (aa)	Khối lượng protein (kD)	pI	Số lượng xoắn	Số lượng intron
Đậu gà (<i>C. arietinum</i>)	<i>CaCAX1</i>	Ca_02942	10210	718	79,08	6,51	10	11
	<i>CaCAX2</i>	Ca_14266	4433	420	45,72	7,03	11	10
	<i>CaCAX3</i>	Ca_19346	3561	455	49,62	5,61	10	10
	<i>CaCAX4</i>	Ca_07634	4223	449	49,09	5,27	10	11
	<i>CaCAX5</i>	Ca_17722	1961	372	40,40	5,19	8	5
Đậu triều (<i>C. cajan</i>)	<i>CcCAX1</i>	C.cajan_19753	5452	444	48,74	6,00	12	9
	<i>CcCAX2</i>	C.cajan_19890	5351	453	49,45	5,05	11	11
	<i>CcCAX3</i>	C.cajan_17583	3410	448	48,66	5,60	11	10
	<i>CcCAX4</i>	C.cajan_25757	3383	442	48,24	6,25	10	10
	<i>CcCAX5</i>	C.cajan_26251	7758	434	47,68	5,31	11	9
	<i>CcCAX6</i>	C.cajan_46620	3971	403	44,09	5,08	11	9
Đậu đại (<i>L. japonicus</i>)	<i>LjCAX1</i>	chr2.CM0346.90.r2.m	4091	449	49,02	6,33	11	10
	<i>LjCAX2</i>	chr1.CM0548.320.r2.d	3378	470	51,50	6,13	11	9
	<i>LjCAX3</i>	LjSGA_029744.1	1213	263	28,67	9,30	6	4
Đậu tương (<i>G. max</i>)	<i>GmCAX1</i>	Glyma.01G122800	3987	456	49,30	6,06	10	10
	<i>GmCAX2</i>	Glyma.02G226500	5519	450	48,95	5,92	11	10
	<i>GmCAX3</i>	Glyma.03G058300	4047	446	48,16	6,20	11	10
	<i>GmCAX4</i>	Glyma.03G058500	4375	451	48,83	6,26	11	10
	<i>GmCAX5</i>	Glyma.05G102600	2764	301	33,07	6,64	9	6
	<i>GmCAX6</i>	Glyma.07G026800	3188	248	27,56	9,64	3	5
	<i>GmCAX7</i>	Glyma.07G149600	3482	449	48,46	5,84	11	10
	<i>GmCAX8</i>	Glyma.08G336900	9570	718	79,78	5,12	11	10
	<i>GmCAX9</i>	Glyma.08G337000	4292	428	46,63	5,15	11	9
	<i>GmCAX10</i>	Glyma.09G159600	1800	254	27,32	5,01	7	6
	<i>GmCAX11</i>	Glyma.11G178700	2915	361	38,70	4,74	5	7
	<i>GmCAX12</i>	Glyma.13G372100	11561	437	48,07	4,96	11	9
	<i>GmCAX13</i>	Glyma.14G193400	4683	442	48,22	6,08	10	10
	<i>GmCAX14</i>	Glyma.15G001600	6390	434	47,55	4,99	10	9
	<i>GmCAX15</i>	Glyma.18G063200	4877	436	47,72	5,78	11	9

	<i>GmCAX16</i>	Glyma.18G072200	5275	453	49,23	5,15	11	11
	<i>GmCAX17</i>	Glyma.18G200500	3468	449	48,54	5,56	11	10
Cỏ ba lá thập tự (<i>M. truncatula</i>)	<i>MtrCAX1</i>	Medtr2g105640	6807	442	48,11	5,16	11	5
	<i>MtrCAX2</i>	Medtr3g082180	3313	434	47,48	5,00	10	9
	<i>MtrCAX3</i>	Medtr4g016720	4477	456	50,01	5,65	11	10
	<i>MtrCAX4</i>	Medtr5g070330	5116	435	47,65	6,50	10	10
	<i>MtrCAX5</i>	Medtr7g068380	3624	455	49,19	5,74	11	10
Đậu Cove (<i>P. vulgaris</i>)	<i>PvCAX1</i>	Phvul.005G184600	8691	432	47,31	4,93	10	8
	<i>PvCAX2</i>	Phvul.006G060800	3945	428	46,58	5,28	11	9
	<i>PvCAX3</i>	Phvul.006G067900	2955	435	47,59	5,50	11	9
	<i>PvCAX4</i>	Phvul.008G104500	3056	449	48,58	5,59	10	10
	<i>PvCAX5</i>	Phvul.008G261500	3304	435	47,21	6,00	10	10
	<i>PvCAX6</i>	Phvul.010G001500	3597	443	47,95	6,00	11	10

Tất cả các gene mã hóa protein CAX ở các cây họ Đậu đều là các gene phân đoạn, có kích thước khác nhau, nhỏ nhất là gene *LjCAX3* (1213 pb) và lớn nhất là *GmCAX12* (11561 bp). Trong đó có tới 33 gene mang 9 tới 11 đoạn không mã hóa. Kích thước các phân tử protein suy diễn CAX của các cây họ Đậu cũng có kích thước biến đổi, phần lớn có từ 403 tới 470 amino acid. Hầu hết các CAX của cây họ Đậu đều có tính acid, 39/42 phân tử có pI lý thuyết nhỏ hơn 7, chỉ có một phân tử có pI xấp xỉ 7 (*CaCAX2*) và hai phân tử có pI kiềm (*LjCAX3* và *GmCAX6*) (Bảng 1). Hai phân tử có pI lớn này đều có kích thước ngắn, có thể các gene mã hóa chúng là các gene giả (pseudogene) có cấu trúc biến đổi.

Mô hình cấu trúc không gian của các protein CAX được xây dựng nhờ phần mềm Psipred cho thấy chúng có 3 đến 11 vùng xoắn xuyên màng. Tiêu biểu như *PvCAX6* (Hình 1) có tới 11 vùng xoắn xuyên màng. Tương tự, có tới 23 trong tổng số 42 protein CAX suy diễn của các cây họ đậu có 11 vùng xoắn xuyên màng. Cấu trúc này điển hình cho các protein CAX ở thực vật [10, 31]. Ngoài ra, 10 protein CAX khác có 10 vùng xoắn xuyên màng. Các cấu trúc xoắn xuyên màng cho phép dự đoán các protein này khu trú tại màng sinh học, giống như các protein vận chuyển Cu^{2+} (Copper transporter-CTR) của cây họ Đậu đã được báo cáo [21].



Hình 1. Cấu trúc bậc hai của *PvCAX6* với 11 xoắn xuyên màng điển hình

Phân tích cây phả hệ và sự tiến hóa của họ CAX ở các cây họ Đậu

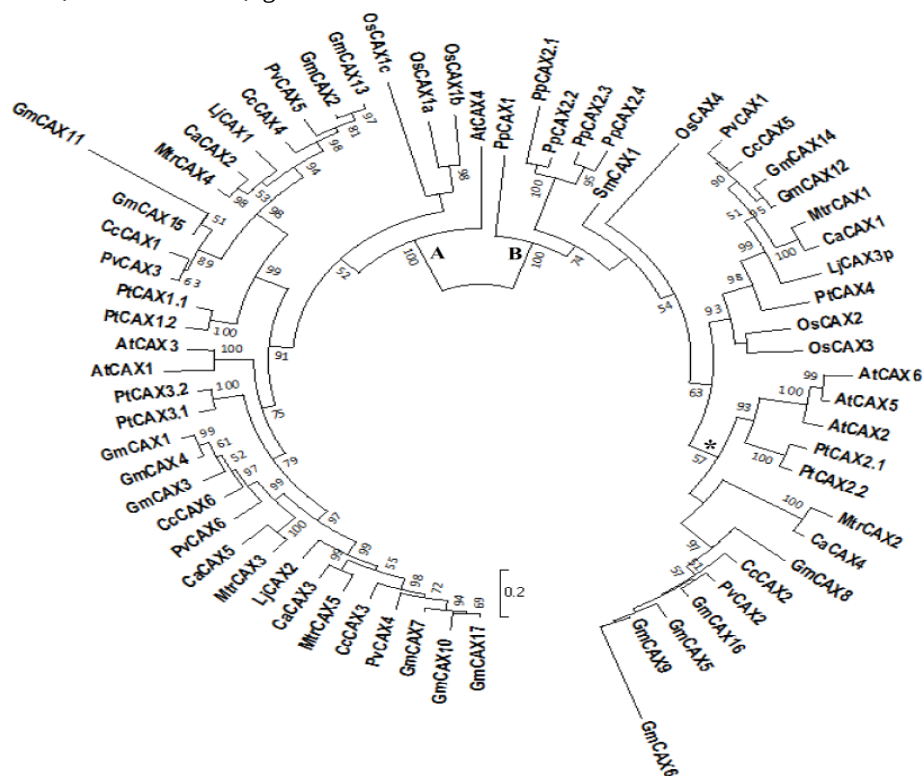
Cây phả hệ được xây dựng từ 62 protein CAX của các loài rêu, dương xỉ, *A. thaliana*, dương, lúa và các cây họ Đậu (Hình 2). Cây phả hệ cho thấy các CAX của thực vật được chia thành hai nhóm, nhóm A và nhóm B như đã được báo cáo [10, 11, 31]. Nhóm A gồm 26 protein CAX của các cây họ Đậu và của cây lúa, dương và *A. thaliana* nhưng không có đại diện của các thực vật bậc thấp (rêu, dương xỉ). Nhóm

B chỉ gồm 16 protein của các cây họ Đậu, nhưng có đại diện của các cây hạt kín khác cũng như của các thực vật bậc thấp. Sự phân biệt giữa hai nhóm này gợi ý rằng giữa chúng có thể có sự khác nhau về chức năng nhưng đến nay chưa có các bằng chứng rõ ràng chứng minh giả thiết này. Đồng thời, hiện tượng cây rêu và dương xỉ chỉ có các CAX nhóm B cho phép đặt giả thiết rằng có một gene CAX nhóm A tổ tiên chung của thực vật hạt kín xuất hiện sau và có sự biệt hóa về cấu trúc so với gene CAX nhóm B tổ tiên

chung của thực vật. Các gene tổ tiên chung này tiếp tục được nhân lên trong hệ gene của các nhóm thực vật khác nhau dẫn tới sự tạo thành họ đa gene *CAX* ở các loài thực vật sau này, trong đó có tổ tiên chung của các cây họ Đậu. Kết quả nghiên cứu này khẳng định sự tiến hóa của siêu họ gen Ca^{2+} /Cation Antiporter (*CaCA*) ở các loài thuộc chi *Arabidopsis* và *Oryza* đã được báo cáo rất gần đây [32].

Trong mỗi nhóm A và B, các *CAX* của cây họ Đậu lại xếp thành hai phân nhóm khác nhau trên cây phả hệ. Hai phân nhóm của nhóm A có các đại diện của đủ cả sáu loài nghiên cứu, trong khi chỉ một phân nhóm của nhóm B có các đại diện của cả sáu loài, phân nhóm còn lại (dấu *) không có đại diện ở cây đậu đại. Hiện tượng này giống với hiện tượng được quan sát đối với sự tiến hóa của họ gene *CTR* ở các

cây họ Đậu [21]. Hiện tượng thiếu gene trong phân nhóm B của cây đậu đại có thể có nguyên nhân do hiện tượng mất gene xảy ra ở loài này hoặc do sự nhân gene của phân nhóm này chỉ xảy ra sau khi đã có sự biệt hóa loài đậu đại. Sau thời điểm biệt hóa loài của các cây họ Đậu, các gene *CAX* vẫn tiếp tục được nhân lên ở cây đậu tương, hình thành nên các gene *GmCAX1*, *GmCAX3*, *GmCAX4*; *GmCAX2* và *GmCAX13*; *GmCAX7*, *GmCAX10* và *GmCAX17*; *GmCAX5*, *GmCAX6* và *GmCAX9*; *GmCAX12* và *GmCAX14*. Đây có thể là nguyên nhân chính dẫn tới sự tăng về kích thước họ gene *CAX* ở cây đậu tương so với các loài cây họ đậu khác. Hiện tượng nhân gene *CAX* sau quá trình biệt hóa loài của cây đậu tương giống như ở các loài *A. thaliana*, dương, nho và lúa [11, 32].



Hình 2. Cây phả hệ được xây dựng từ các protein *CAX* của các cây họ Đậu: đậu tương (*Gm*), đậu gà (*Ca*), đậu triều (*Cc*), Cỏ thập tự ba lá (*Mtr*), đậu Cove (*Pv*), đậu đại (*Lj*), rêu (*Pp*), dương xỉ (*Sm*), *A. thaliana* (*At*), dương (*Pt*) và lúa (*Os*). Giá trị bootstrap được thể hiện trên mỗi nhánh (giá trị nhỏ hơn 50 bị loại bỏ), tỷ lệ xích là số amino acid thay thế trên một vị trí

Sự biểu hiện của các gene CAX của các cây họ Đậu

Sử dụng phương pháp phân tích sự biểu hiện gene đã được mô tả bởi Lê Thị Vân Anh và Cao Phi Bằng (2016) [21], các kết quả nghiên cứu sự biểu hiện của các gene CAX ở các mô khác nhau của các loài lần lượt được giới thiệu trong các bảng số liệu: Bảng 2 (đậu tương), Bảng 3 (cây cỏ ba lá thập tự),

Bảng 4 (đậu đại), Bảng 5 (đậu gà), Bảng 6 (đậu Cove). Do các ngân hàng phiên mã của các loài này được xây dựng bởi các nhóm nghiên cứu khác nhau và không sử dụng cùng phương pháp, nên kết quả biểu hiện gene chỉ được phân tích riêng rẽ ở từng loài mà không so sánh giữa các loài.

Bảng 2. Sự biểu hiện của các gene CAX trong các mô sinh dưỡng và sinh sản ở cây đậu tương (*G. max*)

Gene	YL	R	N	F	P (7*)	P (10*)	P (14*)	S (10*)	S (14*)	S (21*)	S (25*)	S (28*)	S (35*)	S (42*)
<i>GmCAX1</i>	2	20	56	6	20	0	0	93	115	22	28	11	20	4
<i>GmCAX2</i>	9	5	20	21	23	27	27	2	0	0	20	27	28	6
<i>GmCAX3</i>	18	0	3	8	0	7	13	7	5	5	34	26	118	85
<i>GmCAX4</i>	1	22	236	2	9	3	0	34	50	18	39	27	109	118
<i>GmCAX5</i>	15	51	22	28	15	15	9	7	14	7	13	12	29	10
<i>GmCAX6</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>GmCAX7</i>	952	89	19	1847	1426	1682	993	209	159	47	36	23	30	7
<i>GmCAX8</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>GmCAX9</i>	6	0	1	6	6	4	5	2	2	0	0	2	2	0
<i>GmCAX10</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>GmCAX11</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>GmCAX12</i>	92	151	67	81	81	78	91	32	35	20	34	29	66	21
<i>GmCAX13</i>	7	1	7	12	9	15	15	0	0	1	8	9	11	2
<i>GmCAX14</i>	84	143	36	121	95	130	132	28	40	14	37	20	60	43
<i>GmCAX15</i>	2	1	9	9	13	14	14	2	0	0	5	7	8	0
<i>GmCAX16</i>	31	22	10	11	23	19	23	24	10	4	6	6	10	3
<i>GmCAX17</i>	1301	3	1	2164	1361	1436	708	190	132	31	13	4	10	4

Chú thích: YL = lá non; F = hoa; P = vỏ quả; S = hạt; R = rễ; N = nốt sần; * = ngày sau thụ phấn; nd = không xác định

Ở cây đậu tương, bốn gene *GmCAX6*, *GmCAX8*, *GmCAX10* và *GmCAX11* không có phiên mã ở tất cả các mô nghiên cứu. Ở lá, hai gene *GmCAX7* và *GmCAX17* biểu hiện mạnh hơn so với các gene còn lại. Đây cũng là hai gene biểu hiện ưu thế ở hoa, vỏ quả và hạt non. *GmCAX12* và *GmCAX14* là hai gene

biểu hiện mạnh hơn các gen khác ở mô rễ trong khi gene *GmCAX4* biểu hiện ưu thế hơn các gen khác ở nốt sần. Kết quả này gợi ý về vai trò quan trọng của một số gene đặc hiệu ở các mô khác nhau như *GmCAX7* và *GmCAX17* ở lá, hoa và quả hay gene *GmCAX4* ở rễ.

Bảng 3. Sự biểu hiện của các gene CAX trong các mô sinh dưỡng và sinh sản ở cây cỏ ba lá thập tự (*M. truncatula*)

Gene	L	Pe	VB	St	R	N (10D)	N (14D)	N (20D)	N (28D)	F	P	S (10*)	S (12*)	S (16*)	S (20*)	S (24*)	S (36*)
<i>MtrCAX1</i>	315	475	364	473	545	266	231	160	432	340	535	299	221	293	281	247	242
<i>MtrCAX2</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>MtrCAX3</i>	26	43	30	27	133	39	37	36	29	41	40	132	173	478	841	921	339
<i>MtrCAX4</i>	915	676	443	401	10	9	10	11	10	131	1196	27	55	81	90	110	90
<i>MtrCAX5</i>	1593	4375	1198	2001	410	148	65	113	99	2215	2675	1269	857	893	621	575	452

Chú thích: L = lá, Pe = cuống lá; VB = chồi sinh dưỡng; St = thân; R = rễ; N = nốt sần; F = hoa; P = vỏ quả; S = hạt; D = ngày; * = ngày sau thụ phấn; nd = không xác định

Ở cây cỏ ba lá thập tự, ngoại trừ gene *MtrCAX2* không có phiên mã tương ứng được phát hiện, các gene còn lại biểu hiện ở tất cả các mô nghiên cứu. Trong số các gene *CAX* của loài này, gene *MtrCAX5* biểu hiện ưu thế ở lá, cuống lá, chồi, thân (mô sinh dưỡng) và ở hoa, quả và hạt (mô sinh sản), ngoại trừ ở giai đoạn 20 ngày và 24 ngày sau thụ phấn. Ở hai pha phát triển của hạt này, gene biểu hiện mạnh nhất

là *MtrCAX3*. Trong khi đó, gene biểu hiện mạnh nhất ở rễ và nốt sần là gene *MtrCAX1*.

Cả ba gene *CAX* của cây đậu đại biểu hiện ở tất cả các mô nghiên cứu. *LjCAX2* là gene biểu hiện ưu thế so với hai gene còn lại ở đa số các mô, ngoại trừ ở rễ và nốt sần. Ở rễ và nốt sần, gene *LjCAX3* biểu hiện ưu thế so với hai gene còn lại.

Bảng 4. Sự biểu hiện của các gene *CAX* trong các mô sinh dưỡng và sinh sản ở cây đậu đại (*L. japonicus*)

Gene	L	Pe	St	R	N (0D)	N (21D)	F	P (10*)	P (14*)	P (20*)	S (10*)	S (12*)	S (14*)	S (16*)	S (20*)
<i>LjCAX1</i>	22	89	509	16	18	17	190	120	83	153	20	20	19	23	175
<i>LjCAX2</i>	6978	3168	2491	187	113	195	1391	713	692	1068	965	572	359	497	1402
<i>LjCAX3</i>	258	363	449	742	834	449	205	194	225	138	203	257	258	269	145

Chú thích: L = lá, Pe = cuống lá; St = thân; R = rễ; N = nốt sần; F = hoa; P = vỏ quả; S = hạt; D = ngày; * = ngày sau thụ phấn; nd = không xác định

Bảng 5. Sự biểu hiện của các gene *CAX* trong các mô sinh dưỡng và sinh sản ở cây đậu gà (*C. arietinum*)

Gene	B	L	R	FB	P
<i>CaCAX1</i>	53,6	46,5	82,6	69,3	47,6
<i>CaCAX2</i>	53,6	0	0	25,9	43,9
<i>CaCAX3</i>	411,3	309,8	23,6	791,3	395,4
<i>CaCAX4</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>CaCAX5</i>	nd	nd	nd	nd	nd

Chú thích: B = chồi; L = lá, R = rễ; N = nốt sần; FB = nụ hoa; P = vỏ quả; nd = không xác định

Ở cây đậu gà, chỉ hai gene *CaCAX1* và *CaCAX3* biểu hiện ở tất cả các mô. Ngược lại, không xác định được sự biểu hiện của hai gene *CaCAX4* và *CaCAX5*. Riêng gene *CaCAX2* chỉ biểu hiện ở chồi, nụ hoa và

quả. Khi so với các gene trong họ, *CaCAX3* biểu hiện mạnh nhất ở các mô chồi, lá, nụ hoa và quả trong khi gene *CaCAX1* biểu hiện mạnh nhất ở rễ

Bảng 6. Sự biểu hiện của các gene *CAX* trong các mô sinh dưỡng và sinh sản ở cây đậu cove (*P. vulgaris*)

Gene	YL	YS	ST	RT	YR	R5	N5	FY	PY	PH	P1	P2	SH	S1	S2
<i>PvCAX1</i>	19	35	32	41	31	40	30	24	6	41	21	43	23	17	17
<i>PvCAX2</i>	5	7	12	5	8	5	4	7	3	10	3	6	7	4	3
<i>PvCAX3</i>	0	19	2	0	2	7	8	1	0	2	2	0	0	1	2
<i>PvCAX4</i>	404	237	188	9	21	79	11	272	71	359	88	43	126	31	25
<i>PvCAX5</i>	2	127	13	0	11	50	51	9	1	17	14	2	2	8	13
<i>PvCAX6</i>	6	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1	0	6	8	7

Chú thích: (YL=Mô lá của cây ở giai đoạn lá chết thứ 2 hoàn chỉnh của cây đã được bón phân; YS=Tất cả các lông thân phía trên lá mầm của cây ở giai đoạn lá chết thứ hai; ST=Chồi bao gồm mô phân sinh đỉnh của cây ở giai đoạn lá chết thứ hai; RT=Chóp rễ thu từ cây được tưới phân ở giai đoạn hai lá chết; YR=Rễ hoàn chỉnh thu từ cây được tưới phân ở giai đoạn hai lá chết; R5 = Rễ hoàn chỉnh loại bỏ nốt sần trước cố định ở thời điểm 5 ngày; N5=Nốt sần trước cố định (hữu hiệu) được thu sau 5 ngày ủ; FY=Hoa non; PY= Vô quả non ở giai đoạn 1-4 ngày sau rụng hoa, mẫu chứa các phôi đang phát triển ở giai đoạn hình cầu; PH=Vỏ của quả dài gần 9 cm, hạt ở giai đoạn hình tim; P1=Vỏ của quả dài gần 10-11 cm, hạt ở giai đoạn 1; P2=Vỏ của quả dài gần 12-13 cm, hạt ở giai đoạn 2; SH=Hạt ở giai đoạn hình tim; S1=Hạt ở giai đoạn 1; S2=Hạt ở giai đoạn 2).

Ở cây đậu cove, tất cả các gene đều biểu hiện ở ít nhất một loại mô nghiên cứu. Trong số các gene *CAX* của cây đậu cove, gene *PvCAX4* biểu hiện mạnh hơn các gen khác ở hầu hết các mô sinh dưỡng và mô sinh sản, ngoại trừ ở chóp rễ, rễ mang nốt sần (RT và YR) và nốt sần (N5). Có thể, gene này có vai trò ưu thế so với các gene khác trong họ *CAX*. Hai gene *PvCAX1* và *PvCAX2* biểu hiện ở tất cả các mô nghiên cứu, trong đó gene *PvCAX1* biểu hiện mạnh hơn các gene khác trong họ ở chóp rễ cũng như rễ hoàn chỉnh (YR). Gene *PvCAX5* chỉ không biểu hiện ở chóp rễ, nhưng lại biểu hiện mạnh hơn các gene khác ở nốt sần và ở thân..

Đối với cây đậu triều (*C. cajan*), không có EST tương ứng của gene *CAX* nào được phát hiện trong ngân hàng EST hiện có của loài này.

Đến nay, sự biểu hiện của các gene *CAX* ở thực vật còn chưa được nghiên cứu nhiều. Các *CAX* ở thực vật được cảm ứng biểu hiện bởi một số tác nhân như lạnh, muối hoặc canxi ngoại sinh [31]. Ở *A. thaliana*, có hiện tượng gene *CAX1* biểu hiện mạnh ở chồi nhưng biểu hiện yếu ở rễ. *CAX3* lại biểu hiện chủ yếu ở rễ mà không biểu hiện yếu ở lá. Trong khi nhiều *CAX* biểu hiện ở hoa [33]. Ở cây dương, họ *CAX* biểu hiện yếu ở rễ [11]. Những dữ liệu ít ỏi này phù hợp với sự biểu hiện của các *CAX* ở các loại mô khác nhau của các loài thuộc họ Đậu trong nghiên cứu này.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, 42 gene mã hóa các protein trao đổi cation trong hệ gene của sáu loài cây họ Đậu đã được xác định, gồm các loài đậu tương (17

gene), đậu Cove và đậu triều (cùng 6 gene), Cỏ ba lá thập tự và đậu gà (5 gene), và đậu đại (3 gene). Các gene *CAX* của cây họ Đậu có kích thước không giống nhau ở trong khoảng 1213 đến 11561 bp, chứa nhiều intron (4–11 intron). Phần lớn các protein *CAX* suy diễn (39/42 protein) có tính acid với pI nhỏ hơn 7. Các protein *CAX* của cây họ Đậu có mang 3-11 vùng xoắn xuyên màng, trong đó có tới 23/42 *CAX* có 11 vùng xoắn xuyên màng. Các *CAX* của cây họ Đậu được chia thành hai nhóm lớn, A và B, mỗi nhóm gồm hai phân nhóm. Các hiện tượng nhân gene *CAX* sau quá trình biệt hóa loài chỉ phát hiện ở cây đậu tương. *L. japonicus* là loài có cả 3 gene *CAX* biểu hiện ở tất cả các mô nghiên cứu. Ngược lại, không phát hiện được sự biểu hiện của các *CAX* ở cây đậu triều. Ở các loài còn lại, mức độ biểu hiện của các gene trong họ *CAX* không giống nhau ở các loại mô, trong đó, có hiện tượng biểu hiện ưu thế của một số gene ở các mô khác nhau như *GmCAX7* và *GmCAX17* ở lá, hoa và quả hay gene *GmCAX4* ở rễ của cây đậu tương, gene *MtrCAX5* ở lá, cuống lá, chồi, thân, hoa, quả và hạt hay gene *MtrCAX1* ở rễ và nốt sần của cây cỏ ba lá thập tự, gene *LjCAX3* ở rễ và nốt sần hay gene *LjCAX2* ở các mô còn lại của cây đậu đại, gene *CaCAX3* ở các mô chồi, lá, nụ hoa, quả và gene *CaCAX1* ở rễ của cây đậu gà, gene *PvCAX4* ở hầu hết các mô cũng như gene *PvCAX5* ở nốt sần và thân của cây đậu cove.

Lời cảm ơn: công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ chương trình nghiên cứu khoa học cơ bản của Trường Đại học Hùng Vương.

Metal transporter encoding gene families in Fabaceae: II. Cation/H⁺ exchanger (CAX) encoding genes

• Cao Phi Bang

Hung Vuong University–Phu Tho

• Le Thi Van Anh

Institute of Biotechnology–Vietnam Academy of Science and Technology

ABSTRACT

The plant Cation/H⁺ exchangers (CAX) proteins belong to Ca²⁺/cation antiporter (CaCA) superfamily. By using in silico methods, the CAX encoding genes in the genome of six legume species have been identified in this work. In examined legume genomes, the CAX genes belong to a small multigenic family. The number of the CAX genes in these legume species is 17 (soybean), 6 (common bean and *C. cajan*), 5 (*M. truncatula* and *C. arietinum*) and 3 genes (*L. japonicus*), respectively. The legume CAX genes vary in genomic full-length ranging from 1,213 to 11,561 base pairs. All of the genes exhibit introns (from 4 to 11 introns). Their deduced full-length protein sequences range from 248 to 718 amino acids. Theoretical pI values of most (39/42) of legume CAX proteins were less than 7. The secondary structure modelling of protein exhibit transmembrane

helix region (from 3 to 11 regions). Half of all (23/42) included 11 transmembrane helix regions. Based on phylogeny analysis, all of the legume CAX were divided into two groups, A and B, each consisting of two subgroups. The phylogeny suggested an ancient gene duplication in the genome of legumes ancestry. The recent gene duplication even was only detected in the soybean genome after the speciation. The expression analysis showed that all of 3 *L. japonicus* CAX genes expressed in all examined tissues. However, the expression of *C. cajan* CAX genes was not detected. For each of 4 remaining legumes, the CAX genes were differed in their expression level depending on studied tissues. The tissue-specific expressions of some CAX genes were observed in 5 out of the 6 legume species, except *C. cajan*.

Keywords: Cation exchangers (CAX) proteins, Fabaceae, phylogeny, gene expression, gene characterisation

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. T. Kamiya, M. Maeshima, Residues in internal repeats of the rice cation/H⁺ exchanger are involved in the transport and selection of cations, *J Biol Chem*, 279, 1, 812–9 (2004).
- [2]. T. Shigaki, I. Rees, L. Nakhleh, K.D. Hirschi, Identification of three distinct phylogenetic groups of CAX cation/proton antiporters, *J. Mol. Evol.*, 63, 6, 815–25 (2006).
- [3]. T. Shigaki, B.J. Barkla, M.C.M. Vergara, J. Zhao, O. Pantoja, K.D. Hirschi, Identification of a crucial histidine involved in metal transport activity in the Arabidopsis cation/H⁺ exchanger

- CAX1, *J.Biol. Chem.*, 280, 34, 30136–42 (2005).
- [4]. G.M. Shen, Q.Z. Du, J.X. Wang, Involvement of Plasma Membrane $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Antiporter in Cd^{2+} Tolerance, *Rice Science*, 19, 2, 161–165 (2012).
- [5]. G.Z. Luo et al., A putative plasma membrane cation/proton antiporter from soybean confers salt tolerance in *Arabidopsis*, *Plant Mol Biol*, 59, 5, 809–20 (2005).
- [6]. S.J. Conn et al., Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 23, 1, 240–57 (2011).
- [7]. D. Cho et al., Vacuolar CAX1 and CAX3 influence auxin transport in guard cells via regulation of apoplastic pH, *Plant Physiol*, 160, 3, 1293–302 (2012).
- [8]. K.D. Hirschi, Expression of *Arabidopsis* CAX1 in tobacco: altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity, *Plant Cell*, 11(11) 2113–22 (1999).
- [9]. K.D. Hirschi, V.D. Korenkov, N.L. Wilganowski, G.J. Wagner, Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance, *Plant Physiol*, 124, 1, 125–33, (2000).
- [10]. M. Manohar, T. Shigaki, K.D. Hirschi, Plant cation/ H^{+} exchangers (CAXs): biological functions and genetic manipulations, *Plant Biol* (Stuttg), 13, 4, 561–9 (2011).
- [11]. A. Migeon et al., Genome-wide analysis of plant metal transporters, with an emphasis on poplar, *Cell Mol Life Sci.*, 67, 22, 3763–84 (2010).
- [12]. J. Schmutz et al., Genome sequence of the palaeopolyploid soybean, *Nature*, 463, 7278, 178–183 (2010).
- [13]. J. Schmutz et al., A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications, *Nat Genet*, 46, 7, 707–713 (2014).
- [14]. M. Jain et al., A draft genome sequence of the pulse crop chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Plant J.*, 74, 5, 715–29 (2013).
- [15]. N.K. Singh et al., The first draft of the pigeonpea genome sequence, *J. Plant Biochem Biotechnol*, 21, 98–112 (2012).
- [16]. R.K. Varshney et al., Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers, *Nat. Biotech.*, 30, 1, 83–89 (2012).
- [17]. N.D. Young et al., The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses, *Nature*, 480, 7378, 520–524 (2011).
- [18]. V. Krishnakumar et al., MTGD: The Medicago truncatula genome database, *Plant Cell Physiol*, 56, 1 (2015).
- [19]. S. Sato et al., Genome Structure of the Legume, *Lotus japonicus*, *DNA Res.*, 15, 4, 227–39 (2008).
- [20]. K.D. Hirschi, R.G. Zhen, K.W. Cunningham, P.A. Rea, G.R. Fink, CAX1, an $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ antiporter from *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 93(16) 8782–6 (1996).
- [21]. L.T.V. Anh, C.P. Bằng, Các họ gen mã hóa protein vận chuyển kim loại ở cây họ Đậu (Fabaceae): I. Các gen mã hóa protein vận chuyển đồng (Cu^{2+}), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13, 3, 895–905 (2015).
- [22]. E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, M. R. Wilkins, R. D. Appel, and A. Bairoch, Protein identification and analysis tools on the ExPASy server, in *The proteomics protocols handbook*: Springer, 571–607 (2005).
- [23]. L.J. McGuffin, K. Bryson, D.T. Jones, The PSIPRED protein structure prediction server, *Bioinformatics*, 16, 4, 404–5 (2000).
- [24]. A.J. Severin et al., RNA-Seq Atlas of Glycine max: a guide to the soybean transcriptome, *BMC Plant Biol.*, 10, 160 (2010).
- [25]. J. O'Rourke et al., An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean, *BMC Genomics*, 10.1186/1471–2164–15–866, 15, 1, 866 (2014).

- [26]. J. He et al., The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server, *BMC Bioinformatics*, 10, 441 (2009).
- [27]. J. Verdier et al., Establishment of the *Lotus japonicus* gene expression Atlas (LjGEA) and its use to explore legume seed maturation, *Plant J.*, 74 (2) 351–62 (2013).
- [28]. V.K. Singh, M. Jain, Transcriptome profiling for discovery of genes involved in shoot apical meristem and flower development, *Genomics Data*, 2, 0, 135–138 (2014).
- [29]. S. Pradhan, N. Bandhiwal, N. Shah, C. Kant, R. Gaur, S. Bhatia, Global transcriptome analysis of developing chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds, *Front Plant Sci*, 5 (2014).
- [30]. N.L. Raju et al., The first set of EST resource for gene discovery and marker development in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.), *BMC Plant Biol.*, 10, 45 (2010).
- [31]. T. Shigaki, K.D. Hirschi, Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H⁺ exchangers in plants, *Plant Biol* (Stuttg), 8, 4, 419–29 (2006).
- [32]. J.K. Pittman, K.D. Hirschi, Phylogenetic analysis and protein structure modelling identifies distinct Ca²⁺/Cation antiporters and conservation of gene family structure within Arabidopsis and rice species, *Rice*, 9, 1, 3, (2016).
- [33]. N.H. Cheng et al., Functional association of Arabidopsis CAX1 and CAX3 is required for normal growth and ion homeostasis, *Plant Physiol*, 138, 4, 2048–60 (2005).