

PHÂN TÍCH TỔNG QUÁT DỰA TRÊN HỆ GEN HỌC CỦA HỌ GEN *RBOH* Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG [(*GLYCINE MAX* L. MERR.)]

Ông Đăng Quang^{1,2}, Nguyễn Phương Thảo², ✉

¹Viện Kỹ Thuật Công Nghệ Cao NTT, Đại học Nguyễn Tất Thành, Thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Quốc Tế, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: npthao@hcmiu.edu.vn

Ngày nhận bài: 26.12.2016

Ngày nhận đăng: 20.8.2017

TÓM TẮT

Biến đổi khí hậu là một vấn đề cấp thiết đang được quan tâm không chỉ ở Việt Nam mà trên toàn thế giới bởi ảnh hưởng của nó ở nhiều mặt khác nhau, đặc biệt là tác động xấu đến sự phát triển bền vững của nền nông nghiệp. Trong bối cảnh đó, năng suất và sự ổn định của sản lượng các giống cây trồng bị ảnh hưởng xấu bởi các stress phi sinh học, như hạn hán, nhiễm mặn, nhiệt độ cao, ngập úng và các chất ô nhiễm. Gần đây, họ gen *Rboh* (respiratory burst oxidase homologs) ở thực vật được chứng minh là có liên quan trực tiếp đến rất nhiều đường dẫn truyền tín hiệu khi cây đối mặt với các stress phi sinh học. Bài nghiên cứu này áp dụng phương pháp phân tích tổng quan dựa trên hệ gen học (genome-wide characterization) cho họ gen *Rboh* trên hệ gen của cây đậu tương [(*Glycine max* L. Merr.)]. Sử dụng trình tự hệ gen chất lượng cao, chúng tôi đã xác định được 17 gen *Rboh* ở cây đậu tương. Các gen *Rboh* này phân bố khá đồng đều trải dài trên 14 trong tổng số 20 nhiễm sắc thể của cây đậu tương. Số lượng gen *GmRboh* gần như gấp đôi ở các loài thực vật (đã được khảo sát họ gen *Rboh*) là kết quả từ sự tiến hóa trong hệ gen của cây đậu tương. Phân tích cây phát sinh loài cho thấy các gen *Rboh* của đậu tương được chia thành sáu nhóm, và ở mỗi nhóm, cấu trúc gen và sự phân bố các vùng chức năng có tính bảo tồn cao. Ngoài ra, phân tích biểu hiện gen dựa trên dữ liệu RNA-seq có thể nhận thấy 17 gen *Rboh* của đậu tương biểu hiện khác biệt nhau trên 14 mẫu mô và biểu hiện nhiều nhất ở rễ và nốt sần. Cuối cùng, kết quả từ bài nghiên cứu này đóng góp các dữ liệu nền tảng quan trọng cho các công trình phân tích chuyên sâu họ gen *Rboh* trên cây đậu tương trong tương lai.

Từ khóa: Cây phát sinh loài, cấu trúc gen, đậu tương, *Rboh*, stress phi sinh học, RNA-seq

GIỚI THIỆU

Các loại oxy hoạt hóa (Reactive Oxygen Species - ROS) đóng nhiều vai trò trong việc truyền tín hiệu trong một phạm vi rộng của các sinh vật, bao gồm cả vi khuẩn, động vật có vú, và cũng được biết đến để kiểm soát cơ chế tế bào khác nhau ở thực vật. Thật vậy, ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy ROS là chìa khóa cho các quá trình trao đổi chất cơ bản ở thực vật như sự tăng trưởng tế bào (Foreman *et al.*, 2003; Mittler *et al.*, 2004), và phản ứng trước sự hiện diện của stress phi sinh học (Apel, Hirt, 2004; Torres, Dangl, 2005).

Trong số các nguồn sản xuất ROS khác nhau ở thực vật, NADPH oxidase (NOX) là nhóm protein được nghiên cứu nhiều nhất. Ngày càng nhiều bằng chứng chứng minh rằng NADPH oxidase hoạt động như các nút tín hiệu chủ chốt trong mạng lưới hoạt

động liên quan đến ROS của thực vật. Hơn thế nữa, NADPH oxidase còn tích hợp các con đường truyền tín hiệu ROS, báo hiệu và dẫn truyền trung gian đến nhiều quá trình sinh học quan trọng, bao gồm tăng trưởng tế bào và phát triển cây trồng, các phản ứng của cây đối với stress phi sinh học và các vi khuẩn cộng sinh gây bệnh khác (Torres, Dangl, 2005; Suzuki *et al.*, 2011; Marino *et al.*, 2012). Họ gen *Rboh* được chứng minh đảm nhận trách nhiệm mã hóa cho protein NADPH oxidase ở thực vật (Torres *et al.*, 1998). Protein mã hóa từ gen *Rboh* đồng dạng ở thực vật này vẫn giữ phần lớn cấu trúc và các vùng chức năng tương tự với gen đồng dạng mammalian *gp91^{phox}* ở động vật có vú. Tuy nhiên, vẫn có sự khác biệt, cụ thể, ở thực vật, chuỗi amino acid vùng đầu N của protein này được mở rộng. Phần mở rộng này chứa hai vùng liên kết canxi (EF-hands), đây được cho rằng là vùng điều hòa trực tiếp của protein này khi có tương tác với Ca^{2+} (Torres, Dangl, 2005).

Họ gen *Rboh* vẫn đang được nghiên cứu nhiều nhất ở cây *Arabidopsis*, khi các thành viên trong họ gen này đóng vai trò cốt yếu trong việc đảm bảo thể trạng và các hoạt động trao đổi chất của cây. Một nhóm nhà khoa học đã xác định có 10 thành viên trong họ gen *Rboh* trong hệ gen của *Arabidopsis*. Nổi bật trong 10 thành viên của họ gen *AtRboh*, *AtRbohD* và *AtRbohF* cho thấy biểu hiện ở tất cả các loại mô của cây, trong khi các gen khác chỉ biểu hiện ở một số loại mô nhất định (Sagi, Fluhr, 2006). Hơn thế nữa, hai gen này còn tham gia vào đường truyền tín hiệu ABA của tế bào bảo vệ (guard cell) và là hai gen tiên quyết điều hòa quá trình tích tụ ROS khi thực vật kích hoạt phản ứng phòng vệ (Kwak *et al.*, 2003). Ngoài ra, chỉ với *AtRbohD* đã có thể điều phối nhanh chóng các hệ thống tín hiệu tâm xa giữa các tế bào, khi thực vật kích hoạt khả năng tự vệ trước các kích thích đa dạng từ bên ngoài như nhiệt độ cao, rét, ánh sáng cường độ cao và nhiễm mặn (Miller *et al.*, 2009).

Sau phát hiện ban đầu ở cây *Arabidopsis*, gen *Rboh* lần lượt được xác định từ các loài thực vật khác, bao gồm cà chua (Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001; Sagi *et al.*, 2004), thuốc lá (Simon-Plas *et al.*, 2002; Yoshioka *et al.*, 2003; Asai *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009), khoai tây (Yoshioka *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2007), ngô (Lin *et al.*, 2009), dưa hấu (Si *et al.*, 2010), lúa mạch (Trujillo *et al.*, 2006; Lightfoot *et al.*, 2008), *Medicago truncatula* (Marino *et al.*, 2011) và *lepidium sativum* (Müller *et al.*, 2012). Đáng chú ý hơn, trong số chín gen *Rboh* của cây lúa (*Oryza sativa*), *OsRbohA* đã được tìm thấy có khả năng biểu hiện để đáp ứng với các điều kiện môi trường khác nhau (Wang *et al.*, 2013), *OsRbohA* đặc biệt phản ứng với hạn hán và sự biểu hiện mạnh của gen này giúp tăng cường khả năng chịu hạn của cây (Wang *et al.*, 2016). Mặc dù các cơ chế phức tạp vẫn chưa được giải thích cụ thể, các nhà khoa học cho thấy rằng những thay đổi trong biểu hiện của *OsRbohA* dẫn đến việc giảm khả năng chịu đựng của cây trồng để stress khô hạn (Wang *et al.*, 2016). Các nghiên cứu còn chỉ ra khi *OsRbohA* bị suy yếu, nó làm giảm lượng ROS nội bào, một yếu tố quan trọng để kích hoạt các yếu tố kháng stress và ngược lại (Kobayashi *et al.*, 2007).

Từ các kết quả nghiên cứu đã được công bố có thể khẳng định tầm quan trọng của họ gen *Rboh* đối với khả năng phản ứng stress của thực vật. Tuy nhiên, cho đến nay, chưa có một nghiên cứu đánh giá chức năng của họ gen này ở cây đậu tương (*Glycine max*). Đậu tương là một trong những cây

lượng thực quan trọng trên toàn cầu, nằm trong nhóm cây họ đậu (legumes). Hệ gen hoàn chỉnh của cây đậu tương đã được công bố, tạo điều kiện thuận lợi cho nghiên cứu đánh giá tổng quát dựa trên hệ gen học (genome-wide characterization) đối với các gen *GmRboh*. Trong báo cáo này, các kết quả đưa ra nhằm nhận diện họ gen *GmRboh* của cây đậu tương, và phân tích về cấu trúc exon-intron, đánh giá mối quan hệ dựa trên cây phát sinh loài giữa các gen *Rboh* của đậu tương và cây *Arabidopsis*. Sau cùng, phân tích tích mô hình biểu hiện của họ gen *Rboh* trong quá trình phát triển của cây đậu tương được thực hiện dựa trên dữ liệu hệ phiên mã (RNA-seq) nhằm dự đoán chức năng của các gen *GmRboh* này. Các dữ liệu công bố trong bài nghiên cứu này sẽ là nền tảng vững chắc cho các nghiên cứu chuyên sâu trong tương lai để phát triển giống cây đậu tương chống chịu stress phi sinh học, đặc biệt là stress hạn hán.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Tim kiếm thông tin mở rộng từ các cơ sở dữ liệu họ gen để xác định họ gen *Rboh* ở các cây họ đậu

Phương pháp tìm kiếm BLAST sẽ được tiến hành để thu thập tất cả các protein Rboh tiềm năng từ cây đậu tương. Tim kiếm Blastp trên hệ gen của đậu tương và đậu cove (*Phaseolus vulgaris*) được thực hiện tại cơ sở dữ liệu Phytozome (v10.0) (Goodstein *et al.*, 2012) (<http://www.phytozome.net>) sử dụng trình tự amino acid của 10 Rboh protein từ *Arabidopsis* (AtRbohA-J) qua cổng thông tin về *Arabidopsis* (<http://www.arabidopsis.org/>) (Rhee *et al.*, 2003). Các truy vấn với một ngưỡng e-value là 0.0. Nếu có nhiều hơn một bản phiên mã tồn tại, phiên bản sơ cấp sẽ được chọn làm đại diện. Những gen *Rboh* giả định thu thập được sẽ được xác nhận bằng cách chọn lọc vùng chức năng tiêu biểu từ công cụ Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) và INTERPRO (Hunter *et al.*, 2009; Punta *et al.*, 2011). Thông tin về các vị trí nhiễm sắc thể của gen *Rboh* sẽ thu được từ cơ sở dữ liệu Phytozome v10.0.

Xây dựng cây phát sinh loài và phân tích cấu trúc gen

Phương pháp phân tích so sánh đa chuỗi của tất cả các chuỗi protein Rboh trên các cây đậu tương, đậu cove với các chuỗi protein *Arabidopsis* Rboh được thực hiện bằng cách sử dụng ClustalX (Larkin *et al.*, 2007) với các thông số mặc định và cây phát

sinh loài sẽ được xây dựng theo phương pháp Neighbor-Joining (N-J) thông qua phần mềm MEGA (V7.0) (<http://www.megasoftware.net/>) (Tamura *et al.*, 2013). Các mức độ tin cậy của các nhóm đơn ngành được ước tính bằng cách sử dụng một phân tích bootstrap 1000 lần. Giá trị bootstrap được hiển thị bên cạnh các nút nhánh. Cấu trúc của các gen *Rboh* được thể hiện bằng cách sử dụng Gene Display Server (Guo *et al.*, 2007), thông qua so sánh các trình tự mã hóa với chuỗi gen tương ứng. Số điểm đồng dạng được tính bằng phần mềm SIAS (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>).

Phân tích các vùng protein bảo tồn của họ gen *Rboh* của đậu tương

Trình tự amino acid của *Rboh* của các cây đậu tương sẽ được phân tích so sánh với mười chuỗi protein *Rboh* của *Arabidopsis* để xác định các vùng protein bảo tồn. Kết quả phân tích chuỗi trình tự protein được trình bày bằng phần mềm Esprit 2.2-ENDscript 1.0 (<http://escript.ibcp.fr/ESPrift/cgi-bin/ESPrift.cgi>) (Robert, Gouet, 2014).

Phân tích biểu hiện gen dựa trên dữ liệu RNA-seq

Mô hình biểu hiện gen của họ gen *Rboh* ở đậu tương được phân tích dựa trên dữ liệu hệ phiên mã (RNA-seq) từ phân tích các mẫu mô/giai đoạn của quá trình phát triển. Dữ liệu biểu hiện gen đã chuẩn hóa (normalized gene expression data, RPKM) được tải về từ cơ sở dữ liệu SoySeq (Severin *et al.*, 2010).

Bảng 1. Các gen *Rboh* của cây đậu tương.

Tên gen	Mã định danh gen phiên bản mới (Wm82.a2.v1)	Mã định danh gen phiên bản cũ (Wm82.a1.v1)	NST*	Vị trí bắt đầu	Vị trí kết thúc	Độ dài gen (bp)	Độ dài ORF (bp)
<i>GmRboh1</i>	Glyma.01G222700	Glyma01g43190	1	55163018	55172994	9977	2784
<i>GmRboh2</i>	Glyma.03G236300	Glyma03g39610	3	43613864	43620694	6831	2658
<i>GmRboh3</i>	Glyma.04G203200	Glyma04g38040	4	47586065	47593249	7185	2787
<i>GmRboh4</i>	Glyma.05G021100	Glyma05g00420	5	1871904	1878678	6775	2463
<i>GmRboh5</i>	Glyma.05G198700	Glyma05g33280	5	38284019	38289957	5939	2697
<i>GmRboh6</i>	Glyma.05G212500	Glyma05g37330	5	39400390	39409178	8789	2826
<i>GmRboh7</i>	Glyma.06G162300	Glyma06g17030	6	13406793	13414094	7302	2826
<i>GmRboh8</i>	Glyma.07G130800	Glyma07g15690	7	15510316	15515154	4839	2580
<i>GmRboh9</i>	Glyma.08G018900	Glyma08g02210	8	1537491	1547018	9528	2826
<i>GmRboh10</i>	Glyma.08G005900	Glyma08g00880	8	479952	485633	5682	2667
<i>GmRboh11</i>	Glyma.09G073200	Glyma09g08470	9	7697529	7708882	11354	2787
<i>GmRboh12</i>	Glyma.10G152200	Glyma10g29280	10	38696013	38703000	6988	2478
<i>GmRboh13</i>	Glyma.11G020700	Glyma11g02310	11	1456226	1467091	10866	2784
<i>GmRboh14</i>	Glyma.15G182000	Glyma15g20120	15	17766334	17781770	15437	2811
<i>GmRboh15</i>	Glyma.17G078300	Glyma17g08610	17	6103499	6110894	7396	2466
<i>GmRboh16</i>	Glyma.19G233900	Glyma19g42220	19	48360813	48367717	6905	2664
<i>GmRboh17</i>	Glyma.20G236200	Glyma20g38000	20	46855413	46862143	6731	2670

Ghi chú: *NST: Nhiễm sắc thể

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhận biết họ gen *Rboh* trên hệ gen của cây đậu tương

Tổng cộng có 17 gen mã hóa cho protein *Rboh* từ hệ gen của cây đậu tương được tìm thấy (Bảng 1).

Dựa trên sự xuất hiện trên bộ nhiễm sắc thể, các gen này được đặt tên theo số thứ tự từ *GmRboh1* đến *GmRboh17*. Kết quả này không đồng nhất với một dữ liệu được công bố trước đây, khi một báo cáo nhận định có 18 gen trong họ gen *Rboh* của đậu tương (Marino *et al.*, 2011). Đối chiếu giữa kết

quả trên và kết quả Blast search mới nhất, 17 gen trong số 18 gen đã được công bố khớp với 17 gen *GmRboh1* đến *GmRboh17*, trừ gen *GmRboh* được cho rằng nằm trên nhiễm sắc thể (NST) thứ 18 trong kết quả trước, hoàn toàn không nằm trong dữ liệu hệ gen mới nhất của đậu tương. Lần kiểm tra thứ hai đã tiến hành bằng cách sử dụng mã định gen phiên bản cũ (Wm82.a1.v1) để tìm kiếm trong hệ gen phiên bản mới (Wm82.a2.v1), kết quả vẫn cho ra đúng 17 gen *GmRboh* kèm theo thông tin về mã định danh gen thay đổi cho phiên bản mới (Bảng 1). Tuy nhiên, việc sử dụng mã định danh gen phiên bản cũ cho gen *Rboh* nằm ở NST thứ 18 (Glyma18g39500, theo bài báo trước) để tìm kiếm trên hệ gen đậu tương phiên bản mới không cho ra kết quả nào. Điều này có thể được giải thích thông qua việc trong công trình nghiên cứu trước đây đã công bố, các nhà khoa học sử dụng hệ gen lắp ráp phiên bản cũ (Wm82.a1.v1), trong khi đó, kết quả khảo sát mới dựa trên hệ gen đậu tương được cập nhật mới nhất (Wm82.a2.v1). Trong hệ gen mới này, các mã định danh cho gen được thay đổi và các lỗi lắp ghép của hệ gen phiên bản trước được sửa đổi. Do đó, kết quả khẳng định số lượng 17 gen *Rboh* ở cây đậu tương dựa trên hệ gen đậu tương phiên bản mới là hoàn toàn đáng tin cậy (Bảng 1).

Các thành viên của họ gen *GmRboh* trong nghiên cứu này phân bố rải đều trên 14 trong tổng số 20 nhiễm sắc thể của hệ gen cây đậu tương (ngoại trừ các nhiễm sắc thể số 2, 12, 13, 14, 16, và 18). Đoạn gen có độ dài nhỏ nhất trong họ *GmRboh* được tìm thấy là *GmRboh8* (4.839 bp) và dài nhất là *GmRboh14* (15.437 bp), trong khi độ dài khung đọc mở (Open Reading Frame, ORF) của cả 17 *GmRboh* gen gần như tương đương với nhau.

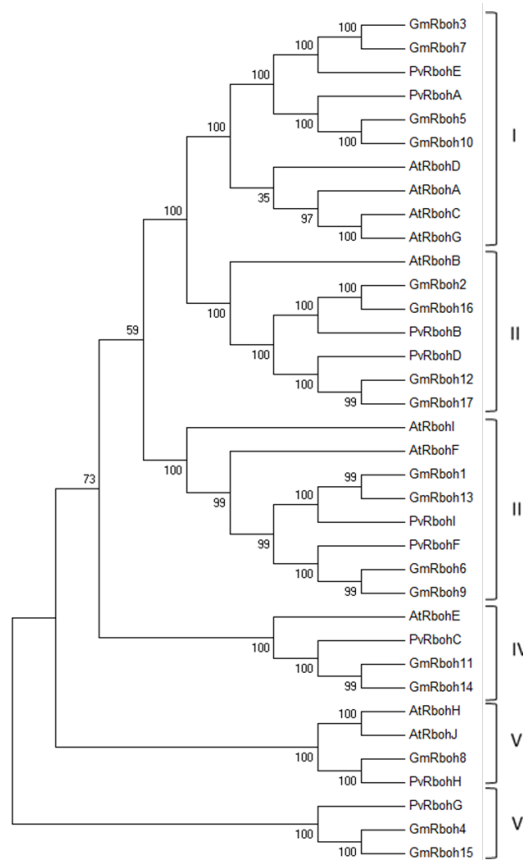
Phân tích cây phát sinh loài và cấu trúc gen của họ gen *GmRboh*

Để phân tích mối quan hệ phát sinh loài giữa các thành viên trong nhóm protein *Rboh* của cây đậu tương, và giữa cây đậu tương cùng một số loài khác, cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên 17 chuỗi protein *GmRboh* hoàn chỉnh của đậu tương, 9 chuỗi *PvRboh* từ đậu cove, 10 chuỗi *AtRboh* từ *Arabidopsis*. Như được trình bày ở hình 1, cây phát sinh loài dựa trên phương pháp neighbor-joining đã chia các chuỗi protein nêu trên thành 6 phân nhánh (I, II, III, IV, V, VI). Ở các phân nhánh từ I đến V đều có các đại diện từ 3 loài thực vật (đậu tương, đậu

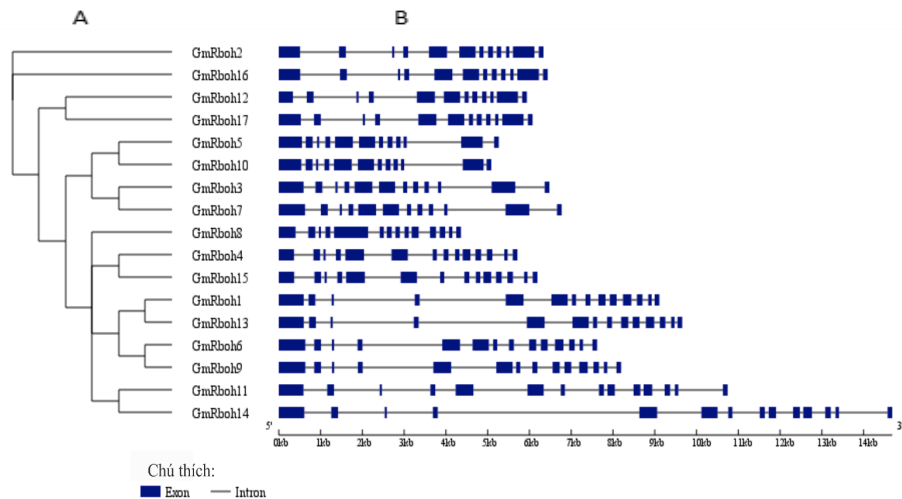
cove và *Arabidopsis*). Tuy nhiên, ở phân nhánh VI thiếu sự hiện diện từ cây *Arabidopsis*. Kết quả này trùng khớp với một nghiên cứu khảo sát trước đây, khi không có đại diện chuỗi *Rboh* từ cây *Arabidopsis* xuất hiện cùng phân nhánh với *GmRboh 4* và *GmRboh15* (Glyma05g00420 và Glyma17g08610, theo thứ tự xuất hiện của mã định danh gen trong nghiên cứu trước) (Marino *et al.*, 2011). Điều này cho thấy sự phân chia rõ rệt trong quá trình tiến hóa giữa cây *Arabidopsis* và các cây họ đậu (trong nghiên cứu này là đậu tương và đậu cove). Có thể dự đoán rằng, hai protein *GmRboh4* và *GmRboh15* thực hiện chức năng riêng biệt chỉ có ở các cây họ đậu. Khả năng này hoàn toàn có thể xảy ra khi sự biểu hiện của *PvRbohB* được chứng minh là cần thiết khi rễ cây đậu cove bị nhiễm khuẩn *Rhizobia* (Montiel *et al.*, 2012). Một nghiên cứu tương tự trên cây họ đậu khác là *Medicago truncatula* cũng cho thấy các nhóm protein *Rboh* của giống cây này tham gia vào quá trình thực hiện chức năng cộng sinh ở nốt sần (Marino *et al.*, 2011).

Dựa vào sự phân bố các gen tương đồng khác loài (orthologous gene) trong cùng một phân nhánh có thể dự đoán chức năng gen mới do một phân nhánh (cluster) của cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên các gen có cấu trúc tương tự và điểm tương đồng cao. Do đó, chức năng của các gen *GmRboh* của cây đậu tương có thể được dự đoán dựa trên việc so sánh với các gen tương đồng từ cây mô hình *Arabidopsis*, khi hệ gen *AtRboh* đã được nghiên cứu chuyên sâu.

Các nghiên cứu đã công bố cho thấy biểu hiện của gen *AtRboh1* được gia tăng dưới tác động của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật như anoxia, cycloheximide, norflurazone và chỉ biểu hiện ở vùng kéo dài của rễ (root elongation zone) (Sagi, Fluhr, 2006). Gen *AtRbohB* chỉ biểu hiện ở mô hạt đang nảy mầm và nghiên cứu cho thấy việc làm mất biểu hiện của gen này ngăn cản quá trình nảy mầm của hạt (Müller *et al.*, 2009). Cuối cùng, chức năng của hai gen *AtRbohD* và *AtRbohF* được tìm thấy có liên quan đến quá trình phòng vệ của thực vật với sâu bệnh và quá trình đóng mở khí khổng khi cây bị tác động bởi các stress phi sinh học (Torres *et al.*, 2002). Các chức năng tương đương của gen tương đồng *GmRboh* của cây đậu tương có thể dự đoán dựa trên các nghiên cứu được nêu trên ở cây *Arabidopsis*, tuy nhiên, các nghiên cứu chuyên sâu hơn cần thực hiện trong tương lai.



Hình 1. Phân tích cây phát sinh loài giữa các protein Rboh của cây đậu tương và một vài loài thực vật khác. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên các chuỗi protein chức năng Rboh từ cây đậu tương, *Glycine max* (GmRboh), cây đậu cove, *Phaseolus vulgaris* (PvRboh) và cây *Arabidopsis thaliana* (AtRboh). Kết quả cho thấy sự phân chia thành sáu nhóm: I, II, III, IV, V, VI. Các số đỉnh trên các phân nhánh thể hiện giá trị bootstrap.



Hình 2. Cây phát sinh loài (A) và sự phân bố exon-intron (B) của họ gen *GmRboh*. Các vùng exon và intron được thể hiện theo như chú thích.

Một cây phát sinh loài khác được xây dựng chỉ dựa trên các chuỗi *GmRboh* để có một đánh giá sâu hơn về mối quan hệ giữa họ gen này ở cây đậu tương (Hình 2A). Có thể dễ dàng thấy rằng, 17 gen *GmRboh* hiện diện thành các cặp gen, trừ gen *GmRboh8*. Hầu hết các cặp gen này có chỉ số tương đồng (sequence identity) khá cao. Kết quả này gợi ý rằng các cặp gen *GmRboh* ở bảng 2 là các cặp gen đồng giao (paralogous pair). Có tổng cộng 8 cặp gen đồng giao được xác định với số điểm tương đồng từ 90,94% đến 97,30% (Bảng 2). Ngoài ra, cấu trúc gen (sự phân bố exon-intron) của hệ gen *GmRboh* cũng được xác định dựa trên chuỗi phiên mã (coding sequence) và chuỗi DNA tương ứng (Hình 2B). Mô hình exon của các gen *Rboh* ở cây đậu tương không nằm ngoài mô hình chung của đa số họ gen *Rboh* từ các loài thực vật đã được nghiên cứu khi số lượng exon của một gen hoặc là 12 hoặc là 14. Kết quả này khẳng định sự bảo toàn của hệ gen *Rboh* trong mỗi liên hệ tiến hóa giữa các loài thực vật. Hơn thế nữa, dựa vào hình 2, có thể kết luận các cặp gen đồng giao có cấu trúc phân bố exon-intron khá giống nhau và hoàn toàn bằng nhau về số lượng exon. Điển hình là cặp gen *GmRboh11* và *GmRboh14*, mặc dù có sự khác biệt khá lớn giữa độ dài gen, các độ dài các đoạn exon gần như tương đương. Các kết quả trên phù hợp với mệnh đề tiến hóa của cây đậu tương. Các nhà khoa học khẳng định, cây đậu tương trải qua hai quá trình tự nhân đôi hệ gen (genome duplication) trong suốt quá trình tiến hóa (Schmutz *et al.*, 2010). Giả thuyết này có thể dễ dàng được nhìn thấy thông qua việc số lượng gen trong hệ gen *Rboh* của cây đậu tương gần như gấp đôi các cây khác (17 gen *GmRboh*, 9 gen *PvRboh* và 10 gen *AtRboh*).

Bảng 2. Chỉ số tương đồng của các cặp chuỗi protein GmRboh.

Chuỗi 1	Chuỗi 2	SI*
GmRboh2	GmRboh16	97,06%
GmRboh12	GmRboh17	97,57%
GmRboh5	GmRboh10	93,01%
GmRboh3	GmRboh7	90,94%
GmRboh4	GmRboh15	91,09%
GmRboh1	GmRboh13	96,65%
GmRboh6	GmRboh9	97,13%
GmRboh11	GmRboh14	97,30%

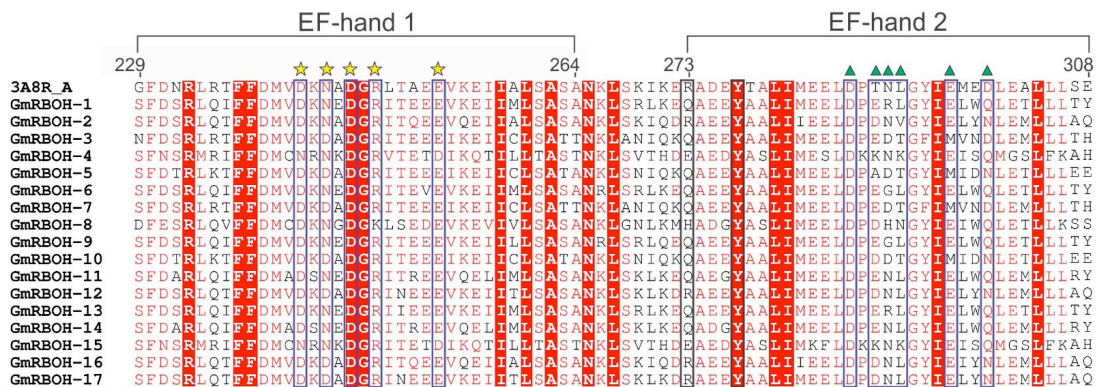
Ghi chú: * SI: sequence identity: Điểm tương đồng

Phân tích chuỗi amino acid và phân bố vùng chức năng của nhóm protein đồng dạng GmRboh

Protein Rboh ở thực vật đã được chứng minh có vùng protein chức năng riêng biệt bao gồm cả khu vực đầu C (C-terminal), vùng đầu N (N-terminal) và sáu vùng xuyên màng (transmembrane) (Vignais, 2002). Đặc biệt, có những tiểu vùng đặc trưng cho vị trí tương tác với FAD, NADPH-ribose và NADPH-adenine trong khu vực đầu C (Yoshida *et al.*, 1998). Khu vực đầu N chứa hai vị trí bám Ca^{2+} được gọi là EF-hands, được biết đến như một vị trí đóng vai trò quan trọng trong việc điều tiết hoạt động của protein Rboh ở thực vật (Wong *et al.*, 2007). Hơn nữa, trong vùng xuyên màng, các vùng xuyên màng thứ ba và thứ năm cũng chứa các cặp dư lượng histidine đã được báo cáo là quan trọng trong các protein gp91phox con người trong quá trình vận chuyển điện tử qua màng tế bào (Finegold *et al.*, 1996). Tất cả 17 chuỗi protein GmRboh trong bài nghiên cứu này được dùng để phân tích sắp xếp thẳng hàng (MSA, multiple sequence alignment) nhằm khảo sát các vùng chức năng nêu trên. Kết quả phân tích MSA cho thấy các vùng chức năng của các thành viên ở nhóm GmRboh của cây đậu tương có tính bảo tồn cao. Trong số đó, bài nghiên cứu này đặc biệt quan tâm đến vùng EF-hands do đây là vùng đảm nhận điều hòa chức năng của protein Rboh ở thực vật. Cấu trúc không gian 3D của vùng này đã được công bố (với mã trên ngân hàng Protein Data Bank (PDB) là: 3A8R-A) cùng phân đoạn đầu N của protein OsRbohB ở cây lúa (Oda *et al.*, 2010). Đây là công bố cấu trúc 3D đầu tiên của protein Rboh trên thực vật. Dựa vào mô hình này có thể xác định chính xác các đơn phân amino acid trong vùng EF-hands chịu trách nhiệm tạo liên kết với Ca^{2+} , hoạt hóa chức năng cho protein Rboh. Hình 3 thể hiện kết quả MSA cho vùng EF-hands của 17 protein GmRboh với đoạn EF-hands trong chuỗi OsRbohB. Vùng EF-hands được chia làm hai phân vùng là EF-hand 1 và EF-hand 2. Các ký hiệu dấu sao đánh dấu các đơn phân amino acid trên đoạn EF-hand 1 của protein OsRbohB tạo liên kết trực tiếp với Ca^{2+} , bao gồm: Asp242, Asp246, Arg248, Asn244, và Glu253 (vị trí các amino acid dựa trên chuỗi OsRbohB). Sáu amino acid được đánh dấu tam giác trên vùng EF-hand 2 của OsRbohB (Asp286, Asn289, Leu290, Gly 291, Glu 294, và Asp297) tuy không tạo liên kết trực tiếp với Ca^{2+} , nhưng đóng vai trò quan trọng trong việc kết hợp với EF-hand 1 hình thành nên cấu trúc không gian tổng thể cho EF-hands nhờ vào các lực liên kết nội (internal interaction) (Oda *et al.*, 2010). Dựa trên các chuỗi EF-hand của OsRbohB, có thể

thấy các đơn phân amino acid tương ứng ở 17 chuỗi GmRboh có sự tương đồng cao, khẳng định đây là các vị trí amino acid quan trọng và được bảo tồn xuyên suốt quá trình tiến hóa. Tuy nhiên, một thành viên (GmRboh8) trong số 17 protein GmRboh có đơn phân hoàn toàn khác biệt với các đơn phân (Lys248) ở vị trí tương ứng với Arg248 của OsRbohB. Nằm ở vị trí 248 trong dãy chuỗi MSA (vị trí các amino acid dựa trên chuỗi OsRbohB), Arg là một trong năm amino acid quan trọng việc tạo liên kết với Ca²⁺. Với sự thay đổi khác biệt ở vị

trí amino acid Lys248, protein GmRboh8 được dự đoán sẽ ảnh hưởng đến cấu hình không gian của vùng EF-hand, từ đó dẫn đến thay đổi trong lực tương tác và liên kết với Ca²⁺. Có thể nhận thấy, GmRboh8 không có gen tương ứng để hình thành cặp gen đẳng giao như các thành viên còn lại của họ Rboh ở đậu tương. Điểm khác biệt này, một lần nữa, không loại trừ khả năng GmRboh8 giữ chức năng riêng biệt trong nhóm protein GmRboh. Các nghiên cứu tiếp theo cần được thực hiện để chứng minh giả thuyết này.



Hình 3. Phân tích MSA ở vùng EF-hand của chuỗi protein GmRboh (đậu tương) và OsRbohB (mã PDB: 3A8R-A, cây lúa). Các đơn phân amino acid có điểm tương đồng cao được thể hiện bằng việc tô đỏ nền đậm. Các đơn phân khác có độ tương đồng thấp hơn được trình bày theo thứ tự điểm tương đồng giảm dần: ký tự màu đỏ > ký tự màu đen. Ký hiệu sao vàng và hình tam giác xanh lá chỉ vị trí của các amino acid đơn phân quan trọng.

Phân tích mô hình biểu hiện gen GmRboh trong quá trình phát triển của cây đậu tương dựa trên dữ liệu RNA-seq

Dữ liệu RNA-Seq của 17 gen GmRboh ở đậu tương được tải về từ cơ sở dữ liệu mở SoySeq (<http://soybase.org/soyseq/>) để phân tích đánh giá biểu hiện gen của họ gen này trên nhiều mô và cơ quan của cây (Bảng 3). Kết quả phân tích RNA-Seq cho thấy họ gen Rboh ở đậu tương biểu hiện tại 14 mô và cơ quan ở các giai đoạn phát triển khác nhau (Bảng 3). Tuy nhiên, chỉ có một vài thành viên trong họ gen GmRboh biểu hiện trên cả 14 mẫu phân tích, đa phần các gen GmRboh biểu hiện trên một vài mô nhất định. Điều này tương tự với các công bố về họ gen AtRboh ở cây Arabidopsis, khi chỉ có hai gen AtRbohD và AtRbohF biểu hiện trên hầu hết các bộ phận của cây, các gen khác như AtRbohH và AtRbohJ chỉ biểu hiện ở bao phấn, các gen AtRboh còn lại chủ yếu biểu hiện ở mô rễ (Zimmermann et al.). Đối với 17 gen GmRboh của cây đậu tương, chỉ có 3 gen có biểu hiện gen cao và xuất hiện trong tất

cả 14 mẫu được kiểm tra, gồm có: GmRboh5, GmRboh7, và GmRboh9. Các gen GmRboh còn lại hầu hết có biểu hiện gen thấp và giới hạn ở một số mẫu. Ở các mô lá, hoa và vỏ đậu, GmRboh3, GmRboh5, GmRboh7, GmRboh9 và GmRboh13 có biểu hiện tương đối cao hơn so với các gen còn lại. Những gen này có thể thực hiện các chức năng đặc hiệu ở các mô lá, hoa và vỏ đậu. Ngược lại, hầu hết các gen trong họ gen GmRboh, trừ GmRboh8, 11, 14, biểu hiện mạnh ở rễ và nốt sần; trong số đó, GmRboh9 và GmRboh12 có các biểu hiện gen cao nhất. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó ở hai loài cây họ đậu khác là Medicago và đậu cove, khi chỉ có một số thành viên gen Rboh cụ thể ở hai giống cây này có biểu hiện gen nổi trội ở rễ và nốt sần (Marino et al., 2011; Montiel et al., 2012). Ở cây Medicago, MtRbohA và MtRbohF đã được chứng minh tham gia vào chuỗi phản ứng sinh học cố định nitrogen ở nốt sần và phát triển kéo dài rễ (Marino et al., 2011). Ở đậu cove, trong số chín gen Rboh công bố, chỉ PvRbohB được chứng minh có liên quan đến tăng trưởng của rễ và cố định Nitrogen

ở nốt sần (Montiel *et al.*, 2012). Những phát hiện này có thể cho thấy chức năng sinh học đặc trưng của họ gen *Rboh* ở rễ và nốt sần, không chỉ đối với cây đậu tương mà còn đối với các cây họ đậu khác.

Bảng 3. Dữ liệu RNA-seq chuẩn hóa của họ gen *GmRboh* trên 14 mẫu mô ở cây đậu tương.

Tên gen	Lá non	Hoa	Vỏ đậu 1cm	Vỏ đậu 10DA F	Vỏ đậu 14DA F	Hạt 10DA F	Hạt 14DA F	Hạt 21DA F	Hạt 25DA F	Hạt 28DA F	Hạt 35DA F	Hạt 42DA F	Rễ	Nốt sần
	(1)	(2)	(3)	(4)*	(5)*	(6)*	(7)*	(8)*	(9)*	(10)*	(11)*	(12)*	(13)	(14)
<i>GmRboh1</i>	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	0	0	4	1
<i>GmRboh2</i>	0	1	0	1	5	0	1	0	2	1	1	0	5	5
<i>GmRboh3</i>	4	3	5	4	6	1	1	1	2	1	3	2	7	5
<i>GmRboh4</i>	0	0	1	1	1	0	1	0	2	1	2	1	4	0
<i>GmRboh5</i>	3	17	6	8	13	2	2	3	4	2	4	4	6	2
<i>GmRboh6</i>	1	1	3	2	2	1	1	2	2	1	5	4	9	1
<i>GmRboh7</i>	9	10	12	11	9	1	2	4	4	2	5	4	8	6
<i>GmRboh8</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>GmRboh9</i>	6	14	11	13	19	3	4	5	6	5	9	5	32	17
<i>GmRboh10</i>	1	1	1	1	1	1	2	3	3	2	4	2	8	1
<i>GmRboh11</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
<i>GmRboh12</i>	0	2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	14	14
<i>GmRboh13</i>	3	5	4	2	4	0	1	1	1	1	1	2	8	1
<i>GmRboh14</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>GmRboh15</i>	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	7	1
<i>GmRboh16</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	2
<i>GmRboh17</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	5

Ghi chú: *DAF(Days After Flowering): số ngày tính từ khi ra hoa

KẾT LUẬN

Trong bài nghiên cứu này, các kết quả đưa ra nhằm đánh giá phân tích tổng quát họ gen *Rboh* ở cây đậu tương dựa trên các cơ sở dữ liệu hệ gen học. Các kết quả cho thấy có tất cả 17 thành viên *GmRboh* trong hệ gen của cây đậu tương. Số lượng gen này gần gấp đôi số lượng gen *Rboh* ở các loài thực vật khác do cây đậu tương trải qua hai chu kỳ nhân đôi hệ gen trong suốt quá trình tiến hóa. Phân tích quan hệ giữa họ gen *Rboh* của cây đậu tương, cây *Arabidopsis*, và đậu cove, dựa trên cây phát sinh loài cho thấy sự phân nhánh có điểm khác biệt giữa hai cây họ đậu và cây *Arabidopsis*. Điều này chứng minh rằng ngoài các chức năng sinh học tương tự với loài thực vật khác, gen *Rboh* có thể thực hiện các chức năng riêng biệt và đặc thù ở cây họ đậu. Tiếp theo, trong phân tích cấu trúc gen và cấu trúc chuỗi protein của 17 gen *GmRboh*, các kết quả cho thấy gen thành viên *GmRboh8* mang nhiều điểm khác biệt so với các thành viên còn lại. Cụ thể, gen *GmRboh8* không nằm trong cặp gen đồng giao với bất kỳ gen nào trong họ gen. Hơn thế nữa, khác biệt

ở một vị trí amino acid quan trọng trong việc tạo liên kết với Ca^{2+} , giúp hình thành nên giả thuyết về chức năng đặc trưng của *GmRboh8*. Cuối cùng, kết quả phân tích từ dữ liệu RNA-seq trên 14 mẫu mô cho thấy biểu hiện gen của họ gen *GmRboh* tập trung ở rễ và nốt sần, trong số đó gen *GmRboh9* và gen *GmRboh12* có biểu hiện cao nhất ở hai vị trí này. Kết quả trên, cùng với các công bố trước đây, một lần nữa củng cố giả thuyết về chức năng đặc trưng của họ gen *Rboh* ở các cây họ đậu. Các dữ liệu công bố trong nghiên cứu này nhằm đóng góp vào cơ sở dữ liệu nền tảng cho nghiên cứu họ gen *Rboh* ở cây đậu tương nói riêng và các cây họ đậu nói chung. Tuy nhiên, các phân tích chuyên sâu hơn cần áp dụng cả công cụ tin sinh học và sinh học phân tử để đánh giá chính xác cơ chế của họ gen *Rboh* tham gia vào quá trình phân vệ của thực vật trước các yếu tố môi trường và các stress phi sinh học.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát Triển khoa học và công nghệ NTTU trong đề tài mã số 2016.01.32.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.
- Asai S, Ohta K, Yoshioka H (2008) MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 20(5): 1390-1406.
- Finegold AA, Shatwell KP, Segal AW, Klausner RD, Dancis A (1996) Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. *J Biol Chem* 271(49): 31021-31024.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422 (6930):442-446.
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucl Acids Res* 40(D1):D1178-D1186.
- Guo A, Zhu Q, Chen X, Luo J (2007) [GSDS: a gene structure display server]. *Yi chuan= Hereditas/Zhongguo yi chuan xue hui bian ji* 29(8): 1023-1026.
- Hunter S, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Binns D, Bork P, Das U, Daugherty L, Duquenne L (2009) InterPro: the integrative protein signature database. *Nucl Acids Res* 37(suppl 1): D211-D215.
- Kobayashi M, Ohura I, Kawakita K, Yokota N, Fujiwara M, Shimamoto K, Doke N, Yoshioka H (2007) Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* 19(3): 1065-1080.
- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JD, Schroeder JI (2003) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J* 22(11): 2623-2633.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
- Lightfoot DJ, Boettcher A, Little A, Shirley N, Able AJ (2008) Identification and characterisation of barley (*Hordeum vulgare*) respiratory burst oxidase homologue family members. *Funct Plant Biol* 35(5): 347-359.
- Lin F, Ding H, Wang J, Zhang H, Zhang A, Zhang Y, Tan M, Dong W, Jiang M (2009) Positive feedback regulation of maize NADPH oxidase by mitogen-activated protein kinase cascade in abscisic acid signalling. *J Exp Bot*: erp157.
- Marino D, Andrio E, Danchin EG, Oger E, Gucciardo S, Lambert A, Puppo A, Pauly N (2011) A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytol* 189(2): 580-592.
- Marino D, Dunand C, Puppo A, Pauly N (2012) A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci* 17(1): 9-15.
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci Signal* 2(84): ra45-ra45.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9(10): 490-498.
- Montiel J, Nava N, Cárdenas L, Sánchez-López R, Arthikala M-K, Santana O, Sánchez F, Quinto C (2012) A *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene is required for root infection by *Rhizobia*. *Plant Cell Physiol* 53(10): 1751-1767.
- Müller K, Carstens AC, Linkies A, Torres MA, Leubner-Metzger G (2009) The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in *Arabidopsis* seed after-ripening. *New Phytol* 184(4): 885-897.
- Müller K, Linkies A, Leubner-Metzger G, Kermode AR (2012) Role of a respiratory burst oxidase of *Lepidium sativum* (cress) seedlings in root development and auxin signalling. *J Exp Bot* 63(18): 6325-6334.
- Oda T, Hashimoto H, Kuwabara N, Akashi S, Hayashi K, Kojima C, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K, Sato M (2010) Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *J Biol Chem* 285(2): 1435-1445.
- Orozco-Cárdenas ML, Narváez-Vásquez J, Ryan CA (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13(1): 179-191.
- Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J (2011) The Pfam protein families database. *Nucl Acids Res*:gkr1065.
- Rhee SY, Beavis W, Berardini TZ, Chen G, Dixon D, Doyle A, Garcia-Hernandez M, Huala E, Lander G, Montoya M (2003) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to *Arabidopsis* biology, research materials and community. *Nucl Acids Res* 31(1): 224-228.
- Robert X, Gouet P (2014) Deciphering key features in

- protein structures with the new ENDScript server. *Nucl Acids Res* 42(W1): W320-W324.
- Sagi M, Davydov O, Orazova S, Yesbergenova Z, Ophir R, Stratmann JW, Fluhr R (2004) Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell* 16(3): 616-628.
- Sagi M, Fluhr R (2006) Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol* 141(2): 336-340.
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463(7278): 178-183.
- Severin AJ, Woody JL, Bolon Y-T, Joseph B, Diers BW, Farmer AD, Muehlbauer GJ, Nelson RT, Grant D, Specht JE (2010) RNA-Seq Atlas of *Glycine max*: a guide to the soybean transcriptome. *BMC Plant Biology* 10(1): 1.
- Si Y, Dane F, Rashotte A, Kang K, Singh NK (2010) Cloning and expression analysis of the *Ccrboh* gene encoding respiratory burst oxidase in *Citrullus colocynthis* and grafting onto *Citrullus lanatus* (watermelon). *J Exp Bot*: e rq031.
- Simon-Plas F, Elmayan T, Blein JP (2002) The plasma membrane oxidase *NtrbohD* is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J* 31 (2):137-147.
- Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R (2011) Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr Opin Plant Biol* 14(6): 691-699.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30(12): 2725-2729.
- Torres MA, Dangl JL (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* 8 (4):397-403.
- Torres MA, Dangl JL, Jones JD (2002) Arabidopsis *gp91phox* homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Nat Acad Sci* 99(1): 517-522.
- Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond-Kosack KE, Jones JD (1998) Six Arabidopsis thaliana homologues of the human respiratory burst oxidase (*gp91phox*). *Plant J* 14(3): 365-370.
- Trujillo M, Altschmied L, Schweizer P, Kogel K-H, Hüchelhoven R (2006) Respiratory burst oxidase homologue A of barley contributes to penetration by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. hordei. *J Exp Bot* 57 (14):3781-3791.
- Vignais P (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59(9): 1428-1459.
- Wang G-F, Li W-Q, Li W-Y, Wu G-L, Zhou C-Y, Chen K-M (2013) Characterization of rice NADPH oxidase genes and their expression under various environmental conditions. *Int J Mol Sci* 14(5): 9440-9458.
- Wang X, Zhang MM, Wang YJ, Gao YT, Li R, Wang GF, Li WQ, Liu WT, Chen KM (2016) The plasma membrane NADPH oxidase *OsRbohA* plays a crucial role in developmental regulation and drought-stress response in rice. *Physiol Plant* 156(4): 421-423.
- Wong HL, Pinontoan R, Hayashi K, Tabata R, Yaeno T, Hasegawa K, Kojima C, Yoshioka H, Iba K, Kawasaki T (2007) Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *Plant Cell* 19 (12): 4022-4034.
- Yoshida LS, Saruta F, Yoshikawa K, Tatsuzawa O, Tsunawaki S (1998) Mutation at histidine 338 of *gp91phox* depletes FAD and affects expression of cytochrome b 558 of the human NADPH oxidase. *J Bio Chem* 273(43): 27879-27886.
- Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, Katou S, Kawakita K, Rowland O, Jones JD, Doke N (2003) Nicotiana benthamiana *gp91phox* homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 15(3): 706-718.
- Yoshioka H, Sugie K, Park H-J, Maeda H, Tsuda N, Kawakita K, Doke N (2001) Induction of plant *gp91phox* homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol Plant Microbe Interact* 14(6): 725-736.
- Zhang H, Fang Q, Zhang Z, Wang Y, Zheng X (2009) The role of respiratory burst oxidase homologues in elicitor-induced stomatal closure and hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana*. *J Exp Bot*: erp146.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem WG Arabidopsis microarray database and analysis toolbox (www.genevestigator.ethz.ch); *Plant Physiol* 2004. doi 10.104.046367.

GENOME-WIDE CHARACTERIZATION OF RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG (*RBOH*) IN SOYBEAN [(*GLYCINE MAX* L. MERR.)]

Ong Dang Quang^{1,2}, Nguyen Phuong Thao²

¹*NTT Hi-tech Institute, Nguyen Tat Thanh University*

²*International University, Vietnam National University, Ho Chi Minh City*

SUMMARY

Plant respiratory burst oxidase homologs (RBOHs), also known as NADPH oxidase (NOX) have involved as a key producers of reactive oxygen species (ROS) in a wide range of biological processes, including plant growth, development, and abiotic stress responses. In this work, a total 17 soybean RBOH encoding genes (*GmRBOHs*) were identified. Furthermore, their domain architecture, chromosomal distribution, gene structure, gene duplication, and phylogenetic analysis were carried out. Phylogenetic tree divided the *RBOHs* from soybean, another legume plants (*Phaseolus vulgaris*), and *Arabidopsis* into six subfamilies, with soybean *RBOH* genes distributed in subfamily I to VI. All RBOH proteins of soybean contained four major domains, which focused on EF-hands domains with Ca²⁺-binding residues provided more insights into function of RBOH proteins in soybean. The differential expression pattern using RNA-seq of 17 *RBOH* genes in soybean indicated that most of the genes express in root and nodule; among them, *GmRboh9* and *GmRboh12* have the highest expression. The analysis presented provides a scientific basis for further research on function of *RBOH* genes in soybean.

Keywords: *abiotic stress, characterization, gen expression, gene structure, protein domain, RNA-seq*