

NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH PROTEIN VÀ PHÂN TÍCH *IN SILICO* MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN CỦA HỌ GEN *CaSWEET* Ở CÂY ĐẬU GÀ (*Cicer arietinum*)

Chu Đức Hà^{1*}, Phùng Thị Vượng^{2,3}, Nguyễn Hà My^{1,2},
Phạm Thị Lý Thu¹, Phạm Phương Thu², La Việt Hồng²

¹Viện Di truyền Nông nghiệp (VAAS), ²Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2,

³Trường THPT Ngô Quyền - Ba Vì, Hà Nội

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, đặc tính cơ bản của họ protein vận chuyển đường sucrose, SWEET (sugars will eventually be exported transporter), đã được phân tích trên cây đậu gà (*Cicer arietinum*). Kết quả đã cho thấy họ *CaSWEET* có kích thước trong khoảng 230 đến 296 axit amin, trọng lượng phân tử đạt 25,67 đến 33,47 kDa. Phân tích các đặc tính hóa sinh đã chỉ ra rằng họ *CaSWEET* có tính kỵ nước, phần lớn các phân tử có giá trị điểm đẳng điện lớn hơn 7 và có tính ổn định trong điều kiện *in vitro*. Dự đoán bằng TargetP cho thấy đa số các *CaSWEET* phân bố ở hệ thống tiết. Các gen *CaSWEET* được khai thác thông tin trong điều kiện thường và stress phi sinh học dựa vào một số cơ sở dữ liệu giải hệ phiên mã. Trong điều kiện thường, hầu hết các gen *CaSWEET* có biểu hiện mạnh ở ít nhất một cơ quan trên cây. Đặc biệt, *CaSWEET19* được xác định là gen có biểu hiện đặc thù ở cả 11 vị trí trong điều kiện thường. Bốn gen *CaSWEET* đã được xác định có mức độ phiên mã đáp ứng với stress mặn và hạn ở mô rễ. Trong đó, gen *CaSWEET05* biểu hiện mạnh nhất trong stress hạn, đạt 2,43 lần so với đối chứng và *CaSWEET17* là gen có đáp ứng với stress mặn, tương ứng 2,17 lần so với đối chứng.

Từ khóa: Đậu gà, *SWEET*, mức độ biểu hiện, đặc tính, tin sinh học

Ngày nhận bài: 04/3/2019; Ngày hoàn thiện: 19/3/2019; Ngày duyệt đăng: 16/4/2019

ANALYSIS OF PROTEIN FEATURES AND *IN SILICO* EXPRESSION PROFILES OF *CaSWEET* GENE FAMILY IN CHICKPEA (*Cicer arietinum*)

Chu Duc Ha^{1*}, Phung Thi Vuong^{2,3}, Nguyen Ha My^{1,2},
Pham Thi Ly Thu¹, Pham Phuong Thu², La Viet Hong²

¹Agricultural Genetics Institute (VAAS), ²Hanoi Pedagogical University 2

³Ngô Quyen Highschool - Ba Vi, Ha Noi

ABSTRACT

In this study, the general characteristics of the sucrose transporters, namely SWEET (sugars will eventually be exported transporter) have been analyzed in the chickpea (*Cicer arietinum*). Our results indicated that the lengths of *CaSWEET*s were varied from 230 to 296 amino acids, while their molecular weights ranged from 25.67 to 33.47 kiloDalton. Next, our analyses of the biochemical features revealed that *CaSWEET*s are hydrophobic, most of them are base (the isoelectric points > 7) and recognized to be stable in the test tube. Our TargetP prediction showed that the majority of *CaSWEET*s could be distributed on the secretory pathway. Of our interest, the expression profiles of *CaSWEET*s were checked in the normal and abiotic stress conditions based on the available transcriptome atlas. In the normal condition, most of *CaSWEET*s were highly expressed in at least one tissue. Interestingly, *CaSWEET19* was noted as the most exclusively expressed gene in the whole 11 tissues in the normal condition. We also found that four *CaSWEET* genes were responsive to drought and salt stresses in root tissues. Among them, *CaSWEET05* was the most up-regulated gene in drought stress (2.43-fold) and *CaSWEET17* was the most induced gene in salt stress (2.17-fold).

Keywords: Chickpea, *SWEET*, expression profile, characteristic, bioinformatics

Received: 04/3/2019; Revised: 19/3/2019; Approved: 16/4/2019

* Corresponding author: Tel: 0983 766070, Email: hachu_amser@yahoo.com

MỞ ĐẦU

Protein vận chuyển đường sucrose SWEET (sugars will eventually be exported transporter) được biết đến như một nhóm protein chức năng tham gia vào nhiều quá trình sinh học quan trọng diễn ra trong tế bào thực vật [1]. Các báo cáo đã chỉ ra rằng SWEET có thể liên quan đến vận chuyển sucrose và được tăng cường tích lũy tại một số bộ phận trên cây [2], từ đó tham gia vào điều hòa quá trình trao đổi chất ở thực vật [3]. Đáng chú ý, các gen mã hóa SWEET đã được chứng minh có đáp ứng với bất lợi môi trường, bao gồm các stress sinh học và phi sinh học [4].

Đến nay, vai trò của các gen mã hóa SWEET liên quan đến đáp ứng stress đã được ghi nhận trên nhiều đối tượng cây trồng như khoai lang (*Ipomoea batatas*) [5], cà chua (*Solanum lycopersicum*) [6] và cải dầu (*Brassica napus*) [4]. Trong nghiên cứu trước đây, 21 thành viên của họ gen mã hóa CaSWEET đã được xác định một cách có hệ thống trên hệ gen cây đậu gà (*Cicer arietinum*) [7]. Phân tích đặc tính đã cho thấy họ gen CaSWEET có cấu trúc bền vững với hầu hết các gen (18 trên 21) chứa 6 exon [7]. Câu hỏi đặt ra là các gen CaSWEET có mức độ biểu hiện đáp ứng ra sao trong điều kiện thường và stress?

Mục đích của nghiên cứu này nhằm tìm hiểu mức độ biểu hiện của các gen CaSWEET trong điều kiện thường và stress phi sinh học dựa trên các cơ sở dữ liệu microarray và RNA-Seq đã công bố. Đồng thời, một số đặc tính cơ bản của protein CaSWEET ở đậu gà được phân tích dựa trên các công cụ trực tuyến. Kết quả của nghiên cứu này sẽ cung cấp những giả thuyết đáng tin cậy cho đánh giá chức năng gen CaSWEET có đáp ứng stress.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Dữ liệu nghiên cứu

Dữ liệu phiên mã (transcriptome) của giống đậu gà desi 'ICC 4958' trong điều kiện thường [8] trên Hệ thống thông tin họ Đậu (Legume

Information System, LIS) (<https://legumeinfo.org/>) [9] và trong điều kiện stress phi sinh học (hạn và mặn) [10].

Trình tự axit amin (aa) của 21 thành viên trong họ CaSWEET được khai thác trong nghiên cứu gần đây [7].

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân tích đặc tính hóa sinh của CaSWEET ở đậu gà: Kích thước và trọng lượng phân tử của CaSWEET được xác định trên BioEDIT [11]. Điểm đẳng điện, độ bất ổn định, độ ưa nước trung bình được tính bằng cách truy vấn trình tự aa của CaSWEET [7] trên ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) [12] tương tự như mô tả trong nghiên cứu trước đây [13].

Phương pháp dự đoán vị trí phân bố nội bào của CaSWEET ở đậu gà: Trình tự aa của CaSWEET [7] được khai thác trên TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) [14] để sàng lọc vùng tín hiệu (signal peptide) đặc trưng cho bào quan, như mô tả trong nghiên cứu gần đây [13].

Phương pháp phân tích in silico biểu hiện của gen CaSWEET trong điều kiện thường: Mã định danh của gen CaSWEET được truy vấn trên LIS [9] để tìm kiếm biểu hiện của gen tại các mẫu mô ở đậu gà trong điều kiện thường [8]. Trong đó, 11 mẫu mô được thu thập trên các bộ phận của cây đậu gà giống desi 'ICC 4958' bao gồm cây non đang nảy mầm (germinating seedlings, GS), lá non (young leaves, YL), mô phân sinh đỉnh chồi (shoot apical meristems, SAM), nụ hoa ở các giai đoạn (flower buds 1 ÷ 4, FB1 ÷ 4), hoa ở các giai đoạn phát triển (flower 1 ÷ 4, FL1 ÷ 4) [8]. Các gen CaSWEET được sắp xếp dựa vào cây phân loại thiết lập bằng phương thức Neighbor-Joining trên MEGA [15].

Phương pháp phân tích in silico biểu hiện của gen CaSWEET trong điều kiện stress: Mã định danh của CaSWEET được sử dụng để phân tích mức độ đáp ứng của gen trong rẽ

của cây *C. arietinum* 'ICC 4958' xử lý hạn (GSE70274) và mặn (GSE70377) [10]. Thuật toán tính mức độ phiên mã của các gen *CaSWEET* được phân tích dựa trên mô tả trong nghiên cứu trước đây [13].

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Kết quả phân tích đặc tính hóa sinh của CaSWEET ở C. arietinum

Trong nghiên cứu này, kích thước (đơn vị là aa), trọng lượng phân tử (đơn vị là kDa) và một số đặc tính hóa sinh cơ bản của protein, bao gồm điểm đẳng điện, độ bất ổn định và độ ưa nước trung bình đã được tìm hiểu dựa trên trình tự của *CaSWEET* tương ứng trên cây đậu gà [7]. Kết quả phân tích ở Bảng 1 cho thấy kích thước của họ *SWEET* ở đậu gà dao động từ 230 (*CaSWEET20*) đến 296 aa (*CaSWEET13*), trung bình đạt 252,8 aa. Trong khi đó, giá trị trọng lượng phân tử của các protein này đạt từ 25,67 (*CaSWEET02*) đến 33,47 kDa (*CaSWEET13*), với giá trị trung bình khoảng 28,30 kDa. Trước đó, Feng và cộng sự cũng đã ghi nhận họ *SISWEET* ở

S. lycopersicum có kích thước từ 233 đến 308 aa [6], gần tương đương với các *CaSWEET* ở *C. arietinum* (Bảng 1).

Tiếp theo, họ *SWEET* ở đậu gà có điểm đẳng điện từ khoảng axit ($pI = 5,83$) đến bazơ ($pI = 9,74$), 90,48% các *CaSWEET* có điểm đẳng điện lớn hơn 7, trong khi chỉ có 2 phân tử có giá trị điểm đẳng điện nhỏ hơn 7 (Bảng 1). Kết quả này cũng được ghi nhận tương tự như trên họ *BnSWEET* ở *B. napus*, 63 trên tổng số 68 phân tử có điểm đẳng điện lớn hơn 7 [4]. Trước đó, các protein có tính kiềm (pI lớn hơn 7) đã được giả thuyết có thể phân bố xuyên màng hoặc ty thể [16]. Nhằm tăng thêm mức độ tin cậy cho nghiên cứu, trình tự aa của họ *CaSWEET* được phân tích trên TargetP [14] để dự đoán vị trí phân bố nội bào của các protein này. Kết quả cho thấy đa số các thành viên (17 trên 21) của họ *CaSWEET* có thể cư trú ở hệ thống tiết trong tế bào, với 5 phân tử được dự đoán với độ tin cậy cao (Bảng 1).

Bảng 1. Đặc tính cơ bản của *CaSWEET* ở đậu gà

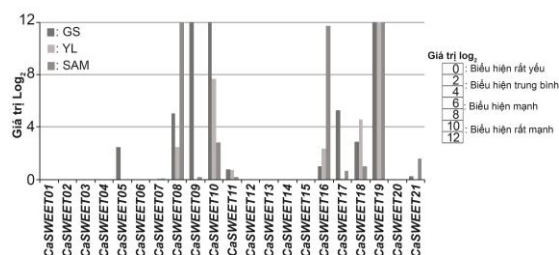
TT	Tên protein	L	mW	pI	II	GRAVY	TargetP
1	CaSWEET01	239	26,75	6,80	45,94	0,85	S*
2	CaSWEET02	235	25,67	8,69	37,73	0,70	S
3	CaSWEET03	253	28,65	5,83	37,62	0,79	S*
4	CaSWEET04	254	28,75	8,16	37,33	0,75	S*
5	CaSWEET05	270	30,28	8,95	27,39	0,78	S
6	CaSWEET06	246	27,36	9,17	33,81	0,67	-
7	CaSWEET07	237	26,76	8,33	39,78	0,71	-
8	CaSWEET08	257	28,84	9,23	35,43	0,62	S
9	CaSWEET09	259	29,05	9,40	33,26	0,67	S
10	CaSWEET10	242	26,80	9,47	34,69	0,69	S*
11	CaSWEET11	259	28,71	9,44	36,82	0,49	-
12	CaSWEET12	247	27,44	9,65	27,76	0,79	S
13	CaSWEET13	296	33,47	8,35	54,85	0,33	S
14	CaSWEET14	262	29,22	9,15	31,90	0,66	S
15	CaSWEET15	253	28,07	9,59	41,52	0,76	S
16	CaSWEET16	250	27,91	8,10	26,72	0,69	S*
17	CaSWEET17	251	27,79	9,25	40,29	0,71	S
18	CaSWEET18	281	31,77	8,31	35,50	0,54	S
19	CaSWEET19	255	28,58	9,74	40,48	0,90	S
20	CaSWEET20	230	26,29	9,28	34,32	0,87	-
21	CaSWEET21	232	25,93	8,96	40,75	0,93	S

L: Kích thước, mW: Trọng lượng phân tử, pI: Điểm đẳng điện, II: Độ bất ổn định, GRAVY: Độ ưa nước, TargetP: Vị trí cư trú nội bào

Cuối cùng, giá trị GRAVY của họ CaSWEET ở đậu gà đều lớn hơn 0 (Bảng 1), chứng tỏ phân tử CaSWEET đều có tính kỵ nước, tương tự như ghi nhận gần đây trên cải thảo (*B. rapa*) [3] và các cây trồng khác [1], [2]. Trị số II của các CaSWEET dao động từ 26,72 (CaSWEET12) đến 54,85 (CaSWEET13) (Bảng 1), trong đó phần lớn thành viên (15 trên 21) có II nhỏ hơn 40, cho thấy chúng đều ổn định trong ống nghiệm. Các kết quả này đã cung cấp những dữ liệu một cách toàn diện về đặc tính hóa sinh của họ protein CaSWEET ở đậu gà.

Kết quả phân tích in silico mức độ biểu hiện của các gen CaSWEET trong điều kiện thường

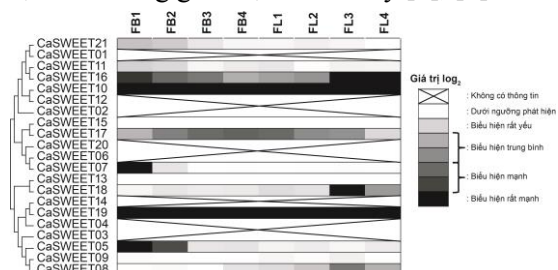
Phân tích mức độ biểu hiện của các gen mã hóa họ SWEET ở 11 vị trí trên cây đậu tương được tìm hiểu thông qua dữ liệu phiên mã ở giống 'ICC 4958' trong điều kiện thường [8] trên cơ sở dữ liệu LIS [9]. Kết quả đã xác định được dữ liệu biểu hiện của 13 trên 21 gen CaSWEET, hai gen CaSWEET13 và CaSWEET15 có mức độ phiên mã dưới ngưỡng phát hiện (Hình 1, 2). Mô tả trên Hình 1 cho thấy CaSWEET19 biểu hiện rất mạnh ở cả ba mẫu mô GS, YL và SAM. Hai gen cũng có biểu hiện mạnh ở mẫu GS được xác định là CaSWEET09 và CaSWEET10, trong khi CaSWEET08 và CaSWEET16 được tăng cường biểu hiện ở SAM (Hình 1).



Hình 1. Biểu hiện của các gen CaSWEET trong ba mẫu mô của cây đậu gà trong điều kiện thường

Trên mẫu mô hoa thu thập ở các giai đoạn khác nhau, họ gen CaSWEET có mức độ biểu hiện rất đa dạng (Hình 2). Cụ thể, CaSWEET16 và CaSWEET17 cũng biểu hiện mạnh hoặc có xu hướng biểu hiện mạnh ở các

mẫu FB và FL (Hình 2). Đáng chú ý, hai gen, CaSWEET10 và CaSWEET19 biểu hiện rất đặc thù ở tất cả mô hoa trong điều kiện thường (Hình 2). Bên cạnh đó, một số gen, như CaSWEET07 và CaSWEET18 cũng được tăng cường phiên mã tại một mẫu mô hoa, lần lượt là FB1 và FL3 (Hình 2). Kết quả này bước đầu cho thấy họ gen mã hóa SWEET ở đậu gà có thể đóng vai trò quan trọng, liên quan đến những quá trình diễn ra tại các bộ phận trên cây trong điều kiện thường, tương tự như những ghi nhận trước đây [2], [3].



Hình 2. Mức độ biểu hiện của các gen CaSWEET tại mẫu hoa ở các giai đoạn khác nhau trong điều kiện thường

Kết quả phân tích in silico mức độ biểu hiện của các gen CaSWEET trong điều kiện stress phi sinh học

Trong nghiên cứu này, mức độ đáp ứng phiên mã của các gen CaSWEET trong điều kiện stress phi sinh học được đánh giá dựa trên phân tích hai dữ liệu biểu hiện khi xử lý hạn (GSE70274) và mặn (GSE70377) với mẫu rễ [10]. Kết quả phân tích được thể hiện ở Bảng 2. Trong đó, thông tin của chín gen CaSWEET không được tìm thấy, hai gen, CaSWEET10 và CaSWEET18 có mức độ phiên mã dưới ngưỡng phát hiện (Bảng 2). Đáng chú ý, bốn gen CaSWEET đã được xác định có đáp ứng với stress mặn và hạn (Bảng 2). Đặc biệt, CaSWEET05 là gen có mức độ phiên mã tăng mạnh nhất trong stress hạn, đạt 2,43 lần so với điều kiện thường, trong khi CaSWEET17 có đáp ứng tăng mạnh nhất trong stress mặn, tương ứng 2,17 lần so với điều kiện thường (Bảng 2).

Bảng 2. Mức độ đáp ứng của các gen CaSWEET ở rễ trong xử lý hạn và mặn ở đậu gà

TT	Tên gen	Đáp ứng mặn	Đáp ứng hạn	TT	Tên gen	Đáp ứng mặn	Đáp ứng hạn
1	CaSWEET01	-	-	12	CaSWEET12	-	-
2	CaSWEET02	-	-	13	CaSWEET13	0,86	0,58
3	CaSWEET03	-	-	14	CaSWEET14	-	-
4	CaSWEET04	-	-	15	CaSWEET15	0,61	0,62
5	CaSWEET05	0,37	2,43	16	CaSWEET16	0,68	2,21
6	CaSWEET06	-	-	17	CaSWEET17	2,17	1,04
7	CaSWEET07	0,41	1,24	18	CaSWEET18	~ 0	~ 0
8	CaSWEET08	0,22	2,20	19	CaSWEET19	0,19	0,97
9	CaSWEET09	1,09	0,42	20	CaSWEET20	-	-
10	CaSWEET10	~ 0	~ 0	21	CaSWEET21	-	-
11	CaSWEET11	0,47	0,85				

Về mặt lý thuyết, thực vật đáp ứng với stress hạn và mặn thông qua nhiều con đường, trong đó nổi bật là cơ chế điều hòa áp suất thẩm thấu ở rễ bằng cách tăng cường nồng độ các chất tan, trong đó có đường sucrose [17]. Dựa trên dữ liệu biểu hiện của họ gen *CaSWEET*, bốn gen *CaSWEET05*, *CaSWEET08*, *CaSWEET16* và *CaSWEET17* có đáp ứng tăng với stress mặn/hạn ở rễ, cho thấy các gen này có thể tham gia vào cơ chế thích nghi ở đậu gà với stress thẩm thấu. Kết quả của nghiên cứu này tạo tiền đề cho các phân tích tiếp theo về chức năng gen *CaSWEET* liên quan đến tính chống chịu stress phi sinh học ở cây đậu gà.

KẾT LUẬN

Họ *CaSWEET* ở đậu gà có kích thước và trọng lượng phân tử tương đối đồng đều, đạt từ 230 đến 296 aa, tương ứng 25,67 đến 33,47 kDa. Các *CaSWEET* đều có tính kỵ nước, hầu hết trong số đó có pH đạt ngưỡng bazơ (19) và ổn định trong ống nghiệm (15). Đa số các protein có thể phân bố ở hệ thống tiết.

Gen *CaSWEET19* biểu hiện rất mạnh ở 11 bộ phận trong điều kiện thường. Các gen còn lại đều có biểu hiện đặc thù ở ít nhất một vị trí trên cây trong điều kiện thường.

Đã xác định được bốn gen *CaSWEET* có đáp ứng với stress mặn và hạn ở mô rễ. Gen *CaSWEET05* biểu hiện mạnh nhất trong stress hạn, đạt 2,43-fold, trong khi *CaSWEET17* là gen có đáp ứng với stress mặn, tương ứng 2,17-fold.

LỜI CẢM ƠN: Nghiên cứu này được thực hiện từ kinh phí của đề tài nghiên cứu cơ bản mã số 08/HĐUT-KHCN do Đại học Sư phạm Hà Nội 2 tài trợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. L. Feng, W. B. Frommer, "Structure and function of SemiSWEET and SWEET sugar transporters", *Trends Biochem Sci.*, 40(8), pp. 480-486, 2015.
- [2]. H. Mizuno, S. Kasuga, H. Kawahigashi, "The sorghum SWEET gene family: stem sucrose accumulation as revealed through transcriptome profiling", *Biotechnol Biofuels*, 9, pp. 127, 2016.
- [3]. H. Li, X. Li, Y. Xuan, J. Jiang, Y. Wei, Z. Piao, "Genome wide identification and expression profiling of SWEET genes family reveals its role during *Plasmodiophora brassicae*-induced formation of clubroot in *Brassica rapa*", *Front Plant Sci.*, 9, pp. 207-207, 2018.
- [4]. H. Jian, K. Lu, B. Yang, T. Wang, L. Zhang, A. Zhang, J. Wang, L. Liu, C. Qu, J. Li, "Genome-wide analysis and expression profiling of the SUC and SWEET gene families of sucrose transporters in oilseed rape (*Brassica napus* L.)", *Front Plant Sci.*, 7, pp. 1464, 2016.
- [5]. Y. Li, Y. Wang, H. Zhang, Q. Zhang, H. Zhai, Q. Liu, S. He, "The plasma membrane-localized sucrose transporter IbSWEET10 contributes to the resistance of sweet potato to *Fusarium oxysporum*", *Front Plant Sci.*, 8, pp. 197, 2017.
- [6]. C. Y. Feng, J. X. Han, X. X. Han, J. Jiang, "Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SWEET gene family in tomato", *Gene*, 573(2), pp. 261-272, 2015.
- [7]. Chu Đức Hà, Phùng Thị Vương, Chu Thị Hồng, Phạm Thị Lý Thu, Phạm Phương Thu, Trần Thị Phương Liên, La Việt Hồng, "Định danh và phân tích cấu trúc của họ gen mã hóa protein vận chuyển đường sucrose ở cây đậu gà (*Cicer*

- arietinum)", *TNU Journal of Science and Technology*, 194(01), pp. 133-138, 2019.
- [8]. V. K. Singh, R. Garg, M. Jain, "A global view of transcriptome dynamics during flower development in chickpea by deep sequencing", *Plant Biotechnol J.*, 11(6), pp. 691-701, 2013.
- [9]. M. D. Gonzales, E. Archuleta, A. Farmer, K. Gajendran, D. Grant, R. Shoemaker, W. D. Beavis, M. E. Waugh, "The Legume Information System (LIS): an integrated information resource for comparative legume biology", *Nucleic Acids Res.*, 33(Database issue), pp. D660-665, 2005.
- [10]. R. Garg, R. Shankar, B. Thakkar, H. Kudapa, L. Krishnamurthy, N. Mantri, R. K. Varshney, S. Bhatia, M. Jain, "Transcriptome analyses reveal genotype- and developmental stage-specific molecular responses to drought and salinity stresses in chickpea", *Sci Rep*, 6, pp. 19228, 2016.
- [11]. T. A. Hall, "BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT", *Nucleic Acids Symp Ser*, 41, pp. 95-98, 1999.
- [12]. E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel, A. Bairoch, "ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis", *Nucleic. Acids Res.*, 31(13), pp. 3784-3788, 2003.
- [13]. H. D. Chu, K. H. Nguyen, Y. Watanabe, D. T. Le, T. L. T. Pham, K. Mochida, L. P. Tran, "Identification, structural characterization and gene expression analysis of members of the nuclear factor-Y family in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under dehydration and abscisic acid treatments", *Int. J. Mol. Sci.*, 19(11), pp. E3290, 2018.
- [14]. Emanuelsson, S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen, "Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools", *Nat. Protoc.*, 2(4), pp. 953-971, 2007.
- [15]. S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, "MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Mol. Biol. Evol.*, 33 (7), pp. 1870-1874, 2016.
- [16]. J. Kiraga, P. Mackiewicz, D. Mackiewicz, M. Kowalczyk, P. Biecek, N. Polak, K. Smolarczyk, M. R. Dudek, S. Cebrat, "The relationships between the isoelectric point and: length of proteins, taxonomy and ecology of organisms", *BMC Genomics*, 8, pp. 163, 2007.
- [17]. G. Miller, N. Suzuki, S. Ciftci-Yilmaz, R. Mittler, (2010), "Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses", *Plant Cell Environ.*, 33(4), pp. 453-467, 2010.