

Внутривидовой полиморфизм гена сахарозосинтазы *Sus1* у образцов *Pisum sativum* L.

Е.А. Дьяченко¹✉, М.А. Слугина^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра биотехнологии, Москва, Россия

Горох посевной *Pisum sativum* широко культивируется в России и в мире. Продуктивность гороха во многом зависит от его способности образовывать симбиоз с клубеньковыми бактериями. Ранее было показано, что на симбиотическую активность гороха оказывает существенное влияние работа сахаролитических ферментов. Одним из важнейших ферментов углеводного метаболизма является сахарозосинтаза *Sus1*, которая осуществляет реакцию обратимого гидролиза сахарозы до УДФ-глюкозы и фруктозы. В настоящей статье охарактеризована внутривидовая вариабельность гена *Sus1* у 14 образцов гороха *Pisum sativum*. Длина полученных генов варьировала от 3514 до 3532 п. н. Все гены имели сходную структуру и состояли из 13 экзонов и 12 интронов и по своему строению были отнесены к SUS1-группе двудольных растений. В составе нуклеотидных последовательностей выявлено 125 SNP. Интронные последовательности помимо единичных нуклеотидных замен содержали шесть инделей, вследствие чего их протяженность варьировала от 1093 до 1111 п. н. Наиболее вариабельным оказался интрон III. В кодирующих последовательностях найдено 47 SNP, при этом наиболее вариабельным у *P. sativum* оказался экзон II. Среди выявленных в экзонах единичных замен 16 приводили к замещению аминокислотных остатков, при этом шесть замещений потенциально могут влиять на функционирование белка. В составе транслированной аминокислотной последовательности выявлены активные сайты и консервативные мотивы, последовательности которых инвариантны у всех исследуемых образцов. На основе биоинформационного анализа аминокислотной последовательности предложена гипотетическая модель третичной структуры белка *Sus1*. Согласно этой модели, белок представляет собой тетрамер, каждая субъединица которого имеет трехдоменную структуру. В результате проведенного филогенетического анализа с использованием полученных последовательностей, а также известных гомологов генов сахарозосинтаз бобовых было показано, что гены *Sus1* и *Sus3* эволюционно ближе друг к другу, чем к *Sus2*. Также выдвинута гипотеза о том, что гены семейства сахарозосинтаз дивергировали раньше, чем произошло разделение бобовых на виды.

Ключевые слова: *Pisum sativum*; сахарозосинтаза; нуклеотидная вариабельность; замещения аминокислотных остатков; третичная структура *Sus1*.

Intraspecific variability of the *Sus1* sucrose synthase gene in *Pisum sativum* accessions

E.A. Dyachenko¹✉, M.A. Slugina^{1,2}

¹ Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The pea *Pisum sativum* is widely cultivated in Russia as well as over the world. Pea productivity depends on the ability of the pea plant to get into a symbiosis with nodule bacteria. It was previously shown that the strength of the symbiotic activity depends on the activity of plant sucrose cleavage enzymes. Sucrose synthase *Sus1* is one of the most important enzymes involved in carbohydrate metabolism. Sucrose synthase cleaves sucrose into UDP-glucose and fructose. This paper is devoted to characterization of *Sus1* gene intraspecific variability in 14 *Pisum sativum* accessions. The length of the identified *Sus1* gene varied from 3514 bp to 3532 bp. All identified genes had a similar structure and contained 13 exons and 12 introns. According to their structure, they were assigned to the SUS1-group of dicotyledonous plants. In nucleotide sequences, 125 SNPs were identified. In addition to SNPs, intron sequences contained six indels, thus their length varied from 1093 bp to 1111 bp. The most variable was the intron III. In coding sequences, 47 SNPs were found, wherein the most variable was the exon II. 16 exon SNPs led to amino acid substitutions. Six of them were deleterious and may potentially influence protein folding and stability. All the conservative motifs and active sites were detected in the translated amino acid sequences. It was shown that their sequences were invariable in all the tested accessions. Computational analysis of the amino acid sequences has predicted *Sus1* tertiary structure. The protein is a tetramer and each subunit in its turn consists of three domains. The phylogenetic analysis using identified *Pisum Sus1* sequences and homologous sucrose synthase genes revealed that the *Sus1* and *Sus3* genes are closer to each other than to *Sus2*. It was also proposed that the sucrose synthase family genes had diverged before legumes split into species.

Key words: *Pisum sativum*; sucrose synthase; nucleotide variability; amino acid substitutions; *Sus1* tertiary structure.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Дьяченко Е.А., Слугина М.А. Внутривидовой полиморфизм гена сахарозосинтазы *Sus1* у образцов *Pisum sativum* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):108-114. DOI 10.18699/VJ18.338

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Dyachenko E.A., Slugina M.A. Intraspecific variability of the *Sus1* sucrose synthase gene in *Pisum sativum* accessions. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):108-114. DOI 10.18699/VJ18.338 (in Russian)

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) – одна из основных зернобобовых культур в России и в мире. Обладает высокой питательной и диетической ценностью, обусловленной большим содержанием белка, клетчатки, жирных кислот и антиоксидантов (Dahl et al., 2012). Продуктивность гороха существенно зависит от симбиоза с клубеньковыми бактериями, которые снабжают растение азотом. В свою очередь растение обеспечивает бактерии углеводами. Было высказано предположение, что на симбиотическую активность гороха может оказывать влияние работа сахарозолитических ферментов. Одним из таких ферментов, ассоциированных с симбиотической активностью, является сахарозосинтаза (Horst et al., 2007).

Фермент сахарозосинтаза, осуществляющий реакцию обратимого гидролиза сахарозы до УДФ-глюкозы и фруктозы, кодируется семейством генов *Sus*, представленным у всех высших растений. У отдельных представителей бобовых известно до шести изоформ сахарозосинтазы (Horst et al., 2007). К числу наиболее интересных генов сахарозосинтаз бобовых относится ген *Sus1*, так как именно он может влиять на формирование клубеньков (Horst et al., 2007).

В семействе бобовых (Fabaceae) в настоящее время полная нуклеотидная последовательность гена сахарозосинтазы *Sus1* известна только у люцерны (*Medicago truncatula*, триба Trifolieae; NC_016410.2) и гороха красножелтого (*P. fulvum*, триба Fabeae; KP219422–KP219424) (Дьяченко и др., 2015). Помимо полногеномной последовательности *Sus1 P. fulvum*, среди представителей трибы Fabeae в базе NCBI присутствуют только мРНК генов сахарозосинтаз *P. sativum* и *Vicia faba*. У вида *P. sativum* помимо гена *Sus1 (PsSus1)* известны последовательности мРНК еще двух генов сахарозосинтаз – *Sus2 (PsSus2)* и *Sus3 (PsSus3)* (Barratt et al., 2001).

Целью настоящей работы стала идентификация и характеристика полноразмерной последовательности гена *Sus1* у образцов *P. sativum*, анализ экзон-интронной структуры гена, а также исследование внутривидового нуклеотидного и аминокислотного полиморфизма *Sus1*.

Материалы и методы

Для изучения полиморфизма полноразмерных генов-гомологов *Sus1* у представителей рода *Pisum* и родственных видов трибы Fabeae выбрано 14 образцов *P. sativum* из коллекции Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) (г. Санкт-Петербург). Набор включал образцы различного географического происхождения, подвиды и разновидности (табл. 1). Семена проращивали в чашках Петри при комнатной температуре, затем проростки высаживали в теплицу с искусственным климатом.

Ядерную ДНК выделяли из свежих тканей молодых листьев с двойной депротеинизацией смесью фенол : хлороформ (Рыжова и др., 2013). Реакционная смесь для ПЦР-амплификации полноразмерных генов *Sus1* включала ~100 нг геномной ДНК, разработанные ранее праймеры 1F (5'-GAAGAATTTSAATGGCTACTG) и 4R (5'-MAAAGCCGGTTYCTYCATTTTC) в конечной кон-

центрации 10 мкМ и полимеразу LongAmp® Hot Start Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, США). Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 1 % агарозном геле (Universal Agarose, PEQlab, Германия). ПЦР-фрагменты длиной ~4 т. п. н. очищали с помощью набора Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, США). Клонирование фрагментов проводили с использованием набора pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, США). Первичные нуклеотидные последовательности фрагментов определяли на автоматическом секвенаторе ABI 310 Capillary DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием разработанных праймеров:

1F 5'-GAAGAATTTSAATGGCTACTG;
1R 5'-AATAGAAGCTGAATGGACTCG;
2F 5'-CTGAAGAGTATCTARGCAC;
2R 5'-TCCAGTAAATATCAGATTCAGG;
3F 5'-CTTGAGAAGACTAAGTATCCT;
3R 5'-AAGAATTCGACTAGGAGATCA;
4F 5'-TTACCAACATTCGCAACACTCA;
4R 5'-MAAAGCCGGTTYCTYCATTTTC,

которые позволяют амплифицировать как полноразмерный ген, так и его перекрывающиеся участки длиной до 1000 п. н., и реагентов ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) (АЦКП «Биоинженерия») (Дьяченко и др., 2015).

Полученные последовательности выравнивали и анализировали с помощью программы MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Для сравнительного анализа использовали ранее идентифицированные полные последовательности гена *Sus1 P. fulvum* (Дьяченко и др., 2015). Положение аминокислотных замен определяли относительно последовательности *Sus1 P. sativum*, взятой из GenBank NCBI (AJ012080). Границы консервативных доменов идентифицировали согласно данным, представленным в базе UniProt (Q9T0M9_PEA; <http://www.uniprot.org/>). Возможное влияние аминокислотных замен на структуру и функции белков оценивали с помощью программы PROVEAN (Choi et al., 2012). Структуру белков анализировали с использованием программы Phyre2 (Kelley et al., 2015) и визуализировали посредством Chimera-1.11.2 (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

Результаты и обсуждение

Клонирование полноразмерных последовательностей генов-гомологов *Sus1* у представителей рода *Pisum*

Ранее были разработаны специфичные праймеры, позволяющие амплифицировать последовательности генов-гомологов *Sus1* у представителей рода *Pisum*, а также дифференцировать их от последовательностей *Sus2* (AJ001071) и *Sus3* (AJ311496) (Дьяченко и др., 2015). С использованием этих праймеров были амплифицированы, клонированы и секвенированы полноразмерные последовательности гена сахарозосинтазы *Sus1* у 14 образцов гороха посевного *P. sativum* различного географического происхождения.

Сравнительный анализ полученных последовательностей *Sus1 P. sativum* выявил их высокую гомологию (97–98 %) с ранее описанными последовательностями *Sus1 P. fulvum* (Дьяченко и др., 2015). Анализ экзон-инт-

Table 1. *Pisum* accessions analyzed and corresponding *Sus1* sequences

Accession/Species	VIR accession no.	Origin	NCBI accession no.	Gene I length, bp	Intron III GAAGCACAGATAT deletion	Intron VII TTGTAAGTCATAGTT deletion	Intron IX CATGAAC deletion	Intron XII TATCT deletion	Intron XIII TGGTTGTG TA insertion
<i>P. sativum</i> <i>ssp. transcaucasicum</i>	289	Russia	MG544306	3522					
<i>P. sativum</i> <i>ssp. asiaticum</i>	2827	Tajikistan	MG544307	3527					
<i>P. sativum</i> <i>ssp. abyssinicum</i>	2759	Ethiopia	MG544308	3531					
<i>P. sativum</i> <i>ssp. syriacum (=humile)</i>	2521	Israel	MG544309	3514	+				
<i>P. sativum</i> <i>ssp. elatius</i>	3115	Italy	MG544310	3527					
<i>P. sativum</i> <i>ssp. sativum</i>	9190	Russia	MG544311	3527					
	6373	Mongolia	MG544312	3527					
	2587	Armenia	MG544313	3532					
	1982	Afghanistan	MG544314	3527					
	1937	Austria	MG544315	3527					
	7584	Ethiopia	MG544316	3527					
	8522	Russia	MG544317	3527					
	8599	Bhutan	MG544318	3527					
	5493	Iraq	MG544319	3527					
<i>P. fulvum</i>	702	Israel	KP219422	3494		+			+
	706	»	KP219423	3501		+			+
	2523	Palestine	KP219424	3506		+			+

Note. Insertions/deletions were determined with reference to the majority of specimens.

ронной структуры показал, что все последовательности *Sus1* *P. sativum* включали 13 экзонов и 12 интронов и по структуре относились к SUS1-группе двудольных растений (Harada et al., 2005). Надо отметить, что у генов данной группы первый экзон является нетранслируемым (Baud et al., 2004), в связи с чем нумерация экзонов в настоящей статье приводится с экзона II. Последовательности *Sus1* у образцов *P. sativum* и *P. fulvum* были переменными по длине (см. табл. 1): от 3514 до 3532 п. н. у *P. sativum* и от 3494 до 3506 п. н. у *P. fulvum*. Такие различия в протяженности гена сахарозосинтазы были обусловлены наличием инсерций и делеций в интронах (табл. 2). Последовательности же экзонов были инвариантны по длине. Выявлено три видоспецифичных инделя (см. табл. 1, выделены серым фоном). У образцов *P. sativum* протяженность интронных последовательностей гена сахарозосинтазы варьировала в пределах от 1093 до 1111 п. н., а наиболее полиморфным оказался интрон III (11.9%), при этом уровень полиморфизма интронов IV и VII также превышал 10%.

Изученные последовательности гена сахарозосинтазы характеризовались высоким уровнем полиморфизма. Все анализируемые последовательности гена сахарозосинтазы *P. sativum* содержали 125 переменных сайтов (3.5%) и шесть инделей. Сравнительный анализ показал более низкий уровень изменчивости у образцов *P. fulvum*, в последовательностях *Sus1* которого было детектировано 63 SNP и общий уровень изменчивости не превышал 1.8%. Как и ожидалось, экзоны *Sus1* были более консервативны по сравнению с интронами. У образцов *P. sativum* последовательности экзонов содержали 47 переменных сайтов, что составило 1.9% (см. табл. 2). Интересно отметить, что наиболее переменным у представителей *P. sativum* оказался экзон II, в то время как у образцов *P. fulvum* – экзон VIII (см. табл. 2).

Более высокий уровень изменчивости *Sus1* *P. sativum*, по сравнению с *P. fulvum*, может быть объяснен относительно более широкой географией отобранных образцов, отражающей естественный ареал *P. sativum*, тогда как естественный ареал *P. fulvum* намного уже и ограничен Ближним Востоком.

Значения внутривидового полиморфизма гена сахарозосинтазы *Sus1* у *P. sativum* сопоставимы со средним уровнем полиморфизма у других семейств растений. Так, значения внутривидовой изменчивости генов *Sus4* у видов сахарного тростника (*Saccharum*) не превышали 1.9% (Zhang et al., 2013). У гексаплоидной мягкой пшеницы ген *Sus2* был идентифицирован на трех гомеологичных хромосомах, на двух из которых он был инвариантен (2A и 2D), в то время как на третьей (2B) – полиморфен (Jiang et al., 2011).

Эволюция сахарозосинтазы *Sus1* и филогения рода *Pisum*

С целью определения особенностей эволюции гена сахарозосинтазы *Sus1* у видов бобовых была построена дендрограмма с использованием как проанализированных в данной работе кодирующих последовательностей этого гена, так и доступных в базе данных NCBI гомологичных последовательностей основных видов бобовых (рис. 1). На представленной дендрограмме гены сахарозосинтаз

Table 2. Sucrose synthase *Sus1* coding sequences in *P. sativum* and *P. fulvum*

Exon (bp)	Exon polymorphism, % (number of variable sites)	
	<i>P. sativum</i>	<i>P. fulvum</i>
II (98)	5.10 (5)	1.02 (1)
III (127)	3.15 (4)	0.79 (1)
IV (152)	1.32 (2)	0.66 (1)
V (193)	1.04 (2)	1.04 (2)
VI (336)	3.57 (12)	1.19 (4)
VII (96)	1.04 (1)	0.0
VIII (174)	1.15 (2)	4.60 (8)
IX (117)	0.85 (1)	0.0
X (167)	2.40 (4)	0.0
XI (225)	0.44 (1)	1.33 (3)
XII (564)	2.13 (12)	2.48 (14)
XIII (139)	0.72 (1)	0.72 (1)
XIV (33)	0.0	0.0
All exons (2421)	1.94 (47)	1.45 (35)

бобовых формируют три кластера, соответствующие генам *Sus1*, *Sus2* и *Sus3*. При этом исследуемые последовательности *Sus1* рода *Pisum* образуют единый кластер внутри другого более крупного кластера, соответствующего генам *Sus1* семейства Fabaceae. Сестринскую ветвь для *Sus1*-кластера образует ген *Sus3* рода *Pisum*. В отдельный кластер входят последовательности генов *Sus2* Fabaceae. Таким образом, в результате проведенного филогенетического анализа было показано, что у бобовых гены *Sus1* и *Sus3* эволюционно ближе друг к другу, чем к гену *Sus2*. Другой важный вывод заключается в том, что гены семейства сахарозосинтаз, вероятно, дивергировали раньше, чем произошло разделение бобовых на виды.

Варибельность аминокислотных последовательностей *Sus1* у представителей рода *Pisum*

Кодирующие последовательности сахарозосинтазы образцов *P. sativum*, а также ранее идентифицированные последовательности *P. fulvum* были транслированы, после чего проведен анализ их изменчивости с использованием в качестве референсной последовательности *P. sativum* *Sus1* (AJ012080 GeneBank NCBI). Протяженность белка *Sus1* у всех анализируемых образцов *P. sativum* и *P. fulvum* была одинакова и составила 806 а.к. Рассчитанные значения изоэлектрических точек белков сахарозосинтазы были практически одинаковыми – от 5.47 до 5.61 (табл. 3).

Из 74 обнаруженных в экзонах нуклеотидных замен 16 SNP приводили к замещению аминокислотных остатков в белке, и изменчивость белка *Sus1* у видов *Pisum* составила 1.98%. Последовательности *P. sativum* отличались наличием видоспецифичных аминокислотных сайтов. Так, последовательности *Sus1* у *P. sativum* содержат

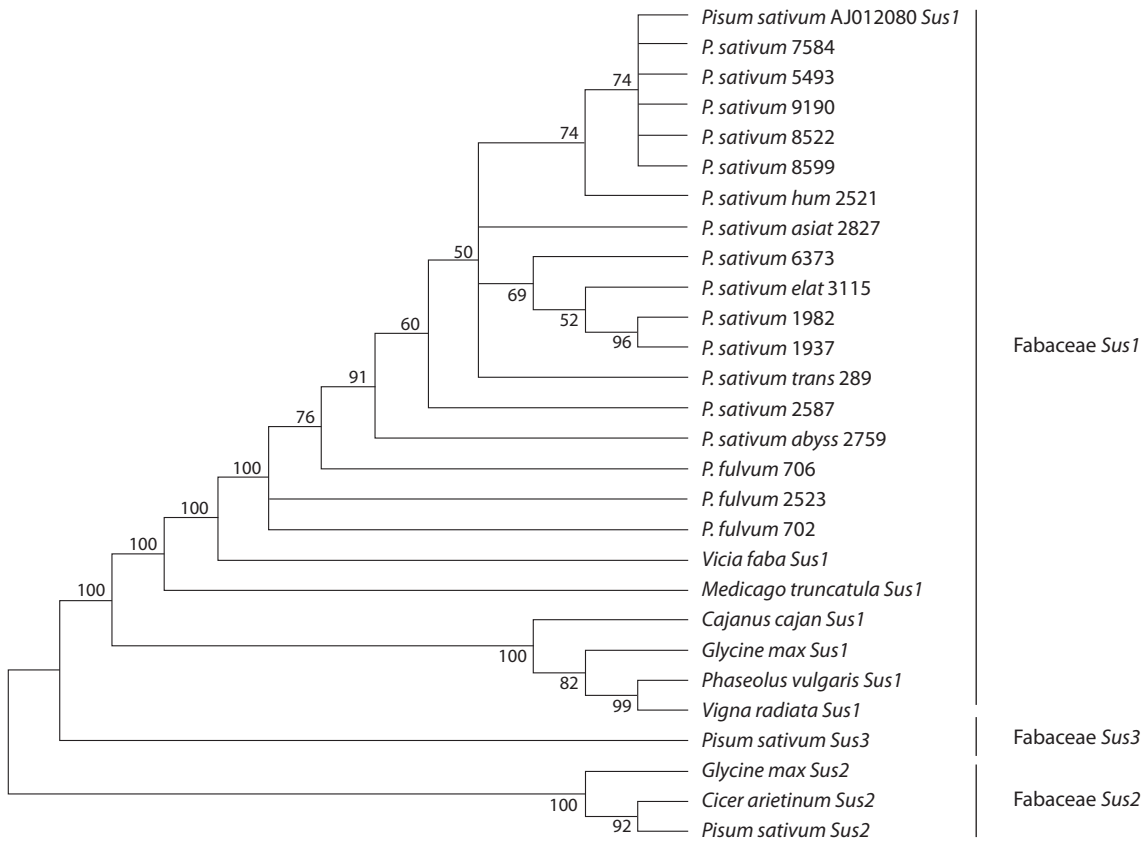


Fig. 1. The phylogenetic tree constructed in the comparison of coding sequences of legume sucrose synthase by the maximum likelihood method.

Table 3. Amino acid substitution sites found in sucrose synthase *Sus1* sequences of *Pisum* accessions

Accession	Site no. in the protein															Isoelectric point	
	17	19	25	63	117	231	234	376	462	547	570	577	609	630	701		795
	Sucrose synthase domain										Glycosyl transferase domain						
AJ012080	D	T	N	T	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.61
<i>P. sativum trans</i> 289	D	T	N	T	T	F	I	K	Q	D	K	A	G	H	I	K	5.57
<i>P. sativum asiat</i> 2827	D	T	N	T	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	H	V	K	5.61
<i>P. sativum abyss</i> 2759	D	T	N	T	T	F	I	K	Q	E	K	S	G	H	I	K	5.57
<i>P. sativum hum</i> 2521	D	T	N	I	K	F	I	E	Q	E	K	A	G	H	V	E	5.47
<i>P. sativum elat</i> 3115	E	T	N	T	K	<u>C</u>	I	K	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.61
<i>P. sativum</i> 9190	E	T	N	T	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.61
<i>P. sativum</i> 6373	D	T	N	T	T	<u>C</u>	S	E	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.50
<i>P. sativum</i> 2587	D	T	N	T	T	F	I	K	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.57
<i>P. sativum</i> 1982	D	T	N	T	K	F	S	K	Q	D	E	S	A	H	I	E	5.47
<i>P. sativum</i> 1937	D	T	N	T	K	F	I	K	Q	D	E	S	A	H	I	E	5.47
<i>P. sativum</i> 7584	D	T	N	T	K	F	I	K	P	E	K	A	G	H	I	K	5.61
<i>P. sativum</i> 8522	D	T	N	T	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.61
<i>P. sativum</i> 8599	D	N	S	T	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.61
<i>P. sativum</i> 5493	D	T	N	T	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	H	I	K	5.61
<i>P. fulvum</i> 702	D	T	N	I	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	L	I	K	5.59
<i>P. fulvum</i> 706	D	T	N	I	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	L	I	K	5.59
<i>P. fulvum</i> 2523	D	T	N	I	K	F	I	K	Q	E	K	A	G	L	I	K	5.59

Amino acid substitutions are shown in boldface; radical substitutions in amino acid residues are underlined.

треонин T₆₃ и гистидин H₆₃₀, в то время как у образцов *P. fulvum* в аналогичных сайтах *Sus1* находятся изолейцин I₆₃ и лейцин L₆₃₀. При этом следует отметить, что у образца *P. sativum* ssp. *humile* 2521, в отличие от остальных образцов того же вида, вместо T₆₃ присутствует I₆₃, подобно *P. fulvum*. Аминокислотные последовательности *Sus1* образцов *P. sativum* 1982 и *P. sativum* 1937 были наиболее дивергированными (см. табл. 3).

В ходе анализа последовательностей *Sus1* были идентифицированы два основных функционально значимых участка, кодирующих сахарозосинтазный (экзоны II–XI) и гликозилтрансферазный (экзон XII) домены и консервативный сайт фосфорилирования – серин S₁₁, характерные для сахарозосинтаз растений (Silvente et al., 2003). Среди 16 выявленных замещений аминокислотных остатков десять были локализованы в сахарозосинтазном домене и шесть – в гликозилтрансферазном домене. Возможный структурно-функциональный эффект этих замен был проанализирован в программе PROVEAN с использованием в качестве референсной последовательности *P. sativum* *Sus1* (AJ012080 GeneBank NCBI) (Choi et al., 2012) (см. табл. 3). Из 16 переменных сайтов потенциально значимыми были признаны шесть (F231C, I234S, Q462P, K570E, A577S и G609A), что составило 0.74 % (см. табл. 3). В последовательностях доменов были также выявлены консервативные трансмембранные мотивы FLDRIPMVFNVVILSPHGYFA (экзон VI) и FGLTVVEAMATGLPTFATLN (экзон XII), инвариантные у всех образцов.

Анализ третичной структуры *Sus1*

Белки *Sus* относятся к подсемейству GT-4 гликозилтрансфераз, входящему в состав более крупного суперсемейства металл-независимых GT-B гликозилтрансфераз (Lairson et al., 2008).

При построении предполагаемой третичной структуры белка *Sus1* с использованием программы Phyre2 в качестве референсной была использована известная кристаллическая структура белка сахарозосинтазы *AtSus1 Arabidopsis thaliana* (PDB: 3S29C) (Zheng et al., 2011), гомологичного *Sus1* видов Fabaceae.

При моделировании трехмерной структуры *Sus1* более 97 % последовательности было предсказано с достоверностью 100 % на основе известных структур белков гликозилтрансфераз растений суперсемейства GT-B (GT-4). Оставшиеся 24 аминокислотных остатка на N-конце (1–24) моделировались *ab initio*. Полученная структура была визуализирована и представлена в виде мономера на рис. 2.

Белок *AtSus1* имеет структуру, типичную для сахарозосинтаз, и является тетрамером. В каждом мономере выделяют домены CTD (cellular targeting domain), EPBD (ENOD40, peptide-binding domain) и Rossmann-fold домен GT-B гликозилтрансферазы (Lairson et al., 2008). EPBD-домен особенно интересен в случае бобовых, так как он может связываться с белком нодулином ENOD40, который является гормон-подобным пептидом и вовлечен в формирование клубенька (Rohrig et al., 2002).

Предполагаемое пространственное строение *Sus1* было сходно с описанным ранее для *AtSus1* (Zheng et al.,

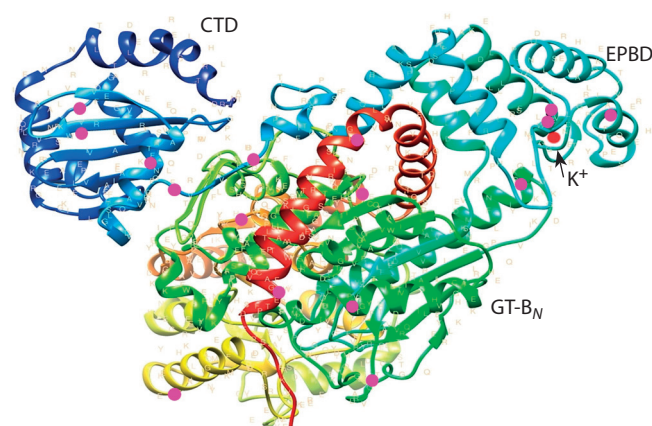


Fig. 2. Tertiary structure of the Ps*Sus1* monomer. Red dots indicate sites of amino acid substitutions.

2011) и представляло собой трехлопастную структуру с основными доменами сахарозосинтаз: CTD (9–125 а. о.), EPBD (155–274 а. о.), соединенными линкерной последовательностью (126–154 а. о.), и GT-B гликозилтрансферазой с Rossmann-fold доменом (225–774 а. о.). При этом были найдены некоторые различия, в основном в CTD-доменах *AtSus1* и *PsSus1*. На C-конце EPBD-домена выявлены пять аминокислотных остатков (Leu182, Arg183, His185, Leu192 и Leu194), образующие сайт связывания с ионом K⁺.

Таким образом, в результате проведенного анализа впервые были получены и охарактеризованы полные нуклеотидные последовательности гена *Sus1* и соответствующие аминокислотные последовательности сахарозосинтазы у 14 образцов *P. sativum*. Идентифицированы и проанализированы все функционально значимые домены и их трансмембранные мотивы, характерные для сахарозосинтаз растений. Проведен сравнительный анализ нуклеотидной вариабельности последовательностей *Sus1* и аминокислотного полиморфизма соответствующих белков у *P. sativum* и *P. fulvum*.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-34-00981mol_a and by State Budgeted Project 0104-2014-0210 (State Registration No. 01201371086). Plants were grown in a phytotron. Sequencing was conducted at the Bioengineering Shared Access Center, Research Center for Biotechnology, Russian Academy of Sciences.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Barratt D.H.P., Barber L., Kruger N.J., Smith A.M., Wang T.L., Martin C. Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. *Plant Physiol.* 2001;127:655-664.
- Baud S., Vaultier M.-N., Rochat C. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 2004;55(396):397-409.

- Choi M.-K., Le M.T., Nguyen D.T., Choi H., Kim W., Kim J.-H., Chun J., Hyeon J., Seo K., Park C. Genome-level identification, gene expression, and comparative analysis of porcine β -*defensin* genes. *BMC Genetics*. 2012;13:98-107.
- Dahl W.J., Foster L.M., Tyler R.T. Review on the health benefits of peas (*Pisum sativum* L). *Br. J. Nutr.* 2012;108:3-10.
- Dyachenko E.A., Boris K.V., Kochieva E.Z. Identification and polymorphism of the sucrose synthase gene *Sus1* in *Pisum fulvum*. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology (Moscow)*. 2015;49(4):700-704. (in Russian)
- Harada T., Satoh S., Yoshioka T., Ishizawa K. Expression of sucrose synthase genes involved in enhanced elongation of pondweed (*Potamogeton distinctus*) turions under anoxia. *Ann. Botany*. 2005;96:683-692.
- Horst I., Welham T., Kelly S., Kaneko T., Sato S., Tabata S., Parniske M., Wang T.L. Tilling mutants of *Lotus japonicus* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase. *Plant Physiol.* 2007;144:806-820.
- Jiang Q., Hou J., Hao C., Wang L., Ge H., Dong Y., Zhang X. The wheat (*T. aestivum*) sucrose synthase 2 gene (*TaSus2*) active in endosperm development is associated with yield traits. *Funct. Integr. Genomics*. 2011;11:49-61.
- Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* 2015;10(6):845-858.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016;33:1870-1874.
- Lairson L.L., Henrissat B., Davies G.J., Withers S.G. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 2008;77:521-555.
- Rohrig H., Schmidt J., Miklashevichs E., Schell J., John M. Soybean ENOD40 encodes two peptides that bind to sucrose synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002;99(4):1915-1920.
- Ryzhova N.N., Slugina M.A., Kochieva E.Z., Skryabin K.G. Polymorphism and structural variation of *rps16* group II intron in the *Solanum* species. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 2013;49(7):824-829. (in Russian)
- Silvente S., Camas A., Lara M. Heterogeneity of sucrose synthase genes in bean (*Phaseolus vulgaris* L.): evidence for a nodule-enhanced sucrose synthase gene. *J. Exp. Bot.* 2003;54:749-755.
- Zhang J., Arro J., Chen Y., Ming R. Haplotype analysis of sucrose synthase gene family in three *Saccharum* species. *Genomics*. 2013;14:314. DOI 10.1186/1471-2164-14-314.
- Zheng Y., Anderson S., Zhang Y., Garavito R.M. The structure of sucrose synthase-1 from *Arabidopsis thaliana* and its functional implications. *J. Biol. Chem.* 2011;286(41):36108-36118.