

GENOME-WIDE IDENTIFICATION OF GENES INVOLVED IN RAFFINOSE FAMILY OLIGOSACCHARIDES METABOLISM IN PEA (*PISUM SATIVUM* L.)

N.S. KUSHWAH*, M. RATHORE

Division of Plant Biotechnology, ICAR-Indian Institute of Pulses Research, Kanpur-208024, Uttar Pradesh, India

E-mail: Neetu.Kushwah@icar.gov.in *, meenal.rathore@icar.gov.in

The pea is an important cool-season pulse crop cultivated for animal and human consumption. However, the presence of 'flatulence-causing factors' hinders its consumption and acceptance worldwide. The raffinose family oligosaccharides (RFOs) have been identified as the principal 'flatulence causing factors'. Hence, reducing RFO level is the major goal to promote pea consumption and acceptance worldwide. However, very little is known about the genes involved in RFO metabolism at the genome-wide scale in pea. In the present study, genes for five key enzymes (galactinol synthase, raffinose synthase, stachyose synthase, alpha-galactosidase_Acid/Alkaline and beta-fructofuranosidase) involved in RFO metabolism pathway were identified at the genome-wide scale in pea. A total of two galactinol synthase, two raffinose synthase, one stachyose synthase, six alpha-galactosidase_Alkaline and three alpha-galactosidase_Acid and ten beta-fructofuranosidase genes were identified in the pea genome. Phylogenetic relationships analysis, exon/intron structure as well as conserved domain within each enzyme family and their chromosomal location were also determined to establish their relationship with the known proteins. In silico analysis showed that pea RFO genes contain 26 microsatellite loci. Taken together, this study provides useful candidate genes for improving the nutritional quality of pea through genetic engineering approaches as well as microsatellite loci for the development of SSR markers for the introgression of low RFO trait through marker assisted selection.

Key words: Raffinose family oligosaccharides/gene structure/raffinose synthase/stachyose synthase/galactinol synthase/pea/phylogenetic analysis

ЗАГАЛЬНОГЕНОМНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНІВ, ЗАЛУЧЕНИХ ДО МЕТАБОЛІЗМУ СІМЕЙСТВА ОЛІГОСАХАРИДІВ РАФІНОЗИ В ГОРОХУ (*PISUM SATIVUM* L.)

Горох — це важлива холодостійка бобова рослина, яку вирощують для споживання і людьми, і тваринами. Однак, наявність факторів, що викликають метеоризм, перешкоджає його споживанню та

прийняттю по всьому світу. Було встановлено, що сімейство олігосахаридів рафінози (СОР) є основним фактором, що спричиняє метеоризм. Отже, зниження рівня СОР є головною метою діяльності, спрямованої на збільшення обсягів споживання та прийняття гороху у світі. Однак, наразі дуже мало відомо про гени, залучені до метаболізму СОР у загальногеномному діапазоні гороху. У цьому дослідженні ми визначили п'ять ключових ензимів (синтазу галактинолу, синтазу рафінози, синтазу стахіози, альфа-галактозидазу кислу/лужну та бета-фруктофуранозидазу), залучених до шляху метаболізму СОР. Загалом у геномі гороху було визначено гени двох синтаз галактинолу, двох синтаз рафінози, однієї синтази стахіози, шести альфа-галактозидаз лужних і трьох альфа-галактозидаз кислих, а також десяти бета-фруктофуранозидаз. Для встановлення їхніх взаємин із відомими білками було проведено аналіз філогенетичних зв'язків, структури екзонів/інтронів, а також консервативного домену в межах кожного сімейства ензимів та їхньої хромосомної локації. Аналіз *in silico* продемонстрував, що гени СОР гороху містять 26 мікросателітних локусів. Загалом це дослідження повідомляє про корисних кандидатних генів для покращення поживних якостей гороху за допомогою генетичної інженерії, а також про мікросателітні локуси для розвитку SSR маркерів для інтрогресії низьких характеристик СОР через маркерну селекцію.

Ключові слова: сімейство олігосахаридів рафінози, структура гену, синтаза рафінози, синтаза стахіози, синтаза галактинолу, філогенетичний аналіз гороху.

REFERENCES

- Angelovici R, Galili G, Fernie AR, Fait A (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci* 15:211–218
- Asif MI, Wani SA, Lone AA, Dar ZA, Nehvi FA Breeding for quality traits in grain legumes, in Conventional and non-conventional interventions in crop improvement, eds C.P. Malik, G. Sanghera, and S.H. Wani. (New Delhi: M D Publishers, 2013). Available online at: https://www.researchgate.net/publication/257645622_Breeding_for_Quality_Traits_in_Grain_Legumes.
- Blöchl A, Peterbauer T, Hofmann J, Richter A (2008) Enzymatic breakdown of raffinose oligosaccharides in pea seeds. *Planta* 228:99–110
- Blöchl A, Peterbauer T, Richter A (2007) Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds. *J Plant Physiol* 164:1093–1096
- dos Santos R, Vergauwen R, Pacolet P, Lescrier E, Van den Ende W (2013) Manninotriose is a major

- carbohydrate in red deadnettle (*Lamium purpureum*, Lamiaceae). *Ann Bot* 111:385–393
- Elango D, Rajendran K, Van der Laan L et al (2022) Raffinose Family Oligosaccharides: Friend or Foe for Human and Plant Health? *Front Plant Sci* 13: 829118
- Falavigna VDS et al (2018) Evolutionary diversification of galactinol synthases in Rosaceae: Adaptive roles of galactinol and raffinose during apple bud dormancy. *J Exp Bot* 69:1247–1259
- Filiz E, Ozyigit II, Vatansver R (2015) Genome-wide identification of galactinol synthase (GolS) genes in *Solanum lycopersicum* and *Brachypodium distachyon*. *Comput Biol Chem* 58:149–157
- Horbowicz M, Obendorf RL (1994) Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols – review and survey. *Seed Sci Res* 4:385–405
- Jones DA, DuPont MS, Ambrose MJ, Frias J, Hedley CL (1999) The discovery of compositional variation for the raffinose family of oligosaccharides in pea seeds. *Seed Sci Res* 9:305–310
- Kreplak J, Madoui MA, Cápál P et al (2019) A reference genome for pea provides insight into legume genome evolution *Nat Genet* 51:1411–1422
- Lahuta LB, Goszczynska J, Horbowicz M (2010) Seed α -D-galactosides of selected *Vicia* species and enzymes involved in their biosynthesis. *Acta Biol Crac Ser Bot* 52:27–35
- Le H, Nguyen NH, Ta DT, Le TNT, Bui TP, Le NT et al (2020) CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of Galactinol Synthase-Encoding Genes Reduces Raffinose Family Oligosaccharide Levels in Soybean Seeds. *Front Plant Sci* 11:612942
- Li R, Yuan S, He Y, Fan J, Zhou Y, Qiu T, Lin X, Yao Y, Liu J, Fu S, Hu X, Guo J (2018) Genome-Wide Identification and Expression Profiling Analysis of the Galactinol Synthase Gene Family in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Agronomy* 8:250
- Panikulangara TJ, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Stransky H, Schöfl F (2004) Galactinol synthase1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in Arabidopsis. *Plant Physiol* 136: 3148–3158
- Peterbauer T, Richter A (2001) Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Sci Res* 11:185–197
- Peterbauer T, Karner U, Mucha J, Mach L, Jones DA, Hedley CL et al (2003) Enzymatic control of the accumulation of verbascose in pea seeds. *Plant Cell Environ* 26:1385–1391
- Peters S, Mundree SG, Thomson JA, Farrant JM, Keller F et al (2007) Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): Both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. *J Exp Bot* 58:1947–1956
- Sengupta S, Mukherjee S, Basak P, Majumder AL (2015) Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Front Plant Sci* 6:656
- Sprenger N, Keller F (2000) Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: The role of two distinct galactinol synthases. *Plant J* 21:249–258
- Vidal-Valverde C, Frias J, Valverde S (1993) Changes in the carbohydrate composition of legumes after soaking and cooking. *J Am Diet Assoc* 93:47–550
- Vinson CC, Mota APZ, Porto BN et al (2022) Characterization of raffinose metabolism genes uncovers a wild *Arachis* galactinol synthase conferring tolerance to abiotic stresses. *Sci Rep* 10:15258
- You J, Wang Y, Zhang Y et al (2018) Genome-wide identification and expression analyses of genes involved in raffinose accumulation in sesame. *Sci Rep* 8:4331
- Zhou ML, Zhang Q, Zhou M, Sun ZM, Zhu XM, Shao JR, Tang YX and Wu YM (2012) Genome-wide identification of genes involved in raffinose metabolism in Maize. *Glycobiology* 22:1775–1785

Received December 05, 2022

Received February 15, 2023

Accepted January 18, 2024