

Генетические механизмы акклиматизации чайного растения (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) к холодовому стрессу

Л.С. Самарина , Л.С. Малюкова, М.В. Гвасалия, А.М. Ефремов, В.И. Маляровская, С.В. Лошкарёва, М.Т. Туов

Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур, Сочи, Россия
 e-mail: q11111w2006@yandex.ru

Проведен обзор публикаций о генетических механизмах, лежащих в основе холодоустойчивости чая и других видов высших растений. Холодовой стресс, включающий охлаждение (0...+15 °С) и заморозки (< 0 °С), нарушает метаболизм в клетках и тканях и ингибирует рост растений. Показано, что в последние десятилетия достигнут большой прогресс в понимании генетических механизмов ответа растений на холодовой стресс, были открыты ключевые гены – *ICE* (inducer of *CBF* expression), *CBF* (C-repeat-binding factor), *COR* (cold-regulated genes) – и их сигнальные пути. Установлено, что накопление транскриптов *CBF* происходит уже через 15 мин после начала воздействия низких температур, +4 °С, они играют важнейшую роль в холодовой акклиматизации чайного растения. Однако существует и *CBF*-независимый путь, включающий различные гены и транскрипционные факторы, такие как *HSFC1*, *ZAT12*, *CZF1*, *PLD* (фосфолипаза D), *WRKY*, *HD-Zip*, *CsLEA*, *LOX*, *NAC*, *HSP*, которые широко распространены у растений и вовлечены в базовые механизмы устойчивости чая к холоду и заморозкам. Обнаружено повышенное накопление транскриптов генов *CsDHN1*, *CsDHN2* и *CsDHN3* у устойчивых генотипов чая в сравнении с неустойчивыми сортами в период заморозков. Определена важная роль микроРНК в механизмах ответа на охлаждение и заморозки у чая. Генетический ответ растений на охлаждение и заморозки не одинаков, и экспрессия генов ответа носит генотип-специфический характер. Приведенные результаты исследований подчеркивают необходимость дальнейшего изучения механизмов, посредством которых различные гены регулируют устойчивость чая к холодовому стрессу, для выявления генетических маркеров устойчивости. Ключевые слова: *Camellia sinensis*; морозоустойчивость; регуляторные гены; *CBF*; транскрипционные факторы; генетические маркеры; селекция.

Для цитирования: Самарина Л.С., Малюкова Л.С., Гвасалия М.В., Ефремов А.М., Маляровская В.И., Лошкарёва С.В., Туов М.Т. Генетические механизмы акклиматизации чайного растения (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) к холодовому стрессу. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(8):958-963. DOI 10.18699/VJ19.572

Genes underlying cold acclimation in the tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)

L.S. Samarina , L.S. Malyukova, M.V. Gvasaliya, A.M. Efremov, V.I. Malyarovskaya, S.V. Loshkareva, M.T. Tuov

Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops, Sochi, Russia
 e-mail: q11111w2006@yandex.ru

The article reviews the latest studies showing the diversity of genetic mechanisms and gene families underlying the increased cold and frost tolerance of tea and other plant species. It has been shown that cell responses to chilling (0...+15 °С) and freezing (< 0 °С) are not the same and gene expression under cold stress is genotype-specific. In recent decades, progress has been made in understanding the genetic mechanisms underlying the cold response of plants – *ICE1* (inducer of *CBF* expression 1), *CBF* (C-repeat-binding factor), *COR* (cold-regulated genes) pathways and signaling have been discovered. The *ICE*, *CBF* and *DHN* gene groups play a key role in the cold acclimation of the tea plant. The accumulation of *CBF* transcripts occurs after 15 min of chilling induction, and longer cold stress leads to accumulation of *CBF* transcripts. It is shown that the transcripts of the *CsDHN1*, *CsDHN2* and *CsDHN3* genes accumulate at a higher level in resistant genotypes of tea in comparison with susceptible cultivars during freezing. *CBF*-independent pathways include genes involved in metabolism and transcription factors such as *HSFC1*, *ZAT12*, *CZF1*, *PLD* (phospholipase D), *WRKY*, *HD-Zip*, *CsLEA*, *LOX*, *NAC*, *HSP*, which are widely distributed in plants and are involved in the basic mechanisms of tea resistance to cold and frost. The most recent studies show an important role of miRNA in the mechanisms of response to chilling and freezing in tea. The data obtained on different plant species may correlate with the mechanisms of frost tolerance of tea and are the basis for future studies of the signaling pathways of response to cold in the tea plant. The results of

the research emphasize the need to further explore the ways in which various genes regulate the tolerance of tea to cold stress to find the molecular markers of frost tolerance.

Key words: *Camellia sinensis*; frost tolerance; regulatory genes; *CBF*; transcription factors; genetic markers; breeding.

For citation: Samarina L.S., Malyukova L.S., Gvasaliya M.V., Efremov A.M., Malyarovskaya V.I., Loshkareva S.V., Tuov M.T. Genes underlying cold acclimation in the tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(8):958-963. DOI 10.18699/VJ19.572 (in Russian)

Введение

Чайное растение (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) служит сырьем для получения одного из наиболее распространенных в мире безалкогольных напитков. Ареал возделывания этой многолетней древесной субтропической культуры распространился от тропических до умеренных климатических регионов Земли. В более северных широтах это растение подвергается воздействию холодного стресса в период зимних заморозков и весенних резких понижений температуры, которые совпадают с периодом вегетации и первым урожаем (Vyas, Kumar, 2005; Yue et al., 2015). Холодовой стресс, включающий охлаждение (0...+15 °C) и заморозки (< 0 °C), нарушает клеточный метаболизм, вызывая снижение скорости поглощения питательных веществ, скорости фотосинтеза; ингибирование роста растений; снижение урожая и качества чайного листа, что приводит к существенным экономическим потерям (Zheng et al., 2015). При холодном стрессе запускается ряд физиолого-биохимических и молекулярных защитных механизмов, препятствующих повреждению тканей и клеток растений.

Полное понимание этих механизмов для любой сельскохозяйственной культуры является ключом к созданию новых генотипов с повышенной устойчивостью. Поэтому проводятся многочисленные исследования в этой области, а в последние годы благодаря таким методам, как RNAseq, накоплен очень ценный материал, касающийся генетических механизмов устойчивости чая. Однако многие вопросы еще не выяснены, в частности различия механизмов устойчивости между генотипами, специфика механизмов ответа на охлаждение и заморозки, а также посттрансляционные процессы у чая (Zheng et al., 2015).

Морозоустойчивые сорта чая, как правило, имеют в основе своей устойчивости различные морфологические и физиолого-биохимические механизмы, обеспечивающие устойчивость к неблагоприятным абиотическим факторам. Некоторые сорта обладают более высокой концентрацией осмолитов в цитоплазме в период заморозков, другие характеризуются особыми приспособлениями на морфологическом уровне, а часть сортов включает механизмы адаптации на физиологическом уровне. При этом есть сорта, которые могут сочетать в себе сразу несколько механизмов, обеспечивающих их повышенную устойчивость (Dr. Janaki Mohotti, personal communication). В ряде исследований было показано, что экспрессия генов чая при холодном ответе и механизмы устойчивости качественно отличаются у неустойчивых и устойчивых сортов, т. е. носят генотип-специфический характер (Pennycuik et al., 2008; Eriksson, Webb, 2011). Другие исследователи приходят к заключению, что у неустойчивых сортов при холодном стрессе индуцируются те же процессы, что и

у морозоустойчивых, но значительно медленнее (Zhang et al., 2011). Однако в работах по функциональной геномике чая обычно используют только два генотипа, один устойчивый и один неустойчивый, и их транскриптом сравнивают в условиях холодного стресса, но такой подход не дает в полной мере выявить различия механизмов устойчивости у разных сортов.

В настоящей статье была поставлена цель – обобщить результаты исследований генетических механизмов устойчивости чая и других древесных культур к низкотемпературному стрессу для понимания главных факторов, лежащих в основе этого ценного признака.

Генетические механизмы устойчивости растений чая к холодному стрессу

В последние десятилетия достигнут большой прогресс в понимании генетических механизмов, обуславливающих ответ растений на холодный стресс. Выявлены основные гены-регуляторы ответа: *COR* (cold-responsive), *KIN* (cold-induced), *LTI* (low temperature induced) и *RD* (responsive to dehydration). Продукты этих генов можно классифицировать на две группы: первая включает белки *LEA* (late embryogenesis abundant proteins), *HSP* (heat shock proteins), антифриз-белки, белки транспорта липидов, дегидрины и осморегуляторы (сахара, свободные стеролы, раффиноза, глюкозиды, пролин, глицин бетаин); вторая – различные транскрипционные факторы, регулирующие передачу сигналов и экспрессию генов ответа на холод (Megha et al., 2018). Семейство генов *ICE* (inducer of *CBF* expression) – *CBF* (C-repeat-binding factor), *COR* (cold-regulated genes) – впервые изучили на модельном травянистом растении *Arabidopsis thaliana* (Thomashow, 1999), а затем его роль в ответе на различные виды стресса (холод, мороз, засуха и т. д.) была подтверждена у ряда древесных культур (Kitashiba et al., 2004; El Kayal et al., 2006), в том числе и у чая (Wang et al., 2012).

У чайного растения определено несколько ключевых генов, участвующих в процессах адаптации к низкотемпературному стрессу: *CsICE1* (FE861156), *CsCBF1* (EU563238), *CsCBF2* (KC702795) (Wang et al., 2012; Yuan et al., 2013). При сравнении ответных реакций контрастных по устойчивости к холоду сортов чая была установлена экспрессия различных генов: *CsCBF1* – у устойчивого к холоду сорта чая, *CsCBF2* – у неустойчивого (Wang et al., 2012; Ding et al., 2015). При этом высокий уровень экспрессии гена *CsCBF1* отмечен в результате подавления экспрессии *CsCBF2*, что свидетельствовало об антагонизме действия этих генов. Наряду с этим отсутствовали различия между сортами в экспрессии *CsICE1*, гена, участвующего в базовой регуляции морозостойкости растений.

Транскрипция генов группы *CBF*, в отличие от генов *ICE*, начиналась уже при +4 °C (Wang et al., 2012), что свидетельствовало о важной роли первых в процессе акклиматизации к холоду, а гены *ICE*, вероятно, больше отвечают за базовую морозостойкость растений. Возможно, что существуют какие-то *ICE*-подобные гены, чувствительные к изменению температуры и влияющие на транскрипцию *CBF1* и *CBF2*. Основная функция *CBF*, по-видимому, заключается в том, чтобы опосредовать адаптивные ответы при холодом воздействии, т. е. вызывать изменения, имеющие решающее значение для повышения устойчивости к холодному стрессу (Zhao et al., 2016; Zhao, Zhu, 2016). Выявлено, что накопление транскриптов *CBF* происходит уже через 15 мин после начала воздействия низких температур +4 °C, а отрицательные температуры приводят к дальнейшему их накоплению (Hua, 2016).

Гены группы *CBF* не только участвуют в повышении устойчивости к холоду, но также играют важную роль в ответе на другие абиотические факторы, в частности осмотический стресс (засуха, засоление и заморозки), приводящий к водному дефициту и повреждению клеточных мембран (Chinnusamy et al., 2003; Jia et al., 2016; Yin et al., 2016; Zhao et al., 2016).

Установлено, что мутанты арабидопсиса с гиперэкспрессией генов *CBF* имеют существенные различия по фенотипу. Отмечено ингибирование роста растений при повышении экспрессии этой группы генов (Acharid et al., 2008). Y. Yin с коллегами (2016) выявили, что гиперэкспрессия гена *CsCBF3* у арабидопсиса выражалась повышенной фотосинтетической активностью, карликовым фенотипом и темно-зеленым цветом листьев, что подтверждено другими авторами (Welling, Palva, 2006; Sharabi-Schwager et al., 2010).

До недавнего времени не представлялось возможным определить роль каждого отдельного гена группы *CBF*, так как они расположены последовательно один за другим, необходимо получить стабильные нулевые мутанты отдельно по этим генам для понимания роли каждого из них. Однако с появлением системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 удалось определить вклад каждого из трех генов *CBF* в механизмы холодоустойчивости (Ban et al., 2017). С применением геномного редактирования было выявлено, что выключение всех трех генов приводило к существенному повышению чувствительности растений к заморозку у *A. thaliana*. Главную роль в механизмах холодоустойчивости у *A. thaliana* из трех генов играет *CBF2* (Zhao et al., 2016; Zhao, Zhu, 2016). Однако у чая было показано, что из трех генов *CBF* наибольший вклад в механизмы холодоустойчивости вносит *CBF1* (Ban et al., 2017).

Тем не менее мутанты, у которых выключены все три гена *CBF*, не теряют полностью способности к холодной акклиматизации, что указывает на наличие *CBF*-независимого пути, вносящего вклад в механизмы холодоустойчивости (Jia et al., 2016; Zhao, Zhu, 2016).

Важное значение в ответе на холодом стресс имеет группа генов *DHNs*, кодирующих белки-дегидрины, которые могут действовать как криопротекторы, молекулярные шапероны, а также антиоксиданты (Ban et al., 2017).

Транскрипция генов *DHNs* коррелирует с повышенной холодоустойчивостью наряду с генами *CBF* (Paul, Kumar, 2013; Li Y.Y. et al., 2016). У чая были выделены гены *CsDHN1* (GQ228834.1), *CsDHN2* (FJ436978) и *CsDHN3* (KY270880) (Li Y.Y. et al., 2016) и показано, что их транскрипты накапливаются в большей степени у устойчивых генотипов чая, в сравнении с неустойчивыми сортами, в период заморозков (Li Y.Y. et al., 2016). Недавние исследования подтвердили, что ключевую роль у холодоустойчивых сортов чая играет высокая экспрессия *CsCBF1* в сочетании с генами группы *CsDHN* и накоплением сахарозы.

CBF-независимый путь может также включать другие гены метаболизма и транскрипционные факторы, такие как *HSFC1*, *ZAT12* и *CZF1* (Vogel et al., 2005; Park et al., 2015), *PLD* (фосфолипаза D) (Li et al., 2004), *WRKY* (Wang et al., 2016b), *HD-Zip* (Shen et al., 2018), *LOX* (Zhu et al., 2018), *LEA* (Wang et al., 2018), *NAC* (Wang et al., 2016a), которые играют важную роль в регуляции ответа на холодом стресс. Семейства *CPK* (calcium dependent protein kinases) и *CIPK* (*CBL*-interacting protein kinases) – гены протеинкиназ – также рассматриваются как положительные регуляторы ответа при заморозках, поскольку экспрессия этих генов повышалась в период заморозков у *Camellia japonica* (Li Q. et al., 2016). Имеются сообщения о том, что у чая при холодом ответе гены флавоноидного пути активизируются в большей степени, чем гены биосинтеза антоцианов (Wang et al., 2009).

Транскриптомный анализ обнаружил 33 транскрипционных фактора *HD-Zip* (гомеодоменсодержащих белков растений), участвующих в устойчивости к холоду чайного растения сорта Longjing43. Выявлено, что устойчивость к холоду может быть связана с генами *Cshdz* (Shen et al., 2018). Ряд транскрипционных факторов *bZIP* (с доменом типа «лейциновая застежка-молния», как правило, регулирует ответ на абсцизовую кислоту и гиббереллины) при холодом стрессе у арабидопсиса, риса и сои и может вносить вклад в холодом ответ у чайного растения. Гиперэкспрессия генов *GmbZIP1* и *AtABF3* из этой группы приводила к повышению у растений разных видов устойчивости к холоду, заморозкам, высоким температурам, окислительному стрессу и засухе (Kim et al., 2004; Gao et al., 2011). У чая ген *CsbZIP6* напрямую участвует в холодом ответе, в то время как ген *AtbZIP63* может быть включен в регуляторные пути и его роль требует дальнейшего изучения. У чайного растения 18 генов *CsbZIP* также экспрессируются в ответ на холод, засуху, засоление и другие стрессы (Cao et al., 2015), однако экспрессия этих генов, как и многих других, находится под сезонной регуляцией циркадных ритмов, которые в большой степени влияют на ответ клеток на холодом стресс (Wang et al., 2017).

Многие транскрипционные факторы семейства *WRKY* содержат так называемые цинковые пальцы и важны в регуляции ответа на низкие и высокие температуры, а также солевой стресс и засуху. У чайного растения был выделен новый ген этого семейства, *CsWRKY2*, экспрессия которого повышалась при холодом стрессе (+4 °C) параллельно с повышением концентрации АБК (Wang et al., 2016b). Установлено также, что ингибитор биосинтеза АБК снижал экспрессию *CsWRKY2*, на основании чего

был сделан вывод о важности этого гена в сигнальных путях с абсцизовой кислотой.

Группа белков *LEA* (белки позднего эмбриогенеза животных и растений) – большое и разнообразное семейство полипептидов, играющих значительную роль в регуляции роста и развития растений. При холодном стрессе у чая экспрессия генов этой группы повышалась, всего было выявлено 33 гена *CsLEA* (Wang et al., 2018).

Семейство белков NAC состоит из нескольких транскрипционных факторов и регулирует различные биологические процессы (передачу ауксинового сигнала и развитие меристем), в том числе адаптацию к различным стрессам. Было установлено, что экспрессия генов *ANAC019*, *ANAC055*, *ANAC072/RD26* у арабидопсиса индуцируется засухой, засолением, холодом и повышением содержания абсцизовой кислоты (Wang et al., 2016a). У двух изученных сортов чайного растения (Huangjinya – чувствительный и Yingshuang – устойчивый к холоду) при холодном стрессе происходило усиление экспрессии большинства генов *CsNAC*. Экспрессия таких генов, как *CsNAC2*, *CsNAC9*, *CsNAC12*, *CsNAC30*, *CsNAC44* и *CsNAC45*, постепенно повышалась и достигала максимума через 12–24 ч при +4 °C (Wang et al., 2016a). Экспрессия *CsNAC12* и *CsNAC18* у обоих сортов возрастала с меньшей скоростью (в два раза), в отличие от других генов (Wang et al., 2016a). У устойчивого сорта Yingshuang экспрессия генов *CsNAC17* и *CsNAC26* постепенно уменьшалась при холодном воздействии. При этом экспрессия гена *CsNAC32* снижалась у обоих сортов. Таким образом, выявленные профили экспрессии этих генов у чая позволяют предположить, что *CsNAC* контролируют комплекс регуляторных сетей генов и оказывают влияние на различные физиологические функции для адаптации к различным стрессам.

Исследования генов регуляции углеводного метаболизма в зимний период у чая показали, что в начале зимы происходит холодная акклиматизация, сопровождающаяся быстрым распадом крахмала и постепенным повышением содержания моно- и дисахаридов (сахарозы, фруктозы, глюкозы) в цитоплазме. Это осуществляется на фоне повышения экспрессии генов углеводного обмена, таких как ген бета-амилазы (*CsBAM*), инвертазы (*CsINV5*), ген синтеза раффинозы (*CsRS2*), участвующих в метаболизме крахмала, сахарозы и раффинозы соответственно. Одновременно повышалась и экспрессия генов транспорта углеводов, за исключением генов транспортеров сахаров *CsSWEET2*, *3*, *16*, генов раннего ответа на дегидратацию *CsERD6* и транспортера инозитола *CsINT2*, экспрессия которых снижалась. Интересно, что гены гексокиназ, *CsHKK3* и *CsHKK2*, участвующие в регуляции метаболизма сахаров, на начальной стадии акклиматизации к холоду имели противоположный характер экспрессии. Экспрессия этих генов в зимний период приводит к повышению концентрации в цитоплазме простых сахаров, снижению содержания крахмала (Yue et al., 2015), соотношение которых меняется на обратное во время потепления. При акклиматизации растений чая к зимним заморозкам ряд генов, *CsSPS*, *CsRS2* и *CsINV5*, связанных с синтезом углеводов, также усиленно экспрессируется (Yue et al., 2015). У более устойчивых сортов транскрипты этих генов накапливаются в цитоплазме, а у неустойчивых

экспрессия этих генов не меняется. Поэтому данные гены рассматриваются как генотип-специфичные маркеры холодостойкости и могут использоваться в селекции чая.

Белки теплового шока *HSPs* (heat shock proteins) – вездесущие белки в клетках растений, роль которых сначала сводилась к тепловому стрессу, но теперь стало известно, что они играют важную роль в ответе на разные биотические и абиотические стрессы, помогают поддерживать стабильность клеточных мембран. Установлено, что у арабидопсиса экспрессия *HSP90* существенно повышается в условиях жары, холода, засоления, воздействия тяжелых металлов, окислительного стресса (Chen et al., 2018). У чая также было выявлено 47 генов *CsHSP* из семейств *HSP90*, *HSP70* и *sHSP* и отмечена их важная функция в регуляции роста и ответа на засуху и экстремальные температуры.

В последние годы многими исследователями подтверждено, что различные микроРНК активно участвуют в защитных реакциях растений (Zheng et al., 2015). У чайного растения описаны 233 микроРНК, дифференциально экспрессирующихся при холодном стрессе. Показано, что чем сильнее холодное воздействие, тем большее количество микроРНК вовлечено в ответ. Определена консервативная функция большинства идентифицированных микроРНК: при разной степени холодного воздействия выявлены разные микроРНК, перекрытия механизмов ответа на холод и заморозки не происходило. Обнаружено, что в большинстве случаев количество микроРНК, образованной при холодном стрессе, обратно пропорционально количеству целевой мРНК.

Холодовая акклиматизация влияет на состав липидов в плазматической мембране клеток (Li et al., 2008). У *Camellia japonica* в ответ на заморозки наблюдалось повышение экспрессии генов, участвующих в биосинтезе ненасыщенных жирных кислот (Li Q. et al., 2016). Ненасыщенность жирных кислот контролируется транскрипцией ключевых генов десатуразы – *FAD2-3* (Kargiotidou et al., 2008). У холодоустойчивого сорта чая при индукции стресса экспрессия гена десатуразы *CsFAD8* была выше по сравнению с неустойчивым (Wang et al., 2012).

Семейство генов липоксигеназ *LOX* (*9-LOX*, *13-LOX* и *9/13 LOX*), как известно, отвечает за катаболизм липидов, синтез оксипипина, который выполняет защитную функцию опосредованно через ален-оксид-синтетазу (AOS) и гидропероксид лиазу (HPL) для синтеза жасмоновой кислоты и С6-альдегидов (Li Q. et al., 2016). При низких температурах жасмоновая кислота может предотвратить повреждение тканей, задерживая активные формы кислорода и перекиси водорода, регулируя аскорбат-глутатионовый цикл и активируя важные гены, такие как *MYC2* (включенный в сигнальные пути абсцизовой и жасмоновой кислот), *AP2/ERF* (большое семейство транскрипционных факторов, вовлеченных в передачу этиленового сигнала и регуляцию развития цветков и семян) (Wu et al., 2015) или *WRKY* (Li et al., 2017). Было показано, что экспрессия генов *LOX* индуцируется низкими температурами, у чайного растения гены *CsLOX6* и *CsLOX7* могут участвовать в синтезе жасмоновой кислоты. Абсцизовая кислота не влияла на экспрессию генов *CsLOX1*, *CsLOX6* и *CsLOX7*, что может свидетельствовать об отсутствии

АБК-зависимого элемента (*ABREs*) в промоторах этих генов. В условиях холодного стресса при +4 °C у чая обнаружено накопление транскриптов генов *CsLOX1*, *CsLOX6* и *CsLOX7*, при этом наибольший уровень их экспрессии отмечался через 9, 6 и 12 ч соответственно (Zhu et al., 2018). У родственного вида *Camellia japonica* обнаружен похожий механизм ответа – экспрессия генов биосинтеза жасмоновой кислоты *LOX3*, *AOS1*, *AOS2*, *AOC2*, *AOC3*, *OPR3*, *OPCL1*, *ACX2* и *ACAA1* повышалась в условиях холодного стресса, как следствие, происходило накопление свободной жасмоновой кислоты в листьях.

Для выявления корреляции между ответом на холод и ответом на заморозки у чая выполнена функциональная оценка дифференциальной экспрессии мРНК. Анализ транскриптомов чая по базам KEGG подтвердил, что при низких положительных температурах активируются процессы углеводного обмена, фосфорилирования белков, биосинтеза гликана, гормональной передачи сигнала, регуляции фотосинтеза, МАРК-опосредованной передачи сигналов, метаболизма ксенобиотиков, метаболизма глутатиона. При ответе на заморозки активируются гены фосфорилирования, ауксин-опосредованный путь передачи сигнала, гены регуляции транскрипции, углеводного метаболизма, гены регуляции цветения, а также гены метаболизма и биосинтеза гликана. При холодном стрессе, вызванном низкими положительными температурами, происходит активация транскрипции, а в ответ на заморозки – ее подавление (Zheng et al., 2015). Было показано, что некоторые механизмы ответа чая на холод и заморозки перекрываются, но другие ключевые биологические процессы, относящиеся к передаче сигналов (МАРК-каскад, АБК-активация), процессы углеводного обмена и метаболизм активных форм кислорода (распад перекиси водорода), а также фотосинтез при этих воздействиях протекали по-разному.

Заключение

Таким образом, в настоящее время экспериментально подтверждены многие механизмы устойчивости растений чая к холодному стрессу и определена роль ключевых генов, лежащих в основе устойчивости. Тем не менее очевидна необходимость дальнейшего изучения путей, посредством которых различные гены регулируют устойчивость чая к холодному стрессу и установлению вклада отдельных генов в этот признак. Каков относительный вклад семейств перечисленных генов в морозоустойчивость чая? Какова регуляторная архитектура их транскрипционных факторов? И как изменения экспрессии этих генов связаны с биохимическими, биофизическими и клеточными изменениями, которые в конечном итоге приводят к морозоустойчивости сортов? Эти вопросы остаются открытыми.

Список литературы / References

Achard P., Gong F., Cheminant S., Alioua M., Hedden P., Genschik P. The cold-inducible *CBF1* factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell*. 2008;20:2117-2129.
Ban Q., Wang X., Pan C., Wang Y., Kong L., Jiang H., Xu Y., Wang W., Pan Y., Li Y., Jiang Ch. Comparative analysis of the response and gene regulation in cold resistant and susceptible tea plants. *PLoS One*. 2017;12(12):e0188514. DOI 10.1371/journal.pone.0188514.

Cao H., Wang L., Yue C., Hao X., Wang X., Yang Y. Isolation and expression analysis of 18 *CsbZIP* genes implicated in abiotic stress responses in the tea plant (*Camellia sinensis*). *Plant Physiol. Biochem*. 2015;97:432-442.
Chen J., Gao T., Wan S., Zhang Y., Yang J., Yu Y., Wang W. Genome-wide identification, classification and expression analysis of the *HSP* gene superfamily in tea plant (*Camellia sinensis*). *Int. J. Mol. Sci*. 2018;19:2633. DOI 10.3390/ijms19092633.
Chinnusamy V., Ohta M., Kanrar S., Lee B.H., Hong X., Agarwal M., Zhu J.K. *ICE1*: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev*. 2003;17:1043-1054.
Ding Z., Li C., Shi H., Wang H., Wang Y. Pattern of *CsICE1* expression under cold or drought treatment and functional verification through analysis of transgenic *Arabidopsis*. *Genet. Mol. Res*. 2015;14:11259-11270.
El Kayal W., Navarro M., Marque G., Keller G., Marque C., Teulieres C. Expression profile of *CBF*-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold. *J. Exp. Bot*. 2006;57:2455-2469.
Eriksson M.E., Webb A.A.R. Plant cell responses to cold are all about timing. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2011;14:731-737.
Gao S.Q., Chen M., Xu Z.S. The soybean *GmbZIP1* transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. *Plant Mol. Biol*. 2011;75:537-553.
Hua J. Defining roles of tandemly arrayed *CBF* genes in freezing tolerance with new genome editing tools. *New Phytol*. 2016;212:301-302.
Jia Y., Ding Y., Shi Y., Zhang X., Gong Z., Yang S. The *cbfs* triple mutants reveal the essential functions of *CBFs* in cold acclimation and allow the definition of *CBF* regulons in *Arabidopsis*. *New Phytol*. 2016;212:345-353.
Kargiotidou A., Deli D., Galanopoulou D., Tsaftaris A., Farmaki T. Low temperature and light regulate *delta 12* fatty acid desaturases (FAD2) at a transcriptional level in cotton (*Gossypium hirsutum*). *J. Exp. Bot*. 2008;59:2043-2056. DOI 10.1093/jxb/ern065.
Kim J., Kang J.Y., Kim S.Y. Over-expression of a transcription factor regulating ABA-responsive gene expression confers multiple stress tolerance. *Plant Biotechnol. J*. 2004;2:459-466.
Kitashiba H., Ishizaka T., Isuzugawa K., Nishimura K., Suzuki T. Expression of a sweet cherry *DREB1/CBF* ortholog in *Arabidopsis* confers salt and freezing tolerance. *J. Plant Physiol*. 2004;161:1171-1176.
Li L., Lu X., Ma H., Lyu D. Jasmonic acid regulates the ascorbate–glutathione cycle in *Malus baccata* Borkh. roots under low root-zone temperature. *Acta Physiol. Plant*. 2017;39:174.
Li Q., Lei S., Du K., Li L., Pang X., Wang Zh., Wei M., Fu S., Hu L., Xu L. RNA-seq based transcriptomic analysis uncovers α -linolenic acid and jasmonic acid biosynthesis pathways respond to cold acclimation in *Camellia japonica*. *Sci. Rep*. 2016;7(6):36463. DOI 10.1038/srep36463.
Li W.Q., Li M.Y., Zhang W.H., Welti R., Wang X.M. The plasma membrane-bound phospholipase D delta enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol*. 2004;22:427-433. DOI 10.1038/nbt949.
Li W.Q., Wang R.P., Li M.Y., Li L.X., Wang C.M., Welti R., Wang X. Differential degradation of extraplastidic and plastidic lipids during freezing and post-freezing recovery in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem*. 2008;283:461-468. DOI 10.1074/jbc.M706692200.
Li Y.Y., Zhou Y.Q., Xie X.F., Shu X.T., Deng W.W., Jiang C.J. Cloning and transcription analysis of dehydrin gene (*CsDHN*) in tea plant (*Camellia sinensis*). *J. Agric. Biotechnol*. 2016;24:332-341.
Megha S., Basu U., Kav N.N.V. Regulation of low temperature stress in plants by microRNAs. *Plant Cell Environ*. 2018;41:1-15.
Park S., Lee C.M., Doherty C.J., Gilmour S.J., Kim Y., Thomashow M.F. Regulation of the *Arabidopsis CBF* regulon by a complex low-temperature regulatory network. *Plant J*. 2015;82:193-207.
Paul A., Kumar S. Dehydrin2 is a stress-inducible, whereas Dehydrin1 is constitutively expressed but up-regulated gene under varied cues

- in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. Mol. Biol. Rep. 2013;40:3859-3863. DOI 10.1007/s11033-012-2466-2.
- Pennycooke J.C., Cheng H., Stockinger E.J. Comparative genomic sequence and expression analyses of *Medicago truncatula* and alfalfa subspecies falcata *COLD-ACCLIMATION-SPECIFIC* genes. Plant Physiol. 2008;146:1242-1254. DOI 10.1104/pp.107.108779.
- Sharabi-Schwager M., Samach A., Porat R. Overexpression of the *CBF2* transcriptional activator in *Arabidopsis* counteracts hormone activation of leaf senescence. Plant Signal Behav. 2010;5(3):296-309.
- Shen W., Li H., Teng R., Wang Y., Wang W., Zhuang J. Genomic and transcriptomic analyses of *HD-Zip* family transcription factors and their responses to abiotic stress in tea plant (*Camellia sinensis*). Genomics. 2018. DOI 10.1016/j.ygeno.2018.07.009.
- Thomashow M.F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1999;50:571-599.
- Vogel J.T., Zarka D.G., Van Buskirk H.A., Fowler S.G., Thomashow M.F. Roles of the *CBF2* and *ZAT12* transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. Plant J. 2005;41:195-211.
- Vyas D., Kumar S. Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) clone with lower period of winter dormancy exhibits lesser cellular damage in response to low temperature. Plant Physiol. Biochem. 2005;43:383-388.
- Wang L., Cao H., Qian W., Yao L., Hao X., Li N., Yang Y., Wang X. Identification of a novel *bZIP* transcription factor in *Camellia sinensis* as a negative regulator of freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis*. Ann. Bot. 2017;119:1195-1209.
- Wang L., Li X., Zhao Q., Jing Sh., Chen Sh., Yuan H. Identification of genes induced in response to low-temperature treatment in tea leaves. Plant Mol. Biol. Rep. 2009;27:257-265. DOI 10.1007/s11105-008-0079-7.
- Wang W., Gao T., Chen J., Yang J., Huang H., Yu Y. The late embryogenesis abundant gene family in tea plant (*Camellia sinensis*): Genome-wide characterization and expression analysis in response to cold and dehydration stress. Plant Physiol. Biochem. 2018;135:277-286. DOI 10.1016/j.plaphy.2018.12.009.
- Wang Y., Jiang C.J., Li Y.Y., Wei C.L., Deng W.W. CsICE1 and CsCBF1: two transcription factors involved in cold responses in *Camellia sinensis*. Plant Cell Rep. 2012;31:27-34. DOI 10.1007/s00299-011-1136-5.
- Wang Y.-X., Liu Z.-W., Wu Z.-J., Li H., Zhuang J. Transcriptome-wide identification and expression analysis of the *NAC* gene family in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] PLoS One. 2016a;11(11):e0166727. DOI 10.1371/journal.pone.0166727.
- Wang Y., Shu Z., Wang W., Jiang X., Li D., Pan J., Li X. *CsWRKY2*, a novel *WRKY* gene from *Camellia sinensis*, is involved in cold and drought stress responses. Biol. Plant. 2016b;60:443-451. DOI 10.1007/s10535-016-0618-2.
- Welling A., Palva E.T. Molecular control of cold acclimation in trees. Physiol. Plant. 2006;127:167-181.
- Wu Zh., Li X., Liu Zh., Li H., Wang Y., Zhuang J. Transcriptome-based discovery of *AP2/ERF* transcription factors related to temperature stress in tea plant (*Camellia sinensis*) Funct. Integr. Genomics. 2015;15(6):741-752. DOI 10.1007/s10142-015-0457-9.
- Yin Y., Ma Q., Zhu Z., Cui Q., Chen Ch., Chen X., Fang W., Li X. Functional analysis of *CsCBF3* transcription factor in tea plant (*Camellia sinensis*) under cold stress. Plant Growth Regul. 2016;80:335. DOI 10.1007/s10725-016-0172-0.
- Yuan H.Y., Zhu X.P., Zeng W., Yang H.M., Sun N., Xie S.X., Cheng L. Isolation and transcription activation analysis of the *CsCBF1* gene from *Camellia sinensis*. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica. 2013;110:147-151.
- Yue C., Cao H.L., Wang L., Zhou Y.H., Huang Y.T., Hao X.Y., Wang Y.C., Wang B., Yang Y.J., Wang X.C. Effects of CA on sugar metabolism and sugar-related gene expression in tea plant during the winter season. Plant Mol. Biol. 2015;88:591-608. DOI 10.1007/s11103-015-0345-7.
- Zhang L.L., Zhao M.G., Tian Q.Y., Zhang W.H. Comparative studies on tolerance of *Medicago truncatula* and *Medicago falcata* to freezing. Planta. 2011;234:445-457. DOI 10.1007/s00425-011-1416-x.
- Zhao Ch., Zhang Zh., Xie Sh., Si T., Li Y., Zhu J. Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 2016;171:2744-2759.
- Zhao Ch., Zhu J. The broad roles of *CBF* genes: From development to abiotic stress. Plant Signal. Behav. 2016;11:8. DOI 10.1080/15592324.2016.1215794.
- Zheng C., Zhao L., Wang Y., Shen J., Zhang Y., Jia S., Li Y., Ding Z. Integrated RNA-Seq and sRNA-Seq analysis identifies chilling and freezing responsive key molecular players and pathways in tea plant (*Camellia sinensis*). PLoS One. 2015;10(4):e0125031. DOI 10.1371/journal.pone.0125031.
- Zhu J., Wang X., Guo L., Xu Q., Zhao S., Li F., Yan X., Liu Sh., Wei Ch. Characterization and alternative splicing profiles of the lipoxigenase gene family in tea plant (*Camellia sinensis*). Plant Cell Physiol. 2018;59(9):1765-1781. DOI 10.1093/pcp/pcy091.

ORCID ID

L.S. Samarina orcid.org/0000-0002-0500-1198

Acknowledgements. This work was supported by the Russian Science Foundation, project 18-76-10001.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received November 6, 2018. Revised May 21, 2019. Accepted June 14, 2019.