УДК 633.72.58.085 DOI: 10.31360/2225-3068-2024-89-153-166
EDN ZHOPJS

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ МИКРОРАСТЕНИЙ ЧАЯ (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE), ВЫЗВАННАЯ ДЕЙСТВИЕМ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА *IN VITRO*

Самарина Л.С., Гвасалия М.В.

Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук», г. Сочи, Россия, e-mail: m.v.gvasaliya @mail.ru

Самарина Л.С. orcid.org/ 0000-0002-0500-1198
Гвасалия М.В. orcid.org/0000-0001-7394-4377

Осмотический стресс, вызванный засухой, является основным абиотическим фактором окружающей среды, снижающим рост и урожайность растений чая. Поэтому основные исследования по селекции чая направлены на создание новых сортов, устойчивых к водному дефициту. Современные биотехнологические приёмы могут повысить эффективность традиционных методов при создании новых генотипов, как доноров устойчивости к этому стрессовому фактору. При получении форм, устойчивых к засухе, в питательную среду для моделирования действия стресса *in vitro,* вводится определённый селективный фактор. В настоящем исследовании для выявления генетических реакций у микропобегов чая *in vitro* осмотический стресс был вызван добавлением маннита в питательную среду. Было установлено, что уровень экспрессии таких генов, как DHN2, LOX1, LOX6, BAM, SUS1, TPS11, RS1, RS2 и SnRK1.3 был повышен в 2–10 раз при осмотическом стрессе, вызванном маннитом, в то время как экспрессия многих других генов, связанных со стрессом, существенно не изменялась. Вместе с тем наблюдалось подавление следующих генов: bHLH12, bHLH7, bHLH21, bHLH43, CBF1, WRKY2, SWEET1, SWEET2, SWEET3, INV5 и LOX7. В ходе этого исследования были обнаружены две основные группы генов с высокой степенью корреляции. Первая группа включала семь генов, а именно: CBF1, DHN3, HXK2, SnRK1.1, SPS, SWEET3 и SWEET1. В состав второй группы входили восемь генов, в том числе: DHN2, SnRK1.3, HXK3, RS1, RS2, LOX6, SUS4 и BAM5. Высокий уровень корреляции указывает на высокую прочность связи генов, которые могут совместно экспрессироваться или могут быть связаны с регулонами. Настоящее исследование демонстрирует, что микропобеги чая проходят ряд адаптаций, чтобы справиться с осмотическим стрессом *in vitro*. Однако некоторые важные гены, которые ассоциируются со стрессом, были отключены или подавляли осморегуляцию в микропобегах. Из 31 изученного гена, 9 генов (DHN2, BAM, SUS4, RS1, RS2, SnRK1.3, TPS11, LOX1 и LOX6) значительно

активировались в листьях микропобегов чая под действием маннита, шесть из них связаны с метаболизмом сахара. Эти гены могут быть предложены в качестве надёжных маркеров реакции чайного растения на засуху.

Ключевые слова: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, микропобеги чая *in vitro,* осмотический стресс *in vitro*, маннит, селективные среды, экспрессия генов.

Введение. Растение чая (*Camellia sinensis* L.) выращивается в промышленных масштабах более чем в 60 странах мира, на пяти континентах, от 49° северной широты в Украине, до 33° южной широты в Южной Африке [25] и является одной из наиболее важных сельскохозяйственных культур, возделываемых в Китае, Индии, Шри-Ланке, Кении и некоторых других странах, включая Турцию, Азербайджан, Грузию и Россию.

Место сбора зародышевой плазмы кавказского чая (44°36'40" северной широты 40°06'40" восточной долготы) расположено в пограничном регионе возможного производства чая и может быть источником наиболее толерантных генотипов [20]. В большинстве производящих стран, чайные плантации страдают от засухи, которая значительно влияет на урожайность и качество готовой продукции. Необходимо выработать стратегию, направленную на селекцию новых генотипов, отличающихся высокой засухоустойчивостью. Это возможно благодаря более глубокому изучению и пониманию ключевых вопросов действия механизмов толерантности к определённым стрессовым факторам [23]. Засуха, засоление и холод являются тремя основными факторами, снижающими рост и урожайность сельскохозяйственных культур [19, 24]. Негативное воздействие этих факторов объясняется, прежде всего, снижением водного потенциала растительных клеток, вызывающим осмотический стресс. А он в свою очередь окисляет растительные ткани и приводит к образованию активных форм кислорода (АФК). Растения в процессе эволюции выработали механизмы, позволяющие уменьшить их окислительное повреждение, за счёт активации антиоксидантных ферментов и накопления осмолитов, которые эффективно поглощают АФК [19, 24]. Осмотический стресс приводит к изменениям, которые происходят прежде всего на молекулярном уровне клетки. Эти изменения включают восприятие и передачу сигналов, экспрессию генов и метаболические изменения, которые приводят к устойчивости к стрессу [11]. Многочисленные гены вовлечены в реакцию растения на осмотический стресс, и часто её бывает трудно проанализировать в полевых или тепличных условиях, из-за сложной и изменчивой природы этих стрессов [5, 19]. Особенно актуально это для многолетних древесных культур, у которых реакция на стресс более сложная, по

сравнению с травянистыми растениями. Индукция стресса *in vitro* является дополнительным инструментом, который может помочь в глубоком исследовании генетических реакций тканей растений на каждый стрессовый фактор в контролируемой среде [19].

Применение осмотически активных соединений в культуре тканей является довольно эффективным методом для изучения последствий осмотического стресса. Полиэтиленгликоль (ПЭГ), маннит, сорбит и NaCl широко применяются для стимуляции осмотического стресса в изучении реакций на него растений [7]. Эти вещества способны проникать в клетки и легко продвигаться к побегу и листьям. Вместе с тем, ПЭГ с более высокой молекулярной массой – 3 000 М не может проходить через апопластический барьер клетки и его осмотический стресс менее выражен, особенно в листьях [7]. Маннит является многоатомным спиртом, и его добавление в количестве 50–200 ммоль в питательную среду ингибирует рост и увеличивает период субкультуривания многих культур [5, 4, 16]. Высокая концентрация маннита снижает водный потенциал питательной среды и затрудняет поступление воды в ткани растений, вызывая таким образом осмотический стресс. Маннит широко используется во многих исследованиях для изучения реакции различных видов растений на осмотический стресс *in vitro* [9]. Однако о реакции на осмостресс древесных культур, в частности чайного растения, имеется ограниченная информация. В настоящее время выявлены многочисленные генетические маркеры реакции растений на осмотический стресс у многих сельскохозяйственных культур, включая чай. Проведённые транскриптомные исследования помогли выявить экспрессируемые гены и возможные маркеры стрессоустойчивости у растений чая. Установлено, что многие транскрипционные факторы (TFs) и гены, связанные с метаболитами, вовлечены в реакцию чайного растения на осмотический стресс. Гены, вовлеченные в ABA-независимый чувствительный путь и bZIP-опосредованный ABA-зависимый путь, участвуют в толерантности к осмотическому стрессу, индуцированному засухой и холодом [26]. Считается, что в реакции на осмотический стресс у чайных растений участвуют 12 основных семейств TF, а именно AP2/EREBP, bHLH, bZIP, HD-ZIP, HSF (HSP), MYB, NAC, WRKY, белок TFs, SCL, ARR и SPL. Многие гены метаболизма глюкозы также были индуцированы в ответ на осмотический стресс у растений чая [31]. Большинство из этих генов были выявлены с использованием полевых экспериментальных данных и на комнатных растениях в климатических камерах, поэтому валидация методом *in vitro* может помочь лучше понять их участие в реакции на стресс. Подходы к культивированию

тканей могут стать многообещающим инструментом для валидации и верификации выявленных генетических маркеров у растений чая.

Цель исследований – оценить осмотический эффект, вызванный маннитом, и оценить уровень экспрессии 31 гена чая, чувствительного к осмотическому стрессу.

Объекты и методы исследований. Растительный материал для исследования был получен из коллекции гермоплазмы Субтропического научного центра Российской академии наук. В работе использовали микропобеги лучшего местного генотипа – сорта ‘Колхида’, которые вегетативно размножались *in vitro* в течение 2 лет. Культуральной средой служила Мурасиге-Скуга (MS) [17] с добавлением бензиламинопурина (6 мг/л), нафтилуксусной кислоты (1 мг/л), гиббереллиновой кислоты (2 мг/л), сахарозы (30 г/л) и агара (8 г/л), кислотность среды pH 5,7 [1]. В качестве эксплантов использовали микропобеги – высотой 2,0–3,0 см, с 3–5 полностью развитыми листьями.

В качестве контрольной обработки использовали культуральную среду, состоящую из МС + НУК 0,5 мг/л, агара 8 г/л, сахарозы 30 г/л, pH 5,7. Экспериментальные среды были теми же, но с добавлением 200–300 ммоль маннита. Микропобеги культивировали в стеклянных ёмкостях – 150 мл, по 20 мл питательной среды в каждой, по 3 растения в сосуде, в течение 2 месяцев перед отбором проб. В климатическом помещении поддерживались определённые условия: температура 22–25 °С, режим освещения 16 ч света и 8 ч темноты, интенсивность света 3 000 лк. Обработка экспериментальных данных проводилась дважды, всего за каждый год исследования было включено 300 сосудов по 3 растения в каждом. Листья, собранные с микропобегов чая, собирали рандомно и использовали для экстракции РНК.

Анализ экспрессии генов – тотальную РНК экстрагировали из 200 мг свежих листьев с использованием протокола CTAB [8] с небольшими модификациями: были удалены этапы обработки меркаптоэтанолом и протеиназой К. Концентрацию и качество РНК определяли с помощью спектрофотометра BioDrop µLite, а целостность РНК оценивали электрофорезом в агарозном геле. Образцы РНК растворяли и обрабатывали ДНКазой I по коммерческой инструкции («Биолабмикс», Россия, http://biolabmix.ru/), а обратную транскрипцию проводили с помощью набора MMLV-RT по инструкции («Биолабмикс», Новисибирск, Россия). http://biolabmix.ru/). Эффективность обработки DNaseI и обратной транскрипции проверяли с помощью электрофореза в агарозном геле и с помощью qRT – ПЦР Только те образцы, которые подтвердили отсутствие загрязнения геномной ДНК, были включены в дальнейший анализ экспрессии генов. Всего в анализ был включен 31 ген *Camellia*

sinensis, связанный с осмотическим стрессом. Гены и последовательности праймеров перечислены в дополнительной таблице S2. Актин [10] был взят в качестве эталонного гена, и результаты были количественно оценены с использованием анализатора Light Cycler 96 (Roche, Германия/Швейцария). ПЦР проводили в 96-луночных планшетах Roche LightCycler. Каждая реакционная смесь содержала 7,5 мкл 2 × буфера SybrGreen BioMaster. HS-qPCR (Биолабмикс, Новисибирск, Россия, http://biolabmix.ru/), 1 мкл разведённой кДНК, 0,2 мкл прямого праймера (10 мкМ), 0,2 мкл обратного праймера (10 мкМ) и 6,1 мкл ddH2O, общим объёмом 15 мкл. Для всех генов применялись следующие условия амплификации: 1 цикл при 95 °С в течение 5 мин, 40 циклов при 95 °С – 10 с, 60 °С – 30 с, затем 1 цикл при 72 °С – 120 с, 60 °С – 180 с и 97 °С – 1 с. В качестве отрицательного контроля использовали воду, не содержащую РНКазы. В наших анализах каждый биологический образец имел три биологические повторности, а каждая биологическая повторность имела три технические повторности. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали по формуле Ливак и Шмиттген [15], с использованием алгоритма: $2^{-\Delta\Delta Cq}$, где: ΔΔCq = (Cq*gene of interest* ⁻ q*internal control*) *treatment* ⁻ (Cq*gene of interest* ⁻ Cq*internal control*) *control.*

Статистический анализ повторялся дважды, с тремя-пятью биологическими повторностями и тремя техническими повторностями, и проводился с использованием программного обеспечения XLSTAT (Addinsoft, Нью-Йорк, США). Для оценки данных и подтверждения значимых различий (на уровне $p < 0,05$) между профилями экспрессии генов и биохимическими веществами были использованы t-критерий Стьюдента, корреляционные тесты Спирмена и иерархическая кластеризация Уорда.

Результаты и их обсуждение. В процессе эволюции растения выработали множество адаптивных механизмов толерантности к дефициту воды, таких как поддержание эффективности водопользования, осмотическая регуляция и защита клеточного аппарата.

Целью нашего исследования было оценить влияние маннита (200 и 300 ммоль) на профиль экспрессии генов, связанных с осмотическим стрессом микропобегов чая *in vitro.* Большинство из этих генов были выбраны по причине их высокой информативности, как маркеры устойчивости чайного растения к холоду или засухе [31]. Эти гены вовлечены в реакцию на холод у кавказских генотипов чая [21]. Были проанализированы профили экспрессии этих генов у микропобегов чая и установлены корреляции между биохимическими и генетическими реакциями при обработке маннитом *in vitro.*

Тридцать один ген, связанный с осмотическим стрессом, был разделен на три группы (кластер 1, кластер 2 и кластер 3) на основе профилей экспрессии (рис. 1).

Group	Gene	Control	Mannitol 200	Mannitol 300
CLUSTER 1	CBF1	1[a]	0.28[b]	0.32[b]
	bHLH12	1[a]	0.21[b]	0.12[b]
	bHLH21	1[a]	0.25[b]	0.22[b]
	WRKY2	1[a]	0.30[b]	0.25[b]
	HXK2	1[a]	0.18[b]	0.23[b]
	SWEET1	1[a]	0.10[b]	0.06[b]
	SWEET2	1[a]	0.14[b]	0.11[b]
	SWEET3	1[a]	0.02[b]	0.02[b]
	INV5	1[a]	0.34[b]	0.26[b]
	LOX7	1[a]	0.19[b]	0.05[b]
CLUSTER 2	bHLH43	1	0.59	0.45
	SnRK1.2	1	0.59	0.55
	NAC30	1	0.88	0.53
	HXK1	1	0.75	0.67
	SnRK1.1	1	0.78	0.84
	SPS	1	0.71	0.88
	DHN3	1	0.85	0.89
	NAC17	1	1.47	0.84
	DHN1	1	1.20	0.80
	NAC26	1	1.53	1.26
	bHLH7	1	1.00	1.00
	HXK3	1	1.15	1.56
CLUSTER 3	BAM5	1[b]	1.65[a]	1.80[a]
	SUS4	1[b]	1.99[a]	2.04[a]
	RS1	1[b]	1.07[b]	1.98[a]
	SnRK1.3	1[b]	2.28[a]	2.69[a]
	LOX6	1[c]	2.45[b]	3.33[a]
	DHN2	1[c]	2.71[b]	3.92[a]
	LOX1	1[c]	5.00[a]	3.65[b]
	TPS11	1[b]	4.95[a]	4.81[a]
	RS2	1[c]	9.95[b]	12.65[a]

Рис. 1. Профиль экспрессии генов и тепловая карта относительных уровней экспрессии генов микропобегов чая под действием маннита 200 и 300 мМ. Разные строчные буквы указывают на достоверные различия при $p < 0,05$ ($n = 60$)

Fig. 1. Gene expression profile and the heat map of the relative gene expression levels of tea microshoots under the effect of mannitol 200 and 300 mM. Different small letters indicate significant differences at $p < 0.05$ ($n = 60$)

Кластер 1 включал 10 генов (CBF1, bHLH12, bHLH21, WRKY2, HXK2, SWEET1,2,3, INV5, LOX7), которые под действием маннита были подавлены в микропобегах чая. Второй кластер объединял 12 генов без изменений уровня экспрессии в средах с добавлением маннита. Большинство транскрипционных факторов (TFs) были либо подавлены, либо не реагировали у растений, выращенных на среде с добавлением маннита. Наконец, кластер 3 включал девять генов (DHN2, BAM, SUS4, RS1, RS2, SnRK1.3, TPS11, LOX1, LOX6), экспрессия которых в чайных листьях повышалась в 1,7–12,7 раза под действием маннита. Значительная разница между двумя вариантами маннита была также обнаружена в генах LOX1, LOX6, DHN2 и RS2. Более того, самая высокая экспрессия генов LOX6, DHN2 и RS2 наблюдалась при большей концентрации маннита.

Корреляционный анализ реакций на маннит показал несколько значительных положительных корреляций между биохимическими соединениями и генами в микрорастениях чая. Например, теонин и галлокатехин положительно коррелировали с несколькими генами, такими как RS1, RS2,

DHN2, LOX6, BAM5, SnRK1.3, SUS4 и HXK3. Кроме того, эпигаллокатехин, эпикатехин и пролин положительно коррелируют с двумя генами, а именно LOX1 и TPS11. Кроме того, альфа-аланин, хлорофиллы и каротиноиды также положительно коррелировали со следующими генами: CBF1, HXK2, SWEET3, SnRK1.1, SPS и DHN3. Вместе с тем, эпигаллокатехин галлат, эпикатехин галлат и кофеин показали значительную положительную корреляцию с генами DHN1 и NAC17. Положительные корреляции наблюдались также между несколькими генами (рис. 2).

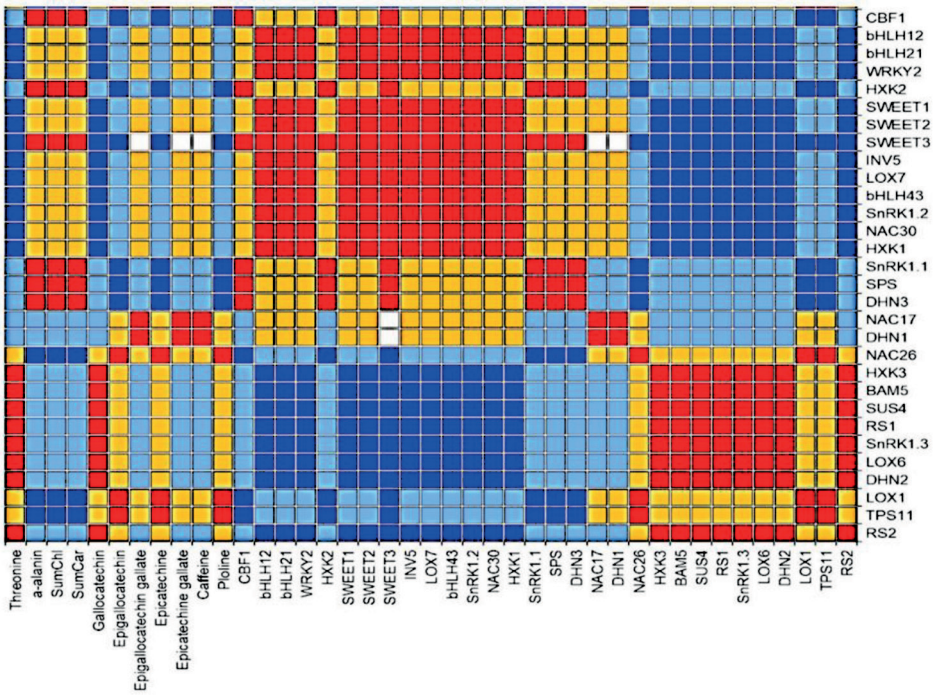

Рис. 2. Тепловая карта корреляции биохимических параметров и генов, связанных со стрессом: красные клетки — значимые положительные корреляции; тёмно-синие клетки – значимые отрицательные корреляции. Жёлтые и светло-синие клетки – незначимые положительные и отрицательные корреляции, соответственно

Fig. 2. Correlation heat map of biochemical parameters and stress-related genes: red cells – significant positive correlations; dark-blue cells – significant negative correlations. Yellow and light blue cells – non significant positive and negative correlations, respectively

Например, HXK2, SnRK1.1, SPS, DHN3, SWEET3, SWEET1 и CBF1 положительно коррелировали в ответ на маннитол. Наконец, положительная корреляция наблюдалась между RS1, RS2, DHN2, LOX6, SnRK1.3, SUS4, BAM5 и HXK3. С другой стороны, многие значимые

отрицательные корреляции также наблюдались в ответ на маннитол. Например, треонин и галлокатехин отрицательно коррелировали со следующими генами: bHLH12, bHLH21, WRKY2, SWEET1,2,3, INV5, LOX7, bHLH43, SnRK1.2, NAC30 и HXK1. Кроме того, эпигаллокатехин, эпикатехин и пролин отрицательно коррелировали с генами NAC17, DHN3, SPS, SWEET3, SWEET1 и CBF1. Кроме того, альфа-аланин, хлорофиллы и каротиноиды отрицательно коррелировали с генами TPS11, LOX1 и NAC26.

Для проверки эффективности в условиях осмотического стресса, индуцированного маннитом, был выбран набор важных факторов транскрипции и генов-метаболитов, которые, как было подтверждено, играют важную роль при засухе и холоде растений чая, а также других абиотических стрессовых реакциях [2, 14, 28, 30, 31]. При обработке маннитом было выявлено 9 генов (DHN2, BAM, SUS4, RS1, RS2, SnRK1.3, TPS11, LOX1, LOX6) со значительно повышенной экспрессией в листьях чая (в 1,7–12,7 раз выше). Самые высокие уровни экспрессии генов LOX6, RS2 и DHN2 наблюдались при большей концентрации маннита, что подтверждает прямую связь между силой осмотического стресса и уровнем экспрессии этих трёх маркеров, связанных с осмотическим стрессом.

Значительное увеличение экспрессии гена DHN2 при обработке маннитом подтверждает дефицит воды в микропобегах чая, который является триггером DHN. DHN1,2,3 – транскрипционные факторы из суперсемейства LEA, кодирующие криопротекторные белки, действующие как шапероны, играющие критическую роль в защите растений во время абиотических стрессов [20]. Ранее в наших исследованиях [21] и других исследованиях [29] было показано, что DHN2 может служить маркером холодоустойчивых сортов чайных растений. Наш результат по DHN2 согласуется с более ранними исследованиями и может быть ещё одним свидетельством осмотического стресса у микропобегов чая, вызванного маннитом.

Ранее предполагалось, что три гена (CsLOX1, CsLOX6 и CsLOX7) семейства генов липоксигеназы участвуют в АБК-независимых ответах на абиотический стресс у чайных растений [32]. Эти гены участвуют в катаболизме липидов, синтезе жасмоната и оксилипина [13]. Мы наблюдали активацию двух генов, LOX1 и LOX6, в ответ на маннит, что указывает на активацию процессов перекисного окисления липидов в чайных листьях при обработке маннитом.

Шесть генов с повышенной регуляцией (BAM, SUS4, RS1, RS2, SnRK1.3 и TPS11) связаны с метаболизмом сахара. Таким образом, можно предположить, что обработка маннитом активирует сахарный обмен в чайных микропобегах под осмотическим давлением. Ген BAM является ключевым регулятором, который гидролизует крахмал до мальтозы и играет важную роль в реакции на холодовой стресс у чая и в фотосинтетической

защите при осмотическом стрессе [31]. Гены SUS кодируют сахарозосинтазу (Sus), ключевой фермент метаболизма сахарозы.

Предыдущие исследования показали, что уровни транскрипции Sus1 увеличивались после воздействия холода и стрессовых условий засухи [22, 31]. Гены CsSUS играют двунаправленную роль в превращении сахарозы в глюкозу и фруктозу, что необходимо для баланса сахарозы в растении [18]. Гены RS являются ключевыми регуляторами синтеза раффинозы, и сверхэкспрессия этих ферментов, кодирующих гены, привела к увеличению содержания раффинозы и, как было показано, активируется при холодовом стрессе у чайного растения [18]. Кроме того, TPS является ключевым геном-контролёром синтеза трегалозы, который, как было показано, играет решающую роль в развитии растений и реакции на стресс. В нашем исследовании наблюдалась повышенная экспрессия этого гена, что указывает на его важную роль в реакции чайных растений на засуху. CsSnRK1 представляет собой серин/треониновую протеинкиназу, и эти гены действуют как ключевые регуляторы, участвующие в передаче сигналов сахара. Ранее было высказано предположение, что изменения содержания сахара стимулируют передачу сигналов, опосредующую транскрипцию генов, связанных со стрессом, и интеграцию АБК в ответ на стресс [31]. Причём, только SnRK1.3 активировался в ответ на обработку маннитом, что указывает на специфическую роль этого гена в реакции чайных растений на засуху.

Установлено, что десять генов (CBF1, bHLH12, bHLH21, WRKY2, HXK2, SWEET1,2,3, INV5 и LOX7) были подавлены в микропобегах чая при обработке маннитом. Среди них мы можем видеть регулятор (CBF1) АБК-независимой реакции на стресс, три фактора транскрипции (bHLH12, bHLH21 и WRKY2) для АБК-зависимой реакции на стресс, четыре гена (HXK2, SWEET1,2 и 3), участвующих в трансдукции сахарного сигнала и два других гена (LOX7 и INV5) для метаболизма липидов и сахара. Все эти гены были предложены в недавних транскриптомных исследованиях в качестве возможных маркеров реакции на засуху чайного растения. Например, было показано, что CsWRKY2 является маркером реакции на холод и засуху, активируя передачу сигналов ABA [27]. Кроме того, bHLH12 и bHLH21 были предложены в качестве генов, реагирующих на засуху в чае и активирующих передачу сигналов ABA [6]. HXK является сенсором глюкозы у растений, но он также участвует в метаболизме глюкозы, а CsHXK2 значительно подавляется при накоплении глюкозы [31]. Кроме того, активность трёх транспортёров сахара (SWEET1, SWEET2 и SWEET3) была снижена, что указывает на ингибирование потока сахара в межклеточное пространство во время осмотического стресса *in vitro*.

Многие гены, включенные в наше исследование, были подавлены или молчали. Одним из возможных объяснений этих результатов может быть продолжительность стрессового воздействия. В наших экспериментах анализы проводились после длительного воздействия маннита продолжительностью до 2 месяцев. Можно предположить, что некоторые гены, связанные с осмотическим стрессом, более активно транскрибируются на начальной стадии стресса. Другие гены экспрессируются на высоком уровне при длительном стрессовом воздействии. С другой стороны, во многих случаях метилирование ДНК было причиной ингибирования экспрессии различных генов у растений, культивируемых *in vitro* [3].

Абиотические стрессы, подобные стрессам, вызванным условиями окружающей среды, по-видимому, влияют на метилирование ДНК и органогенез. Доказано, что метилирование ДНК может передаваться по наследству последующим поколениям. Оценка корреляций между генами и последующими биохимическими процессами может помочь идентифицировать генные модули, профили экспрессии которых очень похожи. Это может помочь лучше понять механизм реакции и адаптации сельскохозяйственных культур к каждому стрессовому фактору. Высокий уровень корреляции указывает на высокую прочность связи генов, которые могут коэкспрессироваться или быть связаны с совместными регулонами [12].

В нашем исследовании корреляции были проанализированы для выявления закономерностей экспрессии генов и их регуляции последующих физиологических показателей засухи у чайных растений. Совместная экспрессия нескольких генов, наблюдаемая под действием маннита, демонстрирует их сходную картину при осмотическом стрессе у чайных растений. Мы обнаружили две группы высококоррелированных генов. В первую группу вошли CBF1, DHN3, HXK2, SnRK1.1, SPS, SWEET3 и SWEET1, а во вторую группу вошли следующие гены: DHN2, SnRK1.3, HXK3, RS1, RS2, LOX6, SUS4 и BAM5. Эти результаты указывают на то, что указанные гены имеют схожий характер экспрессии во время стресса, вызванного засухой. Совместная экспрессия этих генов указывает на общие восходящие пути передачи и регуляции сигнала под осмотическим давлением. Высоко коррелированные генные модули со специфическими паттернами экспрессии могут помочь проиллюстрировать структуру транскриптома стресса, вызванного засухой.

В дальнейшем, планируются исследования, с привлечением других осмотических агентов (ПЭГ, сорбитол и т. д.) для понимания механизмов адаптации и толерантности к засухе чайного растения.

Выводы. Из 31 изученного гена, девять генов (DHN2, BAM, SUS4, RS1, RS2, SnRK1.3, TPS11, LOX1 и LOX6) значительно экспрессировались в чайных листьях под действием маннита, шесть из них связаны

с метаболизмом сахара. Эти гены могут быть предложены в качестве надёжных маркеров реакции чайного растения на засуху. Некоторые транскрипционные факторы (CBF1, bHLH12, bHLH21, WRKY2) и гены, передающие сигналы сахара (HXK2, SWEET1,2,3), а также гены метаболитов (INV5, LOX7) были снижены в чайных листьях под действием эффекта маннита, который может быть связан как со сроком воздействия стрессов, так и с их подавлением в условиях *in vitro.* Сходный характер экспрессии при обоих обработках маннитом наблюдался в двух группах генов: первая группа включала семь генов (CBF1, DHN3, HXK2, SnRK1.1, SPS, SWEET3 и SWEET1), вторая группа включала восемь генов. (DHN2, SnRK1.3, HXK3, RS1, RS2, LOX6, SUS4 и BAM5). Эти два модуля плотно связанных между собой генов, возможно, могут иметь высокий уровень совместной экспрессии под действием маннита.

Публикация подготовлена в рамках реализации
ГЗ ФИЦ СНЦ РАН FGRW-2024-0003,
рег. № 1022040700985-0-4.1.1;4.1.5 и FGRW-2024-0005,
рег. № 1022040700995-7-1.6.4

Все эксперименты проводились при финансовой поддержке
Российского научного фонда (проект № 18-76-10001)

Список литературы/References

1. Гвасалия М.В. Спонтанные и индуцированные сорта и формы чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) во влажных субтропиках России и Абхазии, перспективы их размножения и сохранения в культуре *in vitro.* Канд. дис. Краснодар: КубГАУ, 2015. [Gvasaliya M.V. Spontaneous and induced varieties and forms of tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) in the humid subtropics of Russia and Abkhazia, prospects for their reproduction and preservation in *vitro* culture. Cand. dis. Krasnodar: KubGAU, 2015. (In Rus)].
2. Ban Q., Wang X., Pan C. et al. Comparative analysis of the response and gene regulation in cold resistant and susceptible tea plants, PLoS ONE. 2017; 12 : e0188514. DOI: 10.1371/journal.pone.0188514.
3. Brown P.T. DNA methylation in plants and its role in tissue culture, Genome. 2011; 31(2) : 717-729. DOI: 10.1139/g89-130.
4. Camillo J., Scherwinski-Pereira J.E. In vitro maintenance, under slow-growth conditions, of oil palm germplasm obtained by embryo rescue, Pesquisa Agropecuária Brasileira 2015; 50(5) : 426-429. DOI: 10.1590/S0100-204X2015000500010.
5. Claeys H., Landeghem S.V., Dubois M. et al. What is stress? Dose-response effects in commonly used in vitro stress assays, Plant Physiol. 2014; 165 : 519-527. DOI: 10.1104/pp.113.234641.
6. Cui X., Wang Y.-X., Liu Z.-W. et al. Transcriptome-wide identification and expression profile analysis of the bHLH family genes in *Camellia sinensis*, Funct. Integr. Genomics. 2018; 18 : 489-503. DOI: 10.1007/s10142-018-0608-x.
7. Darko E., Végh B., Khalil R. et al. Metabolic responses of wheat seedlings to osmotic stress induced by various osmolytes under iso-osmotic conditions, PLoS ONE. 2019; 14 : e0226151. DOI: 10.1371/journal.pone.0226151.

8. Doyle J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue, Focus. 1990; 12 : 13-15.
9. El-Bahr M.K., Abd EL-Hamid A., Matter M.A. et al. *In vitro* conservation of embryogenic cultures of date palm using osmotic mediated growth agents, J. Genet. Eng. Biotechnol. 2016; 14 : 363-370. DOI: 10.1016/j.jgeb.2016.08.004.
10. Hao X., Horvath D.P., Chao W.S. et al. Identification and Evaluation of Reliable Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Analysis in Tea Plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), Inter. J. of Molecular Sciences. 2014; 15(12) : 22155-22172. DOI: 10.3390/ijms151222155.
11. Jewell M.C., Campbell B.C., Godwin I.D. Transgenic Plants for Abiotic Stress Resistance. In: Kole C., Michler C.H., Abbott A.G., Hall T.C. (eds) Transgenic Crop Plants. Springer, Berlin, Heidelberg. 2010; 2 : 67-132. DOI: 10.1007/978-3-642-04812-8_2.
12. Li J., Yang Y., Iqba A. et al. Correlation analysis of cold related gene expression with physiological and biochemical indicators under cold stress in oil palm, PLoS ONE. 2019; 14(11) : e0225768. DOI: 10.1371/journal.pone.0225768.
13. Li L., Lu X., Ma H., Lyu D. Jasmonic acid regulates the ascorbate-glutathionecycle in *Malus baccata* Borkh. roots under low root-zone temperature, Acta Physiol. Plant. 2017; 39 : 174. DOI: 10.1007/s11738-017-2469-7.
14. Liu S.-C., Jin J.-Q., Ma J.-Q. et al. Transcriptomic analysis of tea plant responding to drought stress and recovery, PLoS ONE. 2016; 11(1) : e0147306. DOI: 10.1371/journal.pone.0147306.
15. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, Methods. 2001; 25 : 402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
16. Lopez-Puc G. An effective in vitro slow growth protocol for conservation of the orchid *Epidendrum chlorocorymbos* Schltr, Trop. Subtrop. Agroecosyst. 2013; 16(1) : 61-68.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant; 1962; 15 : 473-497.
18. Parmar R., Seth R., Singh P., Singh G. Transcriptional profiling of contrasting genotypes revealed key candidates and nucleotide variations for drought dissection in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, Sci. Rep. 2019; 9 : 7487. DOI: 10.1038/s41598-019-43925-w.
19. Pérez-Clemente R.M., Gómez-Cadenas A. *In vitro* tissue culture, a tool for the study and breeding of plants subjected to abiotic stress conditions, Recent Advances in Plant *in Vitro* Culture. Leva A., Rinaldi L., Eds. IntechOpen. Rijeka, Croatia. 2012; 91-108. DOI: 10.5772/50671.
20. Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangola M.P. Developing stress tolerant plants through in vitro selection – An overview of the recent progress, Environ. Exp. Bot. 2011; 71 : 89-98. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2010.10.021.
21. Samarina L.S., Malyukova L.S., Efremov A.M. et al. Physiological, biochemical and genetic responses of Caucasian tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) genotypes under cold and frost stress, Peer J. 2020; 8(12) : e9787. DOI: 10.7717/peerj.9787.
22. Stein O., Granot D. An overview of sucrose synthases in plants, Front. Plant Sci. 2011; 10 : 95. DOI: 10.3389/fpls.2019.00095.
23. Turkozu D., Sanlier N. L-theanine, unique amino acid of tea, and its metabolism, health effects, and safety, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2017; 57 : 1681-1687. DOI: 10.1080/10408398.2015.1016141.
24. Upadhyaya H., Sahoo L., Panda S.K. Molecular Physiology of Osmotic Stress in Plants, Molecular Stress Physiology of Plants. Rout G., Das A., Eds. Springer. New Delhi. India. 2012. DOI: 10.1007/978-1-322-0807-5_7.
25. Vinokur B., Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievement and limitations, Current Opinion in Biotechnology. 2005; 16 : 123-132. DOI: 10.1016/j.copbio.2005.02.001.
26. Wang W., Xin H., Wang M. et al. Transcriptomic Analysis Reveals the Molecular Mech-

anisms of Drought-Stress-Induced Decreases in *Camellia sinensis* Leaf Quality, Front. Plant Sci. 2016; 7 : 385. DOI: 10.3389/fpls.2016.00385.
27. Wang Y.-X., Liu Z.-W., Wu Z.-J. et al. Transcriptome-wide identification and expression analysis of the *NAC* gene family in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze], PLoS ONE. 2016; 11(11) : e0166727. DOI: 10.1371/journal.pone.0166727.
28. Wang Y., Jiang C.-J., Li Y.-Y. et al. *CsICE1* and *CsCBF1*: Two transcription factors involved in cold responses in *Camellia sinensis*, Plant Cell Rep. 2011; 31(1) : 27-34. DOI: 10.1007/s00299-011-1136-5.
29. Wang Y., Shu Z., Wang W., Jiang X. *CsWRKY2*, a novel *WRKY* gene from *Camellia sinensis*, is involved in cold and drought stress responses, Biol. Plant. 2016; 60 : 443-451. DOI: 10.1007/s10535-016-0618-2.
30. Yin H., Ma Y., Deng Y. et al. Genome shuffling of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced glutathione yield and relative gene expression analysis using fluorescent quantitation reverse transcription polymerase chain reaction, J. Microbiol. Methods. 2016; 127 : 188-192. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.06.012.
31. Yue C., Cao H.L., Wang L. et al. 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.
32. Zhu J., Wang X., Guo L. et al. Characterization and alternative splicing profiles of the lipoxygenase gene family in tea plant (*Camellia sinensis*), Plant Cell Physiol. 2018; 59(9) : 1765-1781. DOI: 10.1093/pcp/pcy091.

GENE EXPRESSION OF TEA MICROPLANTS (CAMELLIA SINENSIS (L.) KUNTZE) CAUSED BY THE ACTION OF OSMOTIC STRESS IN VITRO

Samarina L.S., Gvasaliya M.V.

Federal Research Centre
the Subtropical Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences,
Sochi, Russia, e-mail: m.v.gvasaliya @mail.ru

Osmotic stress caused by drought is the main abiotic environmental factor that reduces the growth and yield of tea plants. Therefore, the main research on tea breeding is aimed at creating new cultivars resistant to water deficiency. Modern biotechnological techniques can increase the effectiveness of traditional methods in creating new genotypes as donors of resistance to this stress factor. When obtaining forms resistant to drought, a certain selective factor is introduced into the nutrient medium to simulate the effect of stress *in vitro*. In the present study, osmotic stress was caused by the addition of mannitol to the nutrient medium to identify genetic reactions in tea microshoots *in vitro*. It was found that the expression level of genes such as DHN2, LOX1, LOX6, BAM, SUS1, TPS11, RS1, RS2 and SnRK1.3 was increased 2–10 times during osmotic stress caused by mannitol, while the expression of many other stress-related genes did not significantly change. At the same time, suppression of the following genes was observed: bHLH12, bHLH7, bHLH21, bHLH43, CBF1, WRKY2, SWEET1, SWEET2, SWEET3, INV5 and LOX7. During this study, two main groups of genes with a high degree of correlation

were found. The first group included seven genes, namely: CBF1, DHN3, HXK2, SnRK1.1, SPS, SWEET3 and SWEET1. The second group consisted of eight genes, including: DHN2, SnRK1.3, HXK3, RS1, RS2, LOX6, SUS4 and BAM5. A high level of correlation indicates a high bond strength of genes that can be co-expressed or can be associated with regulons. The present study demonstrates that micro-shoots of tea undergo a number of adaptations to cope with osmotic stress *in vitro*. However, some important genes that are associated with stress were turned off or suppressed osmoregulation in microshoots. Of the 31 genes studied, 9 genes (DHN2, BAM, SUS4, RS1, RS2, SnRK1.3, TPS11, LOX1 and LOX6) were significantly activated in tea microshoots leaves under the action of mannitol, six of them are associated with sugar metabolism. These genes can be proposed as reliable markers of the tea plant's response to drought.

Key words: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, tea microshoots *in vitro*, osmotic stress *in vitro*, mannitol, selective media, gene expression.