

УДК 633.72.58.085

DOI 10.30679/2219-5335-2022-3-75-97-106

**ИНДУКЦИЯ ОСМОТИЧЕСКОГО
СТРЕССА *IN VITRO*
В ЦЕЛЯХ ПОЛУЧЕНИЯ
УСТОЙЧИВЫХ К ЗАСУХЕ
ГЕНОТИПОВ ЧАЯ
(*CAMELLIA SINENSIS* (L.) O. KUNTZE)***

Гвасалия Майя Валериановна
канд. биол. наук
ст. научный сотрудник
отдела биотехнологии растений
e-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru

*Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Субтропический научный центр РАН»,
Сочи, Россия*

Урожайность чайных плантаций, качество собранного сырья напрямую зависит от количества выпавших осадков, особенно в летний период. В связи с этим усилия ученых направлены на изучение физиологических, биохимических и молекулярных механизмов устойчивости растений чая к высоким температурам. Индукция стресса *in vitro* является альтернативным инструментом для глубокого изучения этих процессов. Для отбора засухоустойчивых генотипов мы имитировали *in vitro* дефицит влаги, путем добавления в питательную среду селективного агента – полиэтиленгликоля (PEG – 30 г/л). Осмотический стресс, изучался кондуктометрическим методом, по показателям электропроводности тканей и стабильности клеточных мембран. Из всей исследованной группы соматклонов чая, только у соматклона Sc-27 не происходило увеличения

UDC 633.72.58.085

DOI 10.30679/2219-5335-2022-3-75-97-106

**INDUCTION OF OSMOTIC
STRESS *IN VITRO*
IN ORDER TO OBTAIN
DROUGHT RESISTANT
TEA GENOTYPES
(*CAMELLIA SINENSIS* (L.) O. KUNTZE)***

Gvasaliya Maya Valerianovna
Cand. Biol. Sci.
Senior Research Associate
of biotechnology plant department
e-mail: m.v.gvasaliya@mail.ru

*Federal State Budgetary Institution
of Science, Federal Research Center
«Subtropical Scientific Center
of the Russian Academy of Sciences»,
Sochi, Russia*

The yield capacity of tea plantations, the quality of the collected raw materials directly depends on the amount of precipitation, especially in summer. In this regard, the efforts of scientists are aiming on studying the physiological, biochemical and molecular mechanisms of tea plants resistance to high temperatures. Stress induction *in vitro* is an alternative tool for studying these processes in depth. To select drought-resistant genotypes, we simulated moisture deficiency *in vitro* by adding a selective agent, polyethylene glycol (PEG – 30 g/l), to the nutrient medium. Osmotic stress was studying by conductometric method, in terms of the electroconductivity of tissues and the stability of cell membranes. Of the whole studied group of tea somaclones, only somaclone Sc-27 did not have an increase

* Публикация подготовлена в рамках реализации ГЗ ФИЦ ШИЦ РАН № 0492-2021-0005 (Разработка методов биотехнологии для целей сохранения генетических ресурсов субтропических, плодовых, декоративных культур и видов природной флоры как источников ценных признаков и селекционных исследований)

* The publication was prepared within the framework of the implementation of the GZ FITC SNC RAS No. 0492-2021-0005 (Development of biotechnology methods for the conservation of genetic resources of subtropical, fruit, ornamental crops and species of natural flora as sources of valuable traits and breeding research)

электропроводности тканей листа и снижения стабильности клеточных мембран, что указывает на его устойчивость к водному дефициту. У остальных растений по этим позициям, наблюдалось повреждение тканей, вызванное действием осмотического стресса. В протокол исследований также входило изучение уровня экспрессии гена дегидрин 2 – *DHN2*, как наиболее информативного генетического маркера засухоустойчивости. Проведенный ПЦР анализ показал, что при водном дефиците, вызванном добавлением PEG в питательную среду, ген дегидрин 2 (*DHN2*), показал высокий уровень экспрессии у соматклона Sc-27. Это подтверждает прямую связь между действием осмотического стресса и уровнем экспрессии этого маркера. Значительно повышенная экспрессия гена *DHN2* при добавлении ПЭГ подтверждает дефицит воды в микрорастениях чая, который является триггером для выработки *DHN2*. Таким образом, при индукции *in vitro* осмотического стресса, среди изученных соматклонов чая, Sc-27 продемонстрировал высокую адаптивность к водному дефициту. Проведенный ПЦР анализ подтвердил это показав, что маркер засухоустойчивости – ген дегидрин 2 экспрессировался у него значительно выше.

Ключевые слова: ЧАЙ, СОМАКЛОНЫ, ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТЬ, ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТЬ, СТАБИЛЬНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН, ПЦР АНАЛИЗ, ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ

in the electroconductivity of leaf tissues and a reduce in the stability of cell membranes, which indicates its resistance to water deficiency. On these positions tissue damage in another plants, caused by the action of osmotic stress were observing. The research protocol also included the study of level expression the dehydrin 2 gene – *DHN2*, as the most informative genetic marker of drought resistance. Conducting PCR analysis showed that under water deficiency caused by the addition of PEG to the nutrient medium, the dehydrin 2 (*DHN2*) gene showed a high level of expression of Sc-27 somaclone. This confirms the direct relationship between the action of osmotic stress and the level of this marker expression. Significantly increased the expression of *DHN2* gene with the addition of PEG, confirms the water deficiency in tea microplants, which is a trigger for the production of *DHN2*. Thus, during of osmotic stress induced *in vitro*, among the studied somaclones of tea, Sc-27 demonstrated high adaptability to water deficit. The PCR analysis confirmed this by showing that the marker of drought resistance, the dehydrin 2 gene, were expressing much higher.

Key words: TEA, SOMATIC CLONES, DROUGHT RESISTANCE, ELECTROCONDUCTIVITY, CELL MEMBRANES STABILITY, PCR ANALYSIS, GENE EXPRESSION

Введение. Дефицит влаги в период летних засух наносит непоправимый вред чайным плантациям, произрастающим в чайных регионах по всему миру. Потери урожайности достигают 45 %, снижается качество собираемого сырья [1]. В связи с этим, зарубежными и отечественными учеными проводятся исследования по изучению физиологических, биохимических и молекулярных механизмов устойчивости чайного растения чая к высоким температурам [2-7]. Снижение водного потенциала растительных

клеток вызывает осмотический стресс и приводит к окислительному повреждению мембран и образованию активных форм кислорода (АФК) [8]. Вместе с тем, активация антиоксидантных ферментов и накопление осмолитов в клетках растений, снижают риск окислительного повреждения и выводят АФК. Растения в ответ на стресс-факторы начинают экспрессировать гены стрессовых гидрофильных белков. Наиболее многочисленную группу среди них представляют дегидрины – белки водного стресса, называемые LEA (Late Embryogenesis Abundant) – или белки позднего эмбриогенеза [9].

Стрессовые белки-дегидрины обнаружены у многих видов растений различных таксономических групп. Дегидрины характеризуются высокой гидрофильностью, термостабильностью и наличием в них консервативных последовательностей (Y-, S- и K-сегментов), обогащенных гидрофильными аминокислотами, особенно лизином и пролином [10]. Установлено, что дегидрины обладают криопротекторной, антифризной, антиоксидантной способностью [11, 12]. В реакцию растений на осмотический стресс вовлечены многочисленные гены, которые трудно проанализировать в полевых условиях [13, 14]. Индукция стресса *in vitro* является альтернативным инструментом для глубокого изучения физиологических и генетических реакций, происходящих в растительных клетках. Для имитации *in vitro* стрессового эффекта засухи могут применяться питательные среды, которые дополнены осмотически активными веществами, понижающими водный потенциал. В качестве такого селективного агента для селекции на устойчивость к засухе можно использовать полиэтиленгликоль (PEG), представляющий собой непроникающее в клетку осмотически активное вещество. Отбор более толерантных форм на клеточном уровне становится реальным, поскольку метаболические процессы, обеспечивающие осморегуляцию, могут находиться под контролем нескольких генов. При существовании корреляции между ответом на засуху у растений в природе и ответом клеточных культур

в экспериментально созданных условиях возможен скрининг существующего генофонда на клеточном уровне для поиска стойкой к данному стрессору зародышевой плазмы [15-18].

Цель проводимого исследования состояла в создании осмотического стресса *in vitro*, изучении физиологических изменений у соматклонов чая, вызванных присутствием полиэтиленгликоля в питательной среде, а также в проверке уровня экспрессии гена дегидрин 2 – *DHN2*, как наиболее информативного генетического маркера засухоустойчивости.

Объекты и методы исследований. Растительный материал – соматклоны чая, находящиеся 11 лет *in vitro* в коллекции гермоплазмы «Субтропического научного центра РАН» г. Сочи. Культивируются они на питательной среде по прописи Мураисге-Скуга, с добавлением бензиламинопурина (3 мг/л), нафтилуксусной кислоты (1 мг/л), гибберелловой кислоты (1 мг/л) pH 5,7. Для индукции осмотического стресса в питательную среду добавляли полиэтиленгликоль (PEG = 6000 – 30 г/л). Изучали относительную электропроводность и стабильность клеточных мембран с использованием портативного кондуктометра ST300C (Ohaus). Для проведения этих анализов брали навеску листьев – 50 мг и помещали в стакан с 50 мл деионизированной воды. Проводили 4 замера показаний через 0, 60, 120 минут после погружения листьев, а также после кипячения растительной пробы в течение 60 минут. Расчет ОЭП проводился по формуле [19]:

$$REC = L1/L2 \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где L1 – электропроводность через 0 мин.,

L2 – электропроводность в остывшем растворе после кипячения на водяной бане 1 час при 100 °C.

Стабильность клеточных мембран рассчитывали по формуле:

$$СКМ \% = (1 - (L1/L2)) / (1 - (C1/C2)) \cdot 100\%, \quad (2)$$

где L1 и L2 – значения проводимости до и после кипячения;

C1 и C2 – относительная проводимость контроля до и после кипячения (усредненные значения).

В опыте 3 аналитические повторности.

Суммарную РНК выделяли из 200 мг свежих листьев чая (набор реагентов Лира, Биолабмикс, Новосибирск) по протоколу СТАВ [20]. Концентрацию и качество РНК определяли с использованием спектрофотометра BioDrop μ Lite, целостность РНК оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле. РНК обрабатывали ДНКазой. Для удаления примесей геномной ДНК применялся метод qRT-PCR. Обратная транскрипция определялась набором реагентов М-MuLV-RN (Биолабмикс, Новосибирск). Экспрессию генов проводили методом ПЦР в реальном времени на LightCycler96 (фирма Roche). ПЦР смесь готовили на основе наборов реагентов БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2 $\times$), объем смеси 12,5 мкл, в которую входило по 0,5 мкл каждого праймера. Использовали ген дегидрин 2 – DHN2 (маркер засухоустойчивости). Последовательность праймеров – F: CTTATGGCACCGGCACTAC; R: TTCCTCCTCCCTCCTTGAC. В качестве референсного гена был взят – *Actin* [21], с последовательностью праймеров – F: CCATCACCAAGAATCCAAGAC; R: GAACCCGAAGGCGAATAGG. Отжиг праймеров при ПЦР анализе проводился при температуре 40 °C, всего 35 циклов амплификации, в анализе по экспрессии – 3 повторности. Обработка данных была осуществлена на основе программного обеспечения LightCycler96. Относительный уровень экспрессии гена был рассчитан Ливак и Шмитген [22], по алгоритму: $2^{-\Delta\Delta Cq}$, где: $\Delta\Delta Cq = (Cq_{gene\ of\ interest} - Cq_{internal\ control})_{treatment} - (Cq_{gene\ of\ interest} - Cq_{internal\ control})_{control}$.

Обсуждение результатов. Для отбора засухоустойчивых генотипов в культуре *in vitro* была использована селективная среда с добавлением стимулятора осмотического стресса полиэтиленгликоля (PEG – 30 г/л). Присутствие PEG в питательной среде провоцировало осмотический стресс, который изучался кондуктометрическим методом, по изменению показателей электропроводности тканей. Из всех анализируемых соматолонов чая, только

у соматклона Sc-27 не происходило увеличение электропроводности тканей листа по сравнению с контролем, что указывает на его устойчивость к водному дефициту.

Показатели стабильности клеточных мембран у соматического клона Sc-27 с PEG были выше, среди исследуемой группы растений, и превысили контрольный вариант. Эти данные согласуются с результатами по электропроводности тканей. У остальных растений наблюдалось увеличение электропроводности и снижение стабильности клеточных мембран, что указывает на повреждение клеток и тканей, вызванного действием осмотического стресса. Все они показали низкую устойчивость к водному дефициту (рис. 1-2).

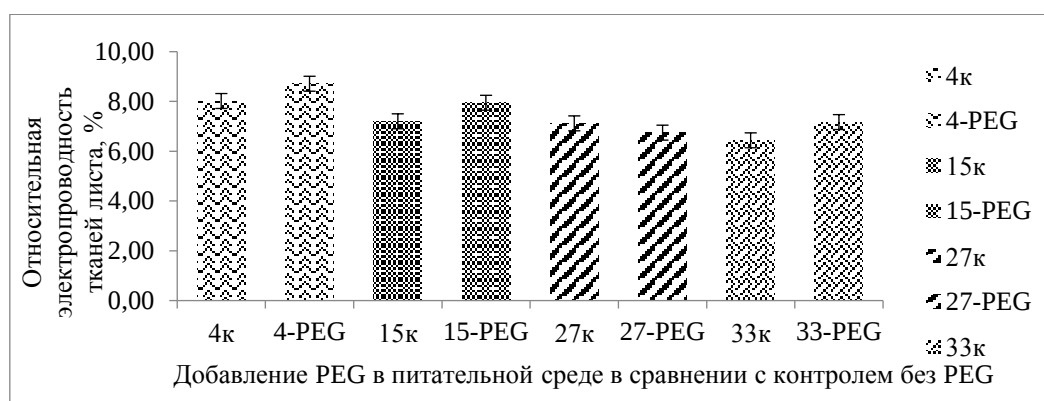


Рис. 1. Относительная электропроводность тканей листа соматических клонов чая при осмотическом стрессе, вызванного PEG

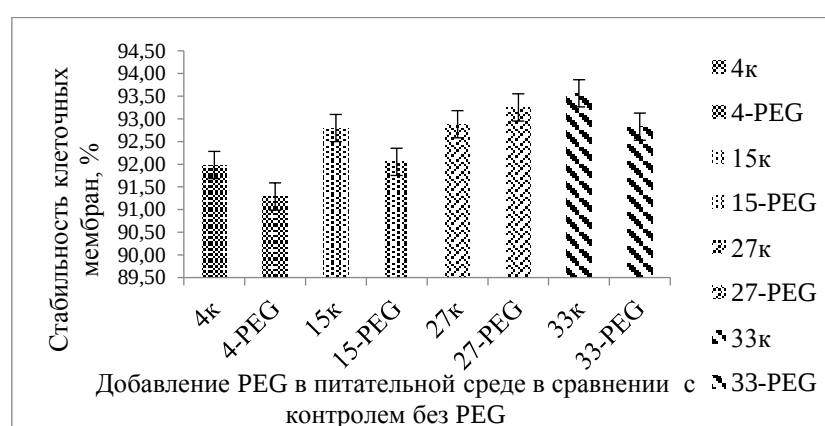


Рис. 2. Стабильность клеточных мембран соматических клонов чая при осмотическом стрессе (с PEG, без PEG).

Проведенный ПЦР анализ показал, что при водном дефиците, вызванном добавлением PEG в питательную среду, ген дегидрин 2 (*DHN2*), как

главный генетический маркер засухоустойчивости, проявил высокий уровень экспрессии у соматклона Sc-27 (рис. 3).

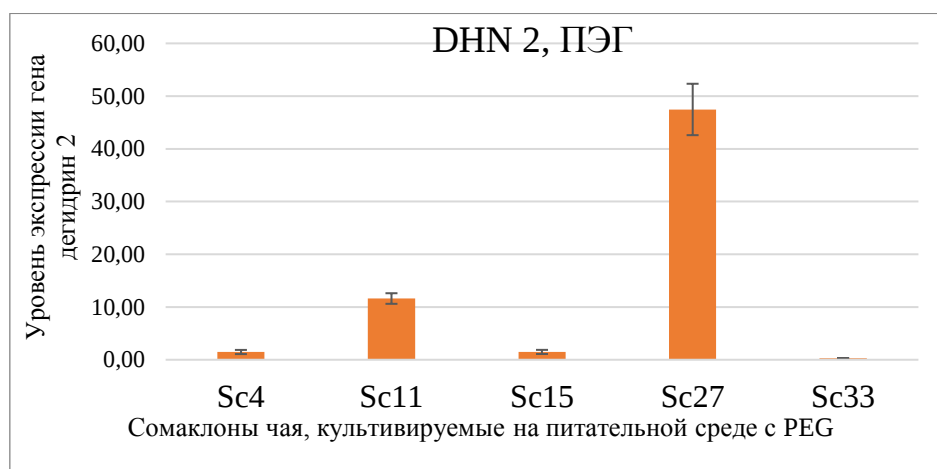


Рис. 3. Экспрессия гена дегидрин 2 у соматклонов чая при водном дефиците, вызванного PEG

Это подтверждает прямую связь между действием осмотического стресса и уровнем экспрессии маркера. Значительно повышенная экспрессия гена DHN2 при добавлении ПЭГ подтверждает дефицит воды в микро-растениях чая, который является триггером для выработки DHN2. Этот ген является транскрипционным фактором из суперсемейства LEA, кодирующим криозащитные белки, действующие как шапероны, играющие решающую роль в защите растений при абиотических стрессах [23, 24].

Заключение. Установлено, что при индукции *in vitro* осмотического стресса среди исследованной группы растений, по показателям электропроводности и стабильности клеточных мембран соматклон Sc-27 продемонстрировал высокую адаптивность к водному дефициту. Проведенный ПЦР анализ подтвердил это, показав, что маркер засухоустойчивости – ген дегидрин 2 экспрессировался у него значительно выше по сравнению с другими соматклонами.

Литература

1. Bhagat R.M., Baruah R.D., Safique S. Climate and tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] production with special reference to northeastern India: a review // Journal of Environmental Research and Development, 2010. – V.4 – № 4. – P.1017-1028.
2. Белоус О. Г. Биологические особенности культуры чая в условиях влажных субтропиков России : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 06.01.07 / Белоус Оксана Геннадьевна. Краснодар, 2009. 43 с.
3. Физиолого-биохимические характеристики микропобегов чая (*Camellia sinensis* L.) в условиях *in vitro*: норма, осмотический стресс, влияние кальция / Л.С. Малюкова [и др.] // Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55. № 5. С. 970-980.
4. Физиологические и генетические механизмы ответа чайного растения *Camellia sinensis* (L.) Kuntze на засуху / Л.С. Самарина [и др.] // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. № 3. С. 458-468.
5. Mukhopadhyay M., Mondal T.K. The physiochemical responses of *Camellia* plants to abiotic stresses // J. Plant Sci. Res., 2014, V.1. – №1. – P.1-12.
6. Maritim T.K., Kamunya S.M., Mireji P., Mwendia C.M., Muoki R.C., Cheruiyot E.K., Wachira F.N. Physiological and biochemical response of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) to water-deficit stress // The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2015. – V. 90. – №4. – P. 395-400.
7. Wang W.D., Xin H.H., Wang M.L., Ma Q.P., Wang L., Kaleri N.A., Wang Y.H., Li X.H. Transcriptomic analysis reveals the molecular mechanisms of drought-stress-induced decreases in *Camellia sinensis* leaf quality // Front Plant Sci., 2016. – V.7. – № 795. – P. 385-412.
8. Upadhyaya H., Sahoo L., Panda S.K. Molecular Physiology of Osmotic Stress in Plants. In Molecular Stress Physiology of Plants. Rout, G., Das, A., Eds. // Springer, 2013. – New Delhi, India.
9. Перк А.А., Пономарев А.Г., Васильева И.В. Особенности стрессовых белков-дегидринов березы в условиях криолитозоны // Сибирский лесной журнал, 2020. № 2. С. 21-30.
10. Eriksson S. K., Harryson P. Plant Desiccation Tolerance – Ch.: Dehydrins: Molecular Biology, Structure and Function // Springer, 2011. – P.289-305.
11. Hara M., Terashima S., and Kuboi T. Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu* // J. Plant Physiol., 2001. – № 158. – P. 1333-1339.
12. Hughes S. L., Scharf V., Malcolmson J., et al. The importance of size and disorder in the cryoprotective effects of dehydrins // Plant Physiol., 2013. – № 163. – P. 1376-1386.
13. 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. – P. 27-34.
14. 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, 2016. – № 60 – P. 443-451.
15. Liu S.-C., Jin J.-Q., Ma J.-Q., Yao M.-Z., Ma C.-L., Li C.-F., Ding Z.-T., Chen L. Transcriptomic analysis of tea plant responding to drought stress and recovery // PLoS ONE, 2016. – № 11 – P. 147-306.

16. Yin H., Ma Y., Deng Y., Xu Z., Liu J., Zhao J., Dong J., Yu J., Chang Z. 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. – P. 188-192.
17. 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, 2016. – № 11. – P.166.
18. Ban Q., Wang X., Pan C., Wang Y. et al. Comparative analysis of the response and gene regulation in cold resistant and susceptible tea plants // PLoS ONE, 2017. – № 12. – P. 188-514.
19. Bajji M., Kinet J.-M., Lutts S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat // Plant Growth Regul., 2002. – № 36. – P. 61-70.
20. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus, 1991. – № 12. – P.13-15.
21. Hao X., Horvath D.P., Chao W.S., Yang Y., Wang X., Xiao B. Identification and Evaluation of Reliable Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Analysis in Tea Plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) // Int. J. Mol. Sci., 2014. – №15. – P. 155-172.
22. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2DDCT method // Methods, 2001. – № 25. – P. 402-408.
23. Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangola M.P., Dhawan A.K. Developing stress tolerant plants through in vitro selection – An overview of the recent progress // Environ. Exp. Bot., 2011. – № 71. – P. 89-98.
24. Hanin M., Brini F., Ebel C., Toda Y., Takeda S., Masmoudi K. Plant dehydrins and stress tolerance // Plant Signal. Behav., 2011. – № 6. – P. 503-509.

References

1. Bhagat R.M., Baruah R.D., Safique S. Climate and tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] production with special reference to northeastern India: a review // Journal of Environmental Research and Development, 2010. – V.4 – №4. – P.1017-1028.
2. Belous O. G. Biologicheskie osobennostikul'tury chaya v usloviyah vlaznykh subtropikov Rossii : avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk : 06.01.07 / Belous Oksana Gennad'evna. Krasnodar, 2009. 43 s.
3. Fiziologo-biohimicheskie harakteristiki mikropobegov Chaya (*Camellia sinensis* L.) v usloviyah *in vitro*: norma, osmoticheskij stress, vliyanie kal'ciya / L.S. Malyukova [i dr.] // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. 2020. T. 55. № 5. S. 970-980.
4. Fiziologicheskie i geneticheskie mekhanizmy otveta chajnogo rasteniya *Camellia sinensis* (L.) Kuntze na zasuhu / L.S. Samarina [i dr.] // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. 2019. T. 54. № 3. S. 458-468.
5. Mukhopadhyay M., Mondal T.K. The physiochemical responses of *Camellia* plants to abiotic stresses // J. Plant Sci. Res., 2014, V. 1. – № 1. – P. 1-12.
6. Maritim T.K., Kamunya S.M., Mireji P., Mwendia C.M., Muoki R.C., Cheruiyot E.K., Wachira F.N. Physiological and biochemical response of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) to water-deficit stress // The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2015. – V. 90. – № 4. – P. 395-400.
7. Wang W.D., Xin H.H., Wang M.L., Ma Q.P., Wang L., Kaleri N.A., Wang Y.H., Li X.H. Transcriptomic analysis reveals the molecular mechanisms of drought-stress-induced decreases in *Camellia sinensis* leaf quality // Front Plant Sci., 2016. – V. 7. – № 795. – P. 385-412.

8. Upadhyaya H., Sahoo L., Panda S.K. Molecular Physiology of Osmotic Stress in Plants. In Molecular Stress Physiology of Plants. Rout, G., Das, A., Eds. // Springer, 2013. – New Delhi, India.
9. Perk A.A., Ponomarev A.G., Vasil'eva I.V. Osobennosti stressovyh belkov-degidrirov berezy v usloviyah kriolitozony // Sibirskij lesnoj zhurnal, 2020. № 2. S. 21-30.
10. Eriksson S. K., Harryson P. Rlant Desiccation Tolerance – Ch.: Dehydrins: Molecular Biology, Structure and Function // Springer, 2011. – P.289-305.
11. Hara M., Terashima S., and Kuboi T. Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from Citrus unshiu // J. Plant Physiol., 2001. – № 158. – P. 1333-1339.
12. Hughes S. L., Scharf V., Malcolmson J., et al. The importance of size and disorder in the cryoprotective effects of dehydrins // Plant Physiol., 2013. – № 163. – P. 1376-1386.
13. 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. – P. 27-34.
14. 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, 2016. – № 60 – P. 443-451.
15. Liu S.-C., Jin J.-Q., Ma J.-Q., Yao M.-Z., Ma C.-L., Li C.-F., Ding Z.-T., Chen L. Transcriptomic analysis of tea plant responding to drought stress and recovery // PLoS ONE, 2016. – № 11 – P. 147-306.
16. Yin H., Ma Y., Deng Y., Xu Z., Liu J., Zhao J., Dong J., Yu J., Chang Z. 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. – P. 188-192.
17. 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, 2016. – № 11. – P.166.
18. Ban Q., Wang X., Pan C., Wang Y. et al. Comparative analysis of the response and gene regulation in cold resistant and susceptible tea plants // PLoS ONE, 2017. – № 12. – P. 188-514.
19. Bajji M., Kinet J.-M., Lutts S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat // Plant Growth Regul, 2002. – № 36. – P. 61-70.
20. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus, 1991. – № 12. – P.13-15.
21. Hao X., Horvath D.P., Chao W.S., Yang Y., Wang X., Xiao B. Identification and Evaluation of Reliable Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Analysis in Tea Plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) // Int. J. Mol. Sci., 2014. – №15. – P. 155-172.
22. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2DDCT method // Methods, 2001. – № 25. – P. 402-408.
23. Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangola M.P., Dhawan A.K. Developing stress tolerant plants through in vitro selection – An overview of the recent progress // Environ. Exp. Bot., 2011. – № 71. – P. 89-98.
24. Hanin M., Brini F., Ebel C., Toda Y., Takeda S., Masmoudi K. Plant dehydrins and stress tolerance // Plant Signal. Behav, 2011. – № 6. – P. 503-509.