

УДК 575.112:577.214(292.3)

**БІОІНФОРМАТИЧНЕ ПЕРЕДБАЧЕННЯ ГЕНІВ ІНДУКОВАНИХ ХОЛОДОМ
ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ CBF/DREB1 ТА DREB4
У *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV.**

Бублик О. М., Андреев І. О., Кунах В. А.

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Україна, 03680, м. Київ,
вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua*

Реферат. Метою роботи було дослідження механізмів стійкості до стресів у рослин на прикладі антарктичного злаку *D. antarctica*, зокрема аналіз генів транскрипційних факторів із груп CBF/DREB1 та DREB4, відповідальних за регуляцію реакції на холододовий та інші абіотичні стреси. Шляхом аналізу даних розшифрування геномної ДНК та мРНК *D. antarctica* із використанням як референсних послідовностей ідентифікованих генів споріднених видів злаків та деяких типових мотивів передбачено *in silico* існування 17 генів-кандидатів з досліджуваних груп. Передбачені гени *DaCBF* охарактеризовано та класифіковано шляхом порівняння із послідовностями описаних раніше ортологів інших видів, а також присвоєно їм назви за прийнятою для інших злаків номенклатурою. Проаналізовано склад кластерів цих генів та їх можливу роль у формуванні холодостійкості виду. Встановлено, що послідовності білкових продуктів передбачених генів містять характерні для цих груп ДНК-зв'язувальний домен AP2/ERF та консервативні мотиви, а також показано їхню високу гомологію до білків-ортологів споріднених видів рослин. Філогенетичний аналіз показав, що структура групи передбачених транскрипційних факторів *D. antarctica* у цілому подібна до описаної для інших злаків: до нечисленних підгруп CBF1 та CBFII увійшло по одному ТФ, до більш численних груп CBFIII та CBFIV – відповідно чотири та вісім. До кластеру DREB4 увійшли три ТФ. Аналіз транскриптомних послідовностей показав конститутивну експресію ТФ з груп CBFIIIc, CBF IV та DREB4. Не вдалося виявити суттєвих особливостей чисельності та складу груп DREB1/CBF та DREB4 передбачених ТФ, які б пояснювали підвищену холодостійкість *D. antarctica*.

Ключові слова: абіотичний стрес, антарктичні рослини, передбачення *in silico*, стійкість, транскрипційні фактори.

**Биоинформационное предсказание генов индуцированных холодом транскрипционных факторов
CBF/DREB1 и DREB4 у *Deschampsia antarctica* Desv.**

Бублик Е. Н., Андреев И. О., Кунах В. А.

Реферат. Цель работы заключалась в исследовании механизмов устойчивости к стрессам у растений на примере антарктического злака *D. antarctica*, в частности в проведении анализа генов транскрипционных факторов

(ТФ) из групп CBF/DREB1 и DREB4, ответственных за регуляцию реакции на холодовой и другие абиотические стрессы. В результате анализа данных расшифровки геномной ДНК и мРНК *D. antarctica* с использованием в качестве референсных последовательностей идентифицированных генов родственных видов злаков и некоторых типичных мотивов предсказаны *in silico* 17 генов-кандидатов из исследуемых групп. Предсказанные гены *DaCBF* охарактеризованы и классифицированы путем сравнения с последовательностями описанных ранее генов-ортологов других видов, им присвоены названия в соответствии с принятой для других злаков номенклатурой. Проанализирован состав кластеров этих генов и их возможная роль в формировании холодоустойчивости вида. Установлено, что последовательности белковых продуктов предсказанных генов содержат характерные для этих групп консервативные мотивы и ДНК-связывающий домен AP2/ERF, а также показана их значительная гомология с белками-ортологами родственных видов растений. Филогенетический анализ показал, что структура группы предсказанных транскрипционных факторов *D. antarctica* в целом подобна описанной для других злаков: в малочисленные подгруппы CBF I и CBF II вошло по одному ТФ, в более многочисленные группы CBF III и CBF IV – четыре и восемь ТФ, соответственно. В кластер DREB4 вошли три ТФ. Анализ транскриптомных последовательностей показал наличие конститутивной экспрессии ТФ из групп CBF IIIc, CBF IV и DREB4. Не удалось обнаружить существенных особенностей численности или состава групп CBF/DREB1 и DREB4 предсказанных ТФ, которые бы объясняли повышенную холодоустойчивость *D. antarctica*.

Ключевые слова: абиотический стресс, антарктические растения, предсказание *in silico*, устойчивость, транскрипционные факторы.

Bioinformatic prediction of genes of cold-induced transcription factors CBF/DREB1 and DREB4 in *Deschampsia antarctica* Desv.

Bublyk O. M., Andreev I. O., Kunakh V. A.

Abstract. The work was aimed at the study of the mechanisms of stress-resistance in plants through the example of Antarctic hair grass (*D. antarctica*), in particular at the analysis of genes of transcription factors (TF) of CBF/DREB1 and DREB4 groups, responsible for the regulation of plant response to cold and other abiotic stresses. As a result of *in silico* analysis of the data of sequencing genomic DNA and mRNA of *D. antarctica* using identified genes from related species of grasses and some typical motives as reference sequences, 17 predicted genes of the studied groups were identified. Predicted genes *DaCBF* were described and classified by comparing with the sequences of previously described orthologous genes of other species, and the genes were named according to the nomenclature of CBF adopted for other grasses. The composition of gene clusters was analyzed along with their potential role in shaping the cold tolerance of the species. It was found that the sequences of the protein products of predicted genes contain conservative motives and DNA-binding domain AP2/ERF typical of these groups, and share significant homology with orthologous proteins of related species. Phylogenetic analysis showed that the structure of the group of predicted *D. antarctica* transcription factors is generally similar to that described for other cereals: small subgroups CBF I and CBF II are composed each of one TF, whereas larger groups CBF III and CBF IV contain four and eight TF, respectively. DREB4 cluster consisted of three TF. Analysis of transcriptome sequences revealed the constitutive expression of TF of the groups CBF IIIc, CBF IV and DREB4. There were not found any specific distinctions in the size or composition of CBF/DREB1 and DREB4 groups of predicted transcriptional factors, which could explain the increased cold-tolerance of *D. antarctica*.

Key words: abiotic stress, antarctic plants, *in silico* prediction, tolerance, transcription factors.

1. Вступ

Низькі температури є одним з основних чинників, що стримують ріст, розвиток, продуктивність і географічне поширення багатьох видів, у тому числі важливих сільськогосподарських культур. Вони можуть призводити до пошкодження вегетативних тканин, індукуючи осмотичний, окисний та інші стреси (Thomashow, 1999). На відміну від інших організмів, рослини ведуть прикріплений спосіб життя, що зумовило формування молекулярних механізмів захисту від стресів. Сюди, зокрема, відносяться зміни експресії генів, які в кінцевому рахунку приводять до фізіологічних і біологічних змін, необхідних для підвищення стійкості до несприятливих умов. Вивчення механізмів, які рослини виробили для протистояння несприятливому впливу довкілля, зокрема шляхів формування стійкості до низьких температур і ролі у цьому процесі окремих генів, має важливе теоретичне та практичне значення, наприклад, для створення нових інструментів і стратегій підвищення стресостійкості сільськогосподарських рослин, які мають забезпечити підвищення і стабільність врожайності (Jaglo et al., 2001).

Важливу роль в експресії генів відповіді на стрес відіграють транскрипційні фактори (ТФ) – ДНК-зв'язувальні білки, які взаємодіють зі специфічними цис-елементами у промоторах генів і регулюють їх експресію, активуючи або пригнічуючи приєднання РНК-полімерази (Eulgem, 2005; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). Оскільки один ТФ може регулювати експресію низки генів, включаючи гени інших ТФ, вони є важливими молекулярними мішенями для генетичної маніпуляції клітинними процесами. Робота з генами, що кодують ТФ, є більш перспективним підходом для отримання стресотолерантних рослин, ніж генна інженерія із залученням окремих функціональних генів (Hussain et al., 2011). Крім того, гени ТФ можуть бути використані як потенційні функціональні маркери для маркер-асоційованої селекції холодостійких сортів господарськоцінних культур (Todorovska et al., 2014).

Було показано, що в умовах низьких температур відбувається індукція експресії факторів транскрипції з групи CBF/DREB (C-repeat binding factors / dehydration-responsive element-binding protein), які належать до родини ТФ AP2/ERF (AP et al./ethylene-responsive element-binding factor). Ці фактори, в свою чергу, зв'язуються безпосередньо з CRT/DRE цис-елементами (C-repeat/dehydration-responsive element) у промоторах генів відповіді на холод (COR – Cold Response), активуючи їх експресію (Gilmour et al., 1998). Вважається, що регулон CBF-COR є найважливішою одиницею транскрипції, залученою до холодової акліматизації у рослин (Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2006; Zhao et al., 2016; Jia et al., 2016).

У *A. thaliana* було ідентифіковано шість генів ТФ з групи CBF, серед яких *CBF1*, *CBF2* і *CBF3* беруть участь у регуляції експресії генів відповіді на холод (Stockinger et al., 1997; Liu et al., 1998), а також індукуються за дії інших абіотичних стресів, таких як посуха і висока концентрація солі (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Kasuga et al., 1999; Zhao et al., 2016). На відміну від цього, індукція експресії гену *CBF4* відбувається не при низьких температурах, а в умовах посухи і сольового стресу (Naake et al., 2002). Ген *CBF2* є негативним регулятором *CBF1* і *CBF3* (Novillo et al., 2004). Низка генів *CBF/DREB1* інших видів, такі як *BrCBF* китайської капусти (Jiang et al., 2011), *MbDREB1* яблуні (Yang et al., 2011), *OsDREB1F* рису (Wang et al., 2008), *VviDREB1* брусниці звичайної *Vaccinium vitis-idaea* (Wang et al., 2010) реагують не тільки на холод, але і на засолення, посуху, обробку екзогенною абсцизовою кислотою.

CBF-подібні білки виділено з широкого спектру рослин, до яких належать види, здатні і не здатні до холодової акліматизації, отже, опосередкований CBF шлях відповіді на холод очевидно є консервативним у рослин (Jaglo et al., 2001). Зокрема проведено дослідження для багатьох видів злаків. Виявилось, що злаки мають набагато більші родини CBF з більш складними профілями транскрипції, ніж *A. thaliana*. Було описано принаймні 10 генів CBF у рису (Dubouzet et al., 2003; Skinner et al., 2005), 14 у жита (Campoli et al., 2009; Jaglo et al., 2001), 20 у ячменю (Francia et al., 2004; Skinner et al., 2005), 18 у диплоїдних і 65 у гексаплоїдних пшениць (Skinner et al., 2005; Miller et al., 2006; Mohseni et al., 2012). Наявність такої великої кількості генів CBF із дещо різними функціями або температурними порогоми індукції може забезпечити гнучкість, необхідну для успішної адаптації злаків з помірних широт до більшості холодних регіонів світу (Badawi et al., 2007; Skinner et al., 2005).

Група DREB4 споріднена з CBF, ці дві групи ТФ навіть об'єднують разом (Nakano et al., 2006), оскільки вони мають спільний консервативний мотив. У *A. thaliana* представником групи DREB4 є TINY, який продемонстрував свою здатність взаємодіяти з CRT/DRE і ERE цис-елементами з подібною афінністю і активувати гени, що містять ці елементи. Експресія TINY сильно активується посухою, холодом, етиленом, і злегка метилжасмонатом (Sun et al., 2008). Інші представники групи DREB4 – HvCBF7 ячменю (Skinner et al., 2005) і TINY2 *A. thaliana* (Wei et al., 2005), для яких також показано регулювання холодом і здатність зв'язувати CRT/DRE елемент; OsDRE4-1, експресію якого в проростках рису індукуює зневоднення і високий вміст солі (Tian et al., 2005); DaCBF7 *D. antarctica*, який індукуюється абіотичними стресами, в тому числі посухою, холодом і засоленням (Byun et al., 2015).

На сьогоднішній день багато генів ТФ з груп CBF/DREB1 та DREB4 залишаються неохарактеризованими, їх вивчення сприяло б виявленню додаткових цінних генів-кандидатів для поліпшення сільськогосподарських культур. Щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* Desv.) є єдиним видом злаків, який зростає в суворих умовах Антарктиди (Alberdi et al., 2002; Parnikoza et al., 2011). Як екстремофіл, цей вид є цікавим об'єктом для дослідження молекулярних основ стресостійкості, та може бути корисним як джерело генів, асоційованих із цією ознакою (Lee et al., 2013). Раніше нами було проведено аналіз передбачених *in silico* генів ТФ з групи DREB2 та виявлено відмінності у нуклеотидній послідовності DaDREB2B, які передба-

чають можливість виключення консервативного для ряду генів-ортологів інших злаків механізму регулювання експресії шляхом альтернативного сплайсингу. Внаслідок однонуклеотидної заміни, що привела до утворення нового старт-кодону, нефункціональна в інших злаків конститутивна форма транскрипта цього гена перетворилася у *D. antarctica* на функціональну (Бублик та ін., 2016).

Метою цієї роботи було передбачення *in silico* генів CBF/DREB1 та DREB4 у *D. antarctica*, проведення їх класифікації та характеристика шляхом порівняння із послідовностями описаних раніше ортологів інших видів, виявлення особливостей складу кластерів цих генів та їх можливої ролі у формуванні холодостійкості виду.

2. Матеріали і методи

Пошук послідовностей генів *CBF/DREB1* та *DREB4* *D. antarctica* проводили за допомогою програми BLAST (Camacho et al., 2009) в архівах SRA (sequence read archive) із бази даних GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), що містять дані розшифрування геномної ДНК та мРНК (SRX465632, SRX465633) (Lee et al., 2014). Як референсні ДНК використовували послідовності генів-ортологів інших злаків, представлені у GenBank. Другою стратегією був пошук послідовностей із гомологією 75–85 % до AP2/ERF-доменів попередньо ідентифікованих генів *D. antarctica* та подальша перевірка спорідненості цих послідовностей до генів із груп CBF/DREB1 і DREB4 та наявності характерних амінокислотних мотивів у складі трансльованих з них білків. Збирання послідовностей генів із фрагментів архіву SRA виконували за допомогою модуля ContigExpress програми VectorNTI (InforMax, USA). Вирівнювання послідовностей білків за методом ClustalW (Thompson et al., 1994), та наступну кластеризацію послідовностей за методом Neighbour Joining (Saitou and Nei, 1987) проводили у програмі Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Візуалізацію вирівнювання здійснювали за допомогою програми GeneDoc Version 2.7 (Nicholas et al., 1997). Молекулярну вагу Mw та теоретичну ізоелектричну точку pI білкових молекул розраховували за допомогою додатку Compute pI/Mw на сервері ExPASy (Gasteiger et al., 2005).

3. Результати та обговорення

В результаті аналізу даних секвенування нового покоління геномної ДНК та мРНК *D. antarctica* із використанням як референсних послідовностей ідентифікованих генів споріднених видів злаків передбачено *in silico* існування 17 генів-кандидатів *D. antarctica*, що належать до груп CBF/DREB1 та DREB4. Передбаченим генам *DaCBF* після їх характеристики шляхом порівняння із послідовностями описаних раніше ортологів та класифікації присвоєно назви за номенклатурою, запропонованою Бадаві та співавторами (Badawi et al., 2007). Наприклад, *DaCBFIIIa-6* позначає послідовність, що належить до групи III, підгрупи *a* та має найвищу гомологію до ортологу *TaCBF6*.

Три гени (*DaCBFI-1*, *DaCBFII-5*, *DaCBBFIIIid-12*) зібрані частково через відсутність у архіві геномної ДНК повного покриття послідовності та відсутність цих послідовностей у архіві мРНК. Ці гени представлені кількома контигами, приналежність яких до однієї послідовності підтверджується тим, що вони містять у своєму складі по одному з парних прочитань (рідів). Також зібрано низку контигів з високою гомологією до генів *CBF* з групи III, які не вдалося продовжити до повних послідовностей (дані не наведено). Це вказує на те, що група CBFIII у *D. antarctica* може бути чисельнішою, а не обмеженою чотирма зібраними нами генами. Водночас, не виключено можливість, що деякі частково зібрані гени є не функціонуючими, а пошкодженими послідовностями – псевдогенами.

Для однієї з груп генів (група IV) було зібрано декілька варіантів початків і кінців, які виявилося технічно складно об'єднати в одну послідовність через велику протяжність центральної ділянки, яка є високогомологічною у всіх варіантів. У таблиці наведено усі зібрані нами комбінації, однак для підтвердження їх існування у геномі потрібні додаткові дослідження із клонуванням та секвенуванням цих послідовностей. У назві цих генів після підгрупи вказане поєднання умовних номерів початку (B-beginning) та кінця (E-end). До аналізу було також залучено ген *DaCBF7* (GenBank, KM588101) з групи DREB4, описаний раніше (Byun et al., 2015).

Таблиця. 1

Назви та характеристика передбачених транскрипційних факторів CBF/DREB1 та DREB4 *D. antarctica*

| № | Транскрипційний фактор | Відкрита рамка зчитування, а.з. | Розрахункова молекулярна маса, кДа | Теоретична ізоелектрична точка, рІ | Нааяність послідовностей у базі МРНК | Найближчі гомологи, знайдені за використання ПЗ Blast в GenBank | Покриття послідовності, % | Ідентичність, % |
|----|-----------------------------|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--|---------------------------|-----------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 1. | <u>DaCBFI-1</u> | 218+* | 23,6+ | ~5.64 | - | AP2 domain CBF protein [<i>Triticum aestivum</i>] (CBFI-1.1) AFR67775.1 TaCBF11 [<i>T. aestivum</i>] AAX28967.1 | 100 | 83 |
| 2. | <u>DaCBFII-5</u> | 217+* | 23,7+ | ~6.07 | - | CBFII-5.2 [<i>T. aestivum</i>] ABK55356.1 HvCBF5 [<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>] AAX23698.1 | 90 | 60 |
| 3. | <u>DaCBFIIIa-6</u> | 226 | 24,1 | 4.80 | - | C-repeat/DRE-binding factor 3 [<i>Lolium perenne</i>] (CBF3) AAX57275.1 TaCBF6 [<i>T. aestivum</i>] AAX28964.1 | 96 | 79 |
| 4. | <u>DaCBFIIIc-3</u> | 239 | 25,5 | 4.96 | + | CBF3 [<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>] ABE02630.1 CBFIIIc-10 [<i>Secale cereale</i>] ABY59780.1 CRT/DRE binding factor 13 [<i>T. monococcum</i>] AAY32555.1 | 93 | 74 |
| 5. | <u>DaCBFIIIId-12</u> | 186+* | 19,4+ | ~4.60 | - | CBF-like transcription factor [<i>Avena sativa</i>] (cbf4) CAJ21278.2 Putative CBFIIIId-B12-like protein [<i>T. aestivum</i>] AEE00121.1 | 94 | 64 |
| 6. | <u>DaCBFIIIId-16</u> | 238 | 25,0 | 5.08 | - | CRT-binding factor [<i>L. perenne</i>] (LpCBFIa) BAF36837.1 AP2 domain CBF protein [<i>T. aestivum</i>] (CBFIIIId-16.1b) AFR67800.1 | 100 | 87 |
| 7. | <u>DaCBFIVa-2</u> | 218 | 23,6 | 5.52 | + | putative DRE-binding protein DREB1 [<i>Festuca arundinacea</i>] AAQ98965.1 CBFIVa-A2 [<i>T. aestivum</i>] ABK55372.1 AP2 domain CBF protein [<i>T. aestivum</i>] (CBFIIIId-16.1a) AFR67785.1 TaCBF6 [<i>T. aestivum</i>] AAX28964.1 Putative CBFIIIId-B12-like protein [<i>T. aestivum</i>] AEE00121.1 | 100 | 91 |
| 8. | <u>DaCBFIV-B2E3</u> | 206 | 22,0 | 8.69 | + | CRT-binding factor [<i>L. perenne</i>] LpCBFIVa BAF36843.1 HvCBF9 [<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>] AAX28955.1 HvCBF4D [<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>] AAX23696.1 | 100 | 74 |
| | | | | | | | 86 | 84 |
| | | | | | | | 93 | 72 |

Продовження таблиці. 1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----|------------------------------|-----|------|------|---|--|-----|----|
| 9. | <u>DaCBFIV-B3E2</u> | 218 | 23,4 | 7.83 | + | CBFIVd-D9 [<i>T. aestivum</i>] ABK55387.1 | 88 | 80 |
| | | | | | | CRT-binding factor [<i>L. perenne</i>] BAF36843.1 | 99 | 77 |
| | | | | | | CBFIVb-B20 [<i>T. aestivum</i>] ABK55376.1 | 98 | 73 |
| | | | | | | HvCBF14 [<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>] ABA01493.1 | 99 | 70 |
| 10. | <u>DaCBFIV-B3E3</u> | 203 | 21,8 | 8.66 | + | HvCBF9 [<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>] AAX28955.1 | 87 | 84 |
| | | | | | | CRT-binding factor [<i>L. perenne</i>] LpCBFIVa BAF36843.1 | 100 | 76 |
| | | | | | | HvCBF4D [<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>] AAX23696.1 | 93 | 72 |
| | | | | | | CBF protein 4 [<i>H. vulgare</i>] AEP32102.1 | 94 | 70 |
| | | | | | | putative CBFIVb-21.1 [<i>T. aestivum</i>] AEE00127.1 | 94 | 70 |
| 11. | <u>DaCBFIV-B4E2</u> | 218 | 23,3 | 7.84 | + | CBFIVd-D9 [<i>T. aestivum</i>] ABK55387.1 | 88 | 81 |
| | | | | | | HvCBF14 [<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>] ABA01493.1 | 99 | 70 |
| | | | | | | C repeat-binding factor 2 [<i>Triticum aestivum</i>] AAT76662.1 | 99 | 70 |
| | | | | | | CBFIVb-B20 [<i>T. aestivum</i>] ABK55376.1 | 98 | 73 |
| 12. | <u>DaCBFIVd-B1E1</u> | 218 | 23,8 | 6.60 | + | CRT-binding factor [<i>L. perenne</i>] (LpCBFVb) BAF36846.1 | 97 | 80 |
| | | | | | | CRT/DRE binding factor 4 [<i>T. monococcum</i>] AAY32562.1 | 92 | 78 |
| | | | | | | HvCBF9 [<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>] AAX28955.1 | 96 | 77 |
| | | | | | | CBFIVd-4.1 [<i>T. aestivum</i>] ABK55383.1 | 99 | 72 |
| 13. | <u>DaCBFIVd-B5E1</u> | 213 | 23,2 | 6.44 | + | HvCBF9 [<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>] AAX28955.1 | 95 | 83 |
| | | | | | | CRT-binding factor [<i>L. perenne</i>] BAF36846.1 | 98 | 81 |
| | | | | | | AP2 domain CBF protein [<i>T. aestivum</i>] (TaCBFIVd-26.2a) AFR67796.1 | 95 | 80 |
| 14. | <u>DaCBFIVd-B6E1a</u> | 217 | 23,8 | 6.32 | + | CRT-binding factor [<i>L. perenne</i>] (LpCBFVb) BAF36846.1 | 95 | 81 |
| | | | | | | CRT/DRE binding factor 4 [<i>T. monococcum</i>] AAY32562.1 | 91 | 78 |
| | | | | | | HvCBF9 [<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>] AAX28955.1 | 96 | 78 |

Закінчення таблиці 1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----|------------------------------|-----|------|------|---|---|-----|----|
| 15. | DaCBFIVd- B6E4 | 211 | 23,1 | 5.84 | + | CRT-binding factor [<i>L. perenne</i>] (LpCBFVb) BAF36846.1 | 95 | 81 |
| | | | | | | CRT/DRE binding factor 4 [<i>T. mono- coccum</i>] AAY32562.1 | 91 | 78 |
| | | | | | | AP2 domain CBF protein [<i>T. aes- tivum</i>](TaCBFIVd-26.2a) AFR67796.1 | 91 | 78 |
| | | | | | | CBFIVd-4.1 [<i>T. aestivum</i>] ABK55383.1 | 100 | 74 |
| 16. | DaDREB4-1 | 219 | 23,2 | 5.67 | + | HvCBF7 [<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>] AAX23704.1 | 99 | 87 |
| 17. | DaDREB4-2 | 244 | 26,0 | 5.90 | + | dehydration responsive element binding protein 4-2 [<i>Oryza sativa</i> Indica] AIY27949.1 | 73 | 68 |
| 18. | DaCBF7 (KM588101) | 270 | 28,2 | 5.79 | + | TmCBF7 [<i>T. monococcum</i>] AAX28965.1 | 100 | 73 |

Примітка: * – послідовність зібрано частково.

Характеристики білків – продуктів експресії передбачених генів представлено у таблиці. Для білків, послідовність яких зібрана повністю, довжина відкритої рамки читування складає 203–270 а.з., розрахункова молекулярна маса (MW) – 21,8–28,2 кДа, теоретична ізоелектрична точка (pI) – 4,80–8,69, найвища ідентичність до гомологічних білків – 68–91 %. Показники pI у різних груп узгоджуються з даними, отриманими для CBF Роасеае – білки з груп CBF1 і CBF3 мають кислі властивості, тоді як членам підгрупи CBF4 властиві різні значення pI від кислих до основних (Skinner et al., 2005). У таблиці також наведено дані про присутність гомологічних послідовностей у базі мРНК *D. antarctica*, яка була отримана після розшифрування транскриптому рослини цього виду за виробування в сприятливих умовах. Наявність таких послідовностей свідчить про експресію відповідних генів у рослин щучника в нормі. База даних GenBank також містить розшифровані послідовності транскриптому рослин *D. antarctica*, які піддавали стресу холоду, посухи та засолення (Lee et al., 2013) (SRX143512–SRX143514), проте малий розмір цих архівів не дозволяє ефективно з ними працювати.

Гени *CBF* та *DREB4 D. antarctica*, для яких були зібрані послідовності ДНК та мРНК, не містили інтронів, що є типовим для цієї групи (Skinner et al., 2005).

Аналіз амінокислотних послідовностей, отриманих шляхом трансляції *in silico*, виявив, що білки, які є потенційними продуктами експресії передбачених генів, мають один консервативний ДНК-зв'язувальний AP2/ERF-домен довжиною 59–63 а.з. з послідовністю [A-Z]*WV[A-Z]E[A-Z]R[AZ]*WLG[A-Z]{7}A[A-Z]* (рис. 1). За літературними даними у DREB білків зазвичай консервативні валін (V14) і глутамінова кислота (E19) у позиціях 14 та 19, відповідно. Ці 2 амінокислоти найбільш важливі для зв'язування послідовностей ДНК-мішені. Проте у деяких білків залишок E19 не консервативний, його заміщення аспарагіновою кислотою (D19) майже не впливає на впізнавання сайтів зв'язування (Sakuma et al., 2002). Для багатьох CBF злків у позиції 19 консервативний валін (Bräutigam et al., 2005). У більшості білків CBF/DREB1 типу присутні мотив VC/SEV/LRE у складі ДНК-зв'язувального домена, сигнальдерної локалізації PKRPAGRTKFRERTRHP, мотив DSAW, що фланкує домен ERF/AP2 і консервативний мотив LWSY на С-кінці (Lata and Prasad, 2011).

Більшість білків DaCBF мають ключовий ДНК-зв'язувальний мотив VCEVRV, який також поширений у ортологів інших видів. У DaCBFI-I виявлено мотив ICEVRE, у якому заміна валіна на ізолейцин пов'язана зі зміною першого нуклеотида триплету G на A. Серед гомологічних білків такий варіант нами був знайдений лише у ТФ CBF1 *Betula platyphylla* (ADZ23479.1). Така заміна ключовою для зв'язування ДНК амінокислоти ставить під сумнів функціональну активність цих ТФ. У DaCBFIVd-B6E1a послідовність цього мотиву змінена на VCEMRV, проте цей варіант присутній і у деяких його ортологів.

Бублик О. М., Андреев І. О., Кунах В. А.
 БІОІНФОРМАТИЧНЕ ПЕРЕДБАЧЕННЯ ГЕНІВ ІНДУКОВАНИХ ХОЛОДОМ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ
 CBF/DREB1 ТА DREB4 У *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV.

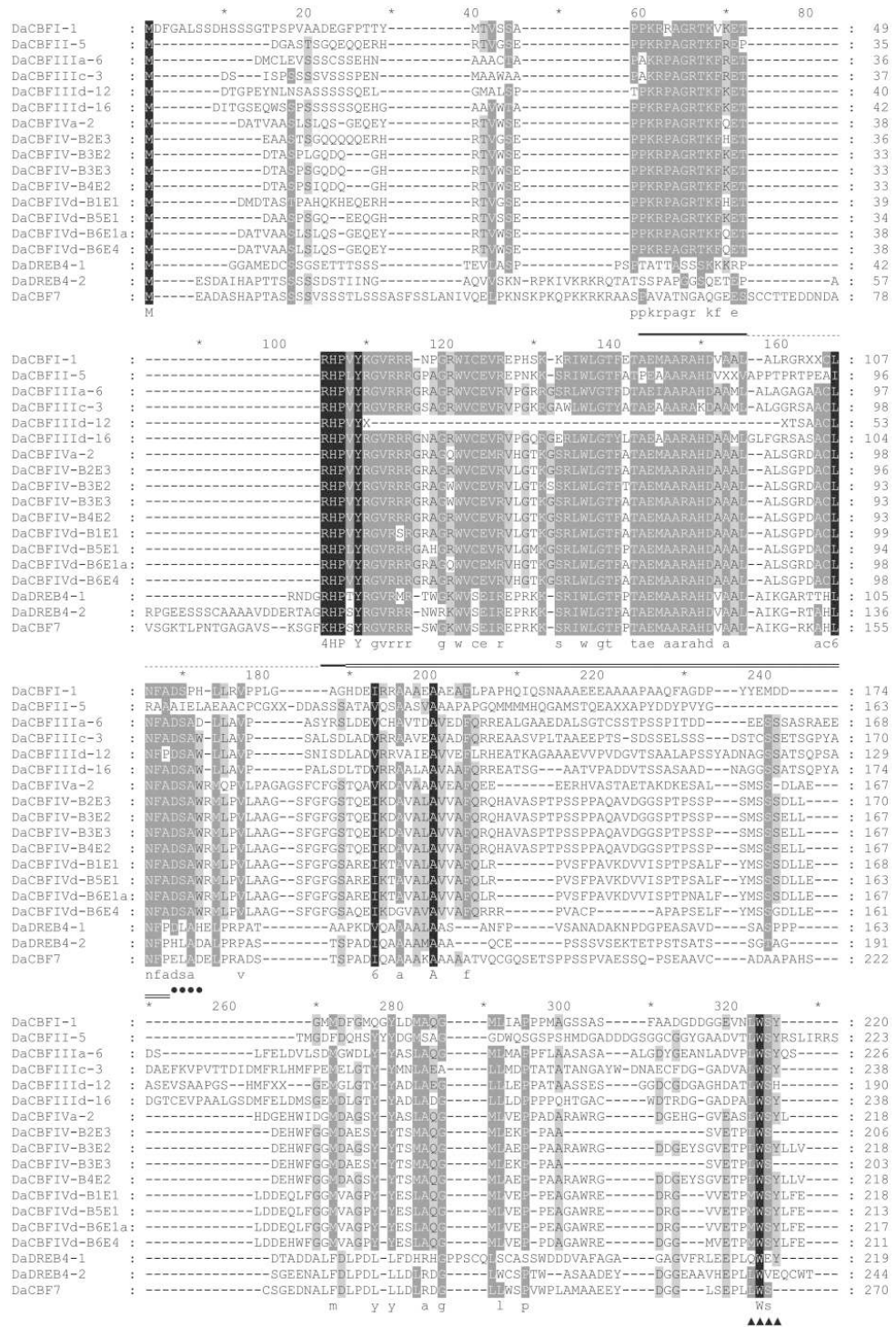


Рис. 1. Вирівнювання амінокислотних послідовностей білків з родин CBF/DREB1 та DREB4 для *D. antarctica*. Сигнал ядерної локалізації підкреслено одинарною лінією, AP2/ERF-домен – подвійною, консервативний мотив DSAW позначено кружечками, LWSY – трикутниками. Консервативні амінокислотні залишки серед усіх або більшості послідовностей виділені чорним та сірим фоном, відповідно.

У мотиві сигналу ядерної локалізації також знайдено відмінності за окремими амінокислотами: у більшості білків DaCBF він має послідовність PKRPAGRTKFK(Н,О)ETRHP, а у DaCBFIIIa-6, DaCBFIIIc-3 – AKRPAGRTKFRETRHP, але такі варіанти характерні і для ортологів інших рослин. У DaCBFII-5 знайдено варіант мотиву PKRPAGRTKFREPRHP, утворення якого зумовлене заміною першого нуклеотиду триплету А на С. Нам не вдалося знайти гомологічні білки з таким варіантом мотиву в базі даних, можливо це помилка секвенування, оскільки кількість прочитань цієї ділянки гена вкрай обмежена. Послідовність мотиву сигналу ядерної локалізації DaCBFI-1–PKRRAGRTKVKETRHP також не зустрічається у ортологів. Найближчі варіанти, які знайдені у гомологічних білків з бази даних, – PKRRAGRTKFKETRHP та PKRRAGRTKVKETRHP. Варіанти мотиву сигналу ядерної локалізації для груп CBF1, CBF3 і CBF4 загалом узгоджуються з даними (Skinner et al., 2005) для однодольних, і відповідно можуть бути записані як PKRP/RAGR_xKF/V_xETRHP, KRPAGR_xKF_xETRHP і PKRP/RAGR_xKF/L_xETRHP.

Мотив DSAW консервативний у більшості білків DaCBF. У DaCBFIIIa-6 цей мотив змінений на DSAD (у ортологів йому відповідають послідовності DSAE, DSAQ, DSAS), у DaCBFI-1 – на DSPH (у ортологів зустрічаються варіанти DSPR, DSPW, DSPL, DSPR). Послідовність DaCBFII-5 зібрана частково і ділянка з цим мотивом туди не увійшла. За виключенням DaCBFIIIa-6, мотиви характерні для груп CBF1, CBF3 і CBF4, збігаються з варіантами, описаними в роботі (Skinner et al., 2005), – відповідно DSA/P, DSAW/E і DSAWR.

Найрізноманітніші відхилення від канонічного варіанту знайдені в С-кінцевому мотиві LWSY. Більша частина їх зустрічається у ортологів, деякі є унікальними для ТФ *D. antarctica*. Так у білків із End1 та End4 присутній кінцевий мотив MWSYLFE, до якого найближчий варіант із бази даних - LWSYLFE. Білки із End2 мають мотив LWSYLLV, який не виявлено у гомологічних білків, представлених у базі даних. У DaDREB4-2 кінцевий мотив має послідовність LLWVEQCWT, ТФ з такою послідовністю так само відсутні у базі даних, найближчий знайдений варіант – LLWVEQCWMDAAAPVHPA.

Іншими дослідниками (Skinner et al., 2005) також було виявлено варіабельність розширених мотивів С-кінцевого домену, характерну для членів підгрупи CBF4, що автори пов'язують із холодозалежним зв'язуванням ДНК транскрипційними факторами цієї групи.

У літературі немає інформації щодо характерних консервативних мотивів ТФ з групи DREB4. У білків групи DREB4 *D. antarctica* нами знайдено ключовий для специфічного зв'язування з ДНК-мішенню мотив VSEIRE (Sakuma et al., 2002).

Вирівнювання амінокислотних послідовностей білків з родин CBF/DREB1 та DREB4 *D. antarctica* показало їх найвищу подібність у ділянці AP2/ERF-домену, а в межах родини CBF/DREB1 також у ділянці розташування сигналу ядерної локалізації (рис. 1).

Філогенетичний аналіз показав спорідненість білків передбачених генів *D. antarctica* та білків з родин CBF/DREB1 та DREB4 інших видів рослин, знайдених в базі GenBank (рис. 2). За класифікацією Бадаві та співавторів (Badawi et al., 2007) отримані нами шляхом трансляції *in silico* білки DaCBF розподілилися таким чином: до груп/підгруп I, II, IIIa, IIIc та IVa увійшло по одному ТФ, до IIIId – два, до IIIb – жодного. До підгрупи IVd увійшли чотири білки. Ще чотири білки утворили окремий кластер з LpCBFIVa в межах групи IV. Інші їхні найближчі ортологи входять до різних підгруп (таблиця), тому чітко встановити їхню приналежність до підгрупи неможливо. Слід зауважити, що ТФ LpCBFIVa та LpCBFIVb, які увійшли до одного кластеру з білками *D. antarctica* з групи IV, були названі авторами (Tamura and Yamada, 2007) без дотримання класифікації Бадаві та співавторів (Badawi et al., 2007), тому їхні назви не відображають приналежність до підгруп, і в дійсності обидва вони належать до групи IV. До кластеру DREB4 увійшли два передбачені нами ТФ та DaCBF7 (KM588101).

Отже, загалом за складом передбачених нами ТФ *D. antarctica* подібна до інших злаків, проведений пошук дозволив виявити представників усіх відомих груп (рис. 2). Було знайдено лише по одному ТФ з груп CBF1 та CBFII, однак, за літературними даними, ці групи менш численні порівняно з іншими групами CBF. Група I є найдавнішою групою CBF однодольних і має найвищу ступінь гомології з CBF дводольних (Badawi et al., 2007).

Групи CBFIII та CBFIV у *D. antarctica* найчисленніші, до них відносяться відповідно чотири та вісім з передбачених ТФ. Загалом збільшення розміру родини CBF спостерігається у всіх злаків, але підгрупи IIIc, IIIId, IVa, IVb, IVc і IVd зустрічаються тільки у підродиною Pooidae, що може свідчити про те, що вони задіяні у механізмах відповіді на стрес, які розвинулися останнім часом під час колонізації цієї підродиною місць зростання з помірним кліматом (Badawi et al., 2007; Skinner et al., 2005).

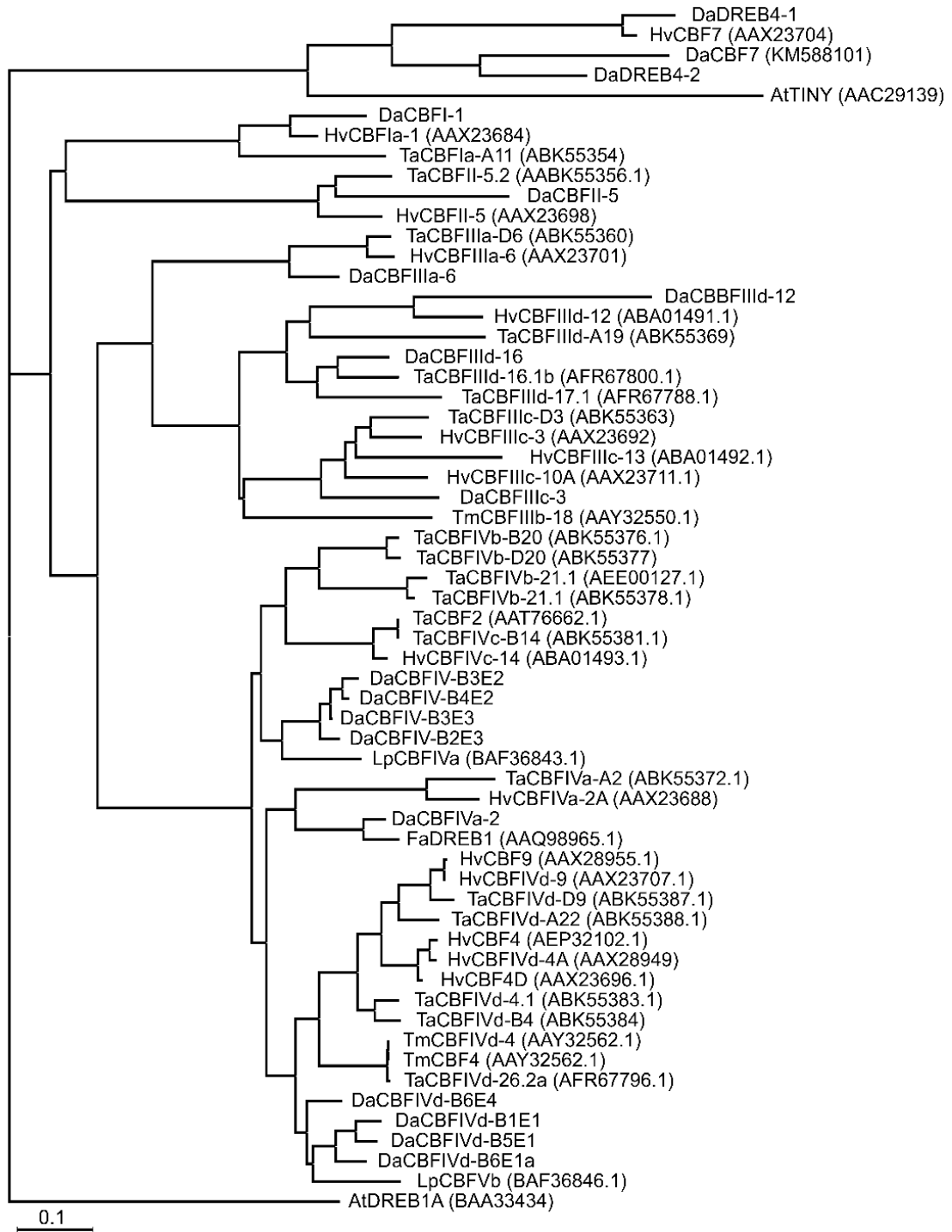


Рис. 2. Філогенетичний аналіз білків з родин CBF/DREB1 та DREB4 *D. antarctica* та інших видів рослин (метод Neighbour Joining). У назвах білків використано такі видові скорочення: At – *Arabidopsis thaliana*; Fa – *Festuca arundinacea*; Hv – *Hordeum vulgare*; Lp – *Lolium perenne*; Ta – *Triticum aestivum*; Tm – *Triticum monococcum*. У дужках наведено ідентифікаційні номери GenBank

За літературними даними, ТФ з цих підгруп мають низку цікавих особливостей. Індукція акліматизації до низьких температур озимих і ярих сортів найбільш холодостійкого злаку – жита – була найсильніше пов'язана з рівнем експресії послідовностей CBF, що належать саме до груп III і IV (Campoli et al., 2009). П'ять підгруп (CBFIIIId, IVa, IVb, IVc і IVd) продемонстрували вищу конститутивну і індуквану низькою температурою експресію у озимого сорту *T. aestivum* порівняно з ярим. Це дозволяє припустити, що ТФ з цих підгруп можуть бути основними компонентами, які регулюють у видів *Pooideae* потенціал толерантності до низьких температур (Badawi et al., 2007).

ТФ *D. antarctica* у межах групи IV утворили кластери, що не зовсім вписувалися у характерні для злаків підгрупи, однак припустити зв'язок появи цих дещо філогенетично віддалених білків із підвищеною холодостійкістю виду важко, оскільки вони кластеризувалися з ТФ *Lolium perenne* L., який є менш зимостійким, ніж інші злаки помірнього клімату (Tamura and Yamada, 2007).

У ТФ груп IIIId, IVa, IVb, IVc і IVd спостерігали добові коливання рівня експресії, яка досягала максимуму на 8-14 годину після світанку, передуючи нічному зниженню температури (Badawi et al., 2007). Досліджені білки підгрупи HvCBF4 здатні до зв'язування з мотивом CRT лише в умовах низької температури на відміну від членів підгруп HvCBF1 і HvCBF3, які зв'язуються у теплих і холодних умовах (Skinner et al., 2005). Завдяки такій особливості щоденне накопичення цих білків за нормальних умов зростання не викликає змін експресії генів COR. Після падіння температури активність зв'язування з ДНК цих ТФ зростає, а отже вони найвірогідніше є групою, яка функціонує як перша лінія захисту від різких перепадів температури (Badawi et al., 2007). Проведений нами аналіз транскриптомних послідовностей *D. antarctica*, представлених в GenBank, виявив конститутивну експресію ТФ з груп IIIc та IV.

Окрім залежності максимальної активності зв'язування від низьких температур у CBF із групи IV, нехарактерної для представників інших груп (Skinner et al., 2005; Xue, 2003), є й інші дані, які вказують на специфічні властивості і функції різних білків CBF. Показано різну специфічність сайтів зв'язування ДНК для окремих CBF у *A. thaliana* (Sakuma et al., 2002), ячменю (Xue, 2002; Xue, 2003; Skinner et al., 2005), *Brassica napus* (Gao et al., 2002) і рису (Dubouzet et al., 2003). Великі відмінності за рівнем і/або кінетикою індукції експресії спостерігали між окремими CBF у видів *Triticum* (Badawi et al., 2007), *Lolium perenne* (Tamura and Yamada, 2007), *Brassica napus* (Gao et al., 2002), *Eucalyptus gunnii* (Navarro et al., 2009) і видів *Vitis* (Xiao et al., 2006). Для видів *Vitis* (Xiao et al., 2008) продемонстровано транканоспецифічність експресії різних CBF, такі ж дані отримано для *A. thaliana* (Novillo et al., 2007).

Решта проаналізованих у нашому дослідженні ТФ *D. antarctica*, а саме два передбачені нами ТФ разом із описаним раніше DaCBF7 (KM588101, Byun et al., 2015), увійшли до кластеру DREB4. Літературні дані щодо цієї групи обмежені, деякі автори відносять ці ТФ до групи CBF (Skinner et al., 2005; Nakano et al., 2006). Біологічні функції описані лише для окремих ТФ (Sakuma et al., 2002; Skinner et al., 2005; Byun et al., 2015; Tian et al., 2005; Wei et al., 2005), але загалом ця група є численнішою (Sakuma et al., 2002; Sharoni et al., 2011). Передбачені нами білки виявили досить високу гомологію до описаних у літературі ТФ, для яких показана індукція за дії холоду, посухи, та при засоленні ґрунту (Skinner et al., 2005; Byun et al., 2015) (рис. 2). За даними аналізу транскриптомних послідовностей з GenBank, ТФ *D. antarctica* з групи DREB4 характеризуються конститутивною експресією, як це було описано раніше (Tian et al., 2005; Byun et al., 2015). Особлива функціональна роль різних груп CBF та DREB4 свідчить про необхідність подальшої роботи для виявлення їх внеску у формування холодостійкості *D. antarctica*.

Порівняльні дослідження показують, що шлях відповіді на холод, у якому задіяні CBF, консервативний у багатьох видів із різним рівнем здатності до холодової акліматизації (Jaglo et al., 2001). Загалом групи CBF у членів триби пшеничних (Triticeae) мають подібний склад генів-ортологів (Campoli et al., 2009), проте, є велика різниця у здатності переживати негативні температури, наприклад, між озимими сортами жита та озимою пшеницею і ячменем (Fowler and Carles, 1979). Це свідчить про існування додаткових генетичних основ відмінностей за холодостійкістю, літературні дані щодо яких обговорюються нижче.

Рівень експресії генів з групи CBF. У низці робіт було знайдено кореляцію морозостійкості з рівнем експресії генів з групи CBF. Такі дані одержано для *A. thaliana* (Hannah et al., 2006), ячменю звичайного *Hordeum vulgare* (Skinner et al., 2005), пшениці м'якої *Triticum aestivum* (Knox et al., 2008; Todorovska et al., 2014), гексаплоїдних пшениць *T. aestivum* і *T. monococcum* (Badawi et al., 2007), *Poncirus trifoliata* і грейпфрута *Citrus paradisi* (Champ et al., 2007).

Число копій кодуючих послідовностей CBF. Значне число генів у геномах рослин розташовані тандемно (Moore and Rugganan, 2005), що свідчить про те, що дуплікація генів є поширеним процесом. Як згадувалося вище, у *Pooideae* зазнали дуплікацій підродиною CBF3 і CBF4 (Badawi et al., 2007). Три гена *CBF* у *A. thaliana* розташовані тандемно на четвертій хромосомі, що вказує на те, що до створення даного кластеру CBF привели локальні дуплікації. Чотири паралоги *CBF* арабідопсиса (*CBF1-CBF3 / CBF4 / DDF1 / DDF2*) також виникли внаслідок трьох незалежних сегментних дуплікацій (Tang et al., 2008). Філогенетичний аналіз виявив, що поява гена *CBF4* у *S. commersonii* і кластера *CBF5-CBF4* у *Solanum tuberosum* є результатом дуплікації кластеру *CBF3-CBF1-CBF2* (Pennycooke et al., 2008). Оскільки гени *CBF* не мають інтронів, дупліковані копії могли виникнути

за допомогою транспозиції, проте їхня безпосередня близькість більшою мірою узгоджується з утворенням шляхом проковзування ДНК-полімерази під час реплікації (Semple and Wolfe, 1999).

У межах окремих видів число копій генів також може відрізнятися, прямо корелюючи із холодостійкістю. Показано, що у озимого ячменю сортів Dicktoo і Nure збільшене число копій генів *CBF* порівняно з якими сортами Mogex і Tremois. Блот гібридизація з ДНК пшениці виявила більше число копій *CBF14* у озимій пшениці, порівняно з ярою. Озимі пшениці, що походять від кримських місцевих сортів, мають підвищену кількість копій *CBF14*, ніж пшениці з країн Західної та Північної Європи, а також перевершують їх за морозо- та зимостійкістю (Knox et al., 2010). За даними (Dhillon and Stockinger, 2013) у пшениці морозо- та зимостійкі генотипи мають більшу кількість тандемних копій геномної області, що включає гени *Cbf2A* і *Cbf4B*, ніж менш стійкі генотипи. Крім того, серед гексаплоїдних червоних пшениць озимі генотипи мають більшу кількість копій *Cbf14*, ніж ярі.

Дупліковані гени надають перевагу організму за рахунок адитивної дії, крім того вони є ключовою рушійною силою для створення нових функцій генів. Буферний ефект, створений великою кількістю дуплікованих генів, приводить до зниження тиску добору на окремі гени з додатковою функцією у сигнальній системі відповіді на холодострес, і отже, до зростання їхнього нуклеотидного різноманіття (Moore and Purugganan, 2005).

Розмір регулона CBF. Мінливість лише за генами CBF не може пояснити всі відмінності за холодостійкістю. У деяких випадках регулон CBF може мати меншу чисельність або менш виражено реагувати на стресові умови. Наприклад, у *A. thaliana* регулон CBF включає за різними даними 85-172 генів (Vogel et al., 2005; Jia et al., 2016; Park et al., 2015), у тополі – 63 гени (Benedict et al., 2006), в той час як регулони CBF томата (Zhang et al., 2004) і рису (Dubouzet et al., 2003) мають лише близько 10 генів. Аналогічні дані отримано за допомогою транскриптомного аналізу для тропічних злаків порівняно із злаками помірної зони (Tondelli et al., 2011).

Внесок інших генних мереж. Отримано свідчення того, що активація під впливом холоду регулона CBF передбачає спільне регулювання разом із іншими факторами першої хвилі транскрипції, що регулювальна генна мережа відповіді на низьку температуру є комплексною і підвищення морозостійкості, яке відбувається при холодостресі, лише частково залежить від регулювального модуля CBF (Park et al., 2015; Vogel et al., 2005; Fowler et al., 2002; Zhao et al., 2016; Jia et al., 2016). Потрібні додаткові дослідження для визначення участі CBF та інших компонентів генних мереж у відповіді на стрес у різних видів рослин.

Чисельність та склад груп DREB1/CBF і DREB4 *D. antarctica*, визначені нами шляхом біоінформатичного аналізу даних рошифрування геному та транскриптому виду, виявилися подібними до описаних у літературі для інших злаків. Виходячи з цього, можна припустити, що підвищена опірність холодостресу цієї рослини може бути пов'язана із внеском інших чинників, таких як підвищена експресія цих ТФ, збільшена копійність їх послідовностей у геномі, розмір та особливості їхнього регулону та внесок інших генних мереж.

4. Висновки

Вперше передбачені *in silico* послідовності 17 генів індукованих холодом транскрипційних факторів DREB1/CBF та DREB4. Встановлено, що послідовності білкових продуктів передбачених генів містять характерні для цих груп ДНК-зв'язувальний домен AP2/ERF і консервативні мотиви, а також показано високу гомологію їхніх послідовностей до білків-ортологів споріднених видів рослин. Філогенетичний аналіз показав, що структура групи передбачених транскрипційних факторів *D. antarctica* у цілому подібна до описаної для інших злаків: до нечисленних підгруп CBF I та CBF II увійшло по одному ТФ, до більш численних груп CBF III та CBF IV – відповідно чотири та вісім. До кластеру DREB4 увійшли три ТФ. Аналіз транскриптомних послідовностей показав конститутивну експресію ТФ з груп CBF IIIc, CBF IV та DREB4. Не вдалося виявити суттєвих особливостей чисельності та складу груп DREB1/CBF та DREB4, які б пояснювали підвищену холодостійкість *D. antarctica*, що може свідчити про роль у її формуванні інших причин, таких як підвищена експресія, копійність цих послідовностей у геномі, розмір та особливості регулону цих ТФ та внесок інших генних мереж.

Список літератури

1. Бублик О. М., Андреев І. О., Кунах В. А. Ідентифікація та аналіз *in silico* генів стрес-індукованих транскрипційних факторів DREB2 у *Deschampsia antarctica* Desv. // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 19. – С. 202 – 208.
2. Alberdi M., Bravo L.A., Gutiérrez A., Gidekel M., Corcuera L.J. Ecophysiology of Antarctic vascular plants // *Physiol. Plant.* – 2002. – Vol. 115. – P. 479 – 486.

3. **Badawi M.**, Danyluk J., Boucho B., Houde M., Sarhan F. The CBF gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal CBFs // *Mol. Genet. Genomics*. – 2007. – Vol. 277. – P. 533–554.
4. **Benedict C.**, Skinner J.S., Meng R., Chang Y., Bhalerao R., Huner N.P., Finn C.E., Chen T.H., Hurry V. The CBF1-dependent low temperature signalling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus spp.* // *Plant Cell Environ.* – 2006. – Vol. 29. – P. 1259 – 1272.
5. **Bräutigam M.**, Lindlöf A., Zakhrebekova S., Gharti-Chhetri G., Olsson B., Olsson O. Generation and analysis of 9792 EST sequences from cold acclimated oat, *Avena sativa* // *BMC Plant Biol.* – 2005. – 5:18.
6. **Byun M. Y.**, Lee J., Cui L.H., Kang Y., Oh T.K., Park H., Lee H., Kim W.T. Constitutive expression of DaCBF7, an Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* CBF homolog, resulted in improved cold tolerance in transgenic rice plants // *Plant Sci.* – 2015. – Vol. 236. – P. 61 – 74.
7. **Camacho C.**, Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. BLAST+: architecture and applications // *BMC Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 10. – P. 421.
8. **Campoli Ch.**, Matus-Cádiz M. A., Pozniak C. J., Cattivelli L., Fowler D.B. Comparative expression of Cbf genes in the Triticeae under different acclimation induction temperatures // *Mol. Genet. Genomics*. – 2009. – Vol. 282. – P. 141 – 152.
9. **Champ K. I.**, Febres V. J., Moore G. A. The role of CBF transcriptional activators in two Citrus species (Poncirus and Citrus) with contrasting levels of freezing tolerance // *Physiol. Plant.* – 2007. – Vol. 129. – P. 529 – 541.
10. **Dhillon T.**, Stockinger E. J. Cbf14 copy number variation in the A, B, and D genomes of diploid and polyploid wheat // *Theor. Appl. Genet.* – 2013. – Vol. 126, № 11. – P. 2777 – 2789.
11. **Dubouzet J. G.**, Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E. G., Miura S., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression // *Plant J.* – 2003. – Vol. 33. – P. 751 – 763.
12. **Eulgem T.** Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome // *Trends Plant Sci.* – 2005. – Vol. 10, № 2. – P. 71 – 78.
13. **Fowler D. B.**, Carles R. J. Growth, development, and cold tolerance of fall-acclimated cereal grains // *Crop Sci.* – 1979. – Vol. 19. – P. 915–922.
14. **Fowler S.**, Thomashow M. F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway // *Plant Cell.* – 2002. – Vol. 14, № 8. – P. 1675–1690.
15. **Francia E.**, Rizza F., Cattivelli L., Stanca A. M., Galiba G., Toth B., Hayes P. M., Skinner J. S., Pecchioni N. Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a ‘Nure’ (winter) x ‘Tremoisi’ (spring) barley map // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – Vol. 108. – P. 670–680.
16. **Gao M. J.**, Allard G., Byass L., Flanagan A. M., Singh J. Regulation and characterization of four CBF transcription factors from *Brassica napus* // *Plant Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 49. – P. 459–471.
17. **Gasteiger E.**, Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server / Ed. by Walker J.M. The proteomics protocols handbook. – Totowa, N.J.: Humana Press, 2005. – P. 571–607.
18. **Gilmour S.J.**, Zarka D. G., Stockinger E. J., Salazar M. P., Houghton J. M., Thomashow M. F. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression // *Plant J.* – 1998. – Vol. 16. – P. 433–442.
19. **Haake V.**, Cook D., Riechmann J. L., Pineda O., Thomashow M. F., Zhang J. Z. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 130. – P. 639–648.
20. **Hannah M.A.**, Wiese D., Freund S., Fiehn O., Heyer A. G., Hinch D. K. Natural genetic variation of freezing tolerance in Arabidopsis // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 142. – P. 98–112.
21. **Hussain S. S.**, Kayani M. A., Amjad M. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants // *Biotechnol. Progr.* – 2011. – Vol. 27, № 2. – P. 297–306.
22. **Jaglo K. R.**, Kle V. S., Amundsen K. L., Zhang X., Haake V., Zhang J. Z., Deits T., Thomashow M.F. Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species // *Plant Physiol.* – 2001. – Vol. 127. – P. 910–917.
23. **Jaglo-Ottosen K. R.**, Gilmour S. J., Zarka D. G., Schabenberger O., Thomashow M. F. Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance // *Science*. – 1998. – Vol. 280. – P. 104–106.
24. **Jia Y.**, Ding Y., Shi Y., Zhang X., Gong Zh., Yang Sh. The *cbfs* triple mutants reveal the essential functions of CBFs in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in *Arabidopsis* // *New Phytologist*. – 2016. – Vol. 212, Iss. 2. – P. 345–353.
25. **Jiang F.**, Wang F., Wu Z., Li Y., Shi G., Hu J., Hou X. Components of the Arabidopsis CBF cold-response pathway are conserved in non-heading chinese cabbage // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2011. – Vol. 29. – P. 525–532.
26. **Kasuga M.**, Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress inducible transcription factor // *Nat. Biotechnol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 287–291.

27. **Knox A.K.**, Dhillion T., Cheng H., Tondelli A., Pecchioni N., Stockinger E. J. CBF gene copy number variation at Frost Resistance-2 is associated with levels of freezing tolerance in temperate-climate cereals // *Theor. Appl. Genet.* – 2010. – P. 121, № 1. – P. 21–35.
28. **Knox A. K.**, Li Ch., Vágújfalvi A., Galiba G., Stockinger E. J., Dubcovsky J. Identification of candidate CBF genes for the frost tolerance locus Fr-A^{m2} in *Triticum monococcum* // *Plant Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 67. – P. 257–270.
29. **Lata Ch.**, Prasad M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants // *J. Exp. Bot.* – 2011. – Vol. 62, № 14. – P. 4731–4748.
30. **Lee J.**, Kang Y., Shin S. C., Park H., Lee H. Combined analysis of the chloroplast genome and transcriptome of the Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* Desv // *PLOS ONE.* – 2014. – Vol. 9, Iss. 3 – e92501.
31. **Lee J.**, Noh E. K., Choi H.-S., Shin S., Park H., Lee H. Transcriptome sequencing of the Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* Desv. under abiotic stress // *Planta.* – 2013. – Vol. 237. – P. 823–836.
32. **Liu Q.**, Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* – 1998. – Vol. 10. – P. 1391–1406.
33. **Miller A. K.**, Galiba G., Dubcovsky J. A cluster of 11 CBF transcription factors is located at the frost tolerance locus Fr-A^{m2} in *Triticum monococcum* // *Mol. Genet. Genomics.* – 2006. – Vol. 275. – P. 193–203.
34. **Mohseni S.**, Che H., Djillali Z., Dumont E., Nankeu J., Danyluk J. Wheat CBF gene family: identification of polymorphisms in the CBF coding sequence // *Genome.* – 2012. – Vol. 55, № 12. – P. 865–881.
35. **Moore R. C.**, Purugganan M. D. The evolutionary dynamics of plant duplicate genes // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2005. – Vol. 8. – P. 122–128.
36. **Nakano T.**, Suzuki K., Fujimura T., Shinshi H. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice // *Plant Physiol.* – 2006. – Vol. 140. – P. 411–432.
37. **Nakashima K.**, Yamaguchi-Shinozaki K. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants // *Physiol. Plant.* – 2006. – Vol. 126. – P. 62–71.
38. **Navarro M.**, Marque G., Ayax C., Keller G., Borges J. P., Marque C., Teulieres C. Complementary regulation of four Eucalyptus CBF genes under various cold conditions // *J Exp. Bot.* – 2009. – Vol. 60, № 9. – P. 2713–2724.
39. **Nicholas K. B.**, Nicholas H. B. J., Deerfield D. W. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation // *EMBNEW News.* – 1997. – Vol. 4. – P. 14.
40. **Novillo F.**, Alonso J. M., Ecker J. R., Salinas J. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 3985–3990.
41. **Novillo F.**, Medina J., Salinas J. *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104. – P. 21002–21007.
42. **Okonechnikov K.**, Golosova O., Fursov M., the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics.* – 2012. – Vol. 28. – P. 1166–1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091
43. **Park S.**, Lee Ch.-M., Doherty C. J., Gilmour S. J., Kimand Y. S., Thomashow M.F. Regulation of the *Arabidopsis* CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network // *Plant J.* – 2015. – Vol. 82. – P. 193–207.
44. **Parnikoza I.**, Kozeretska I., Kunakh V. Vascular plants of the Maritime Antarctic: Origin and adaptation // *Am. J. Plant Sci.* – 2011. – Vol.2, N3. – P.381-395. DOI: 10.4236/ajps.2011.23044
45. **Pennycooke J. C.**, Cheng H., Roberts S. M., Yang Q., Rhee S.Y., Stockinger E.J. The low temperature-responsive, *Solanum* CBF1 genes maintain high identity in their upstream regions in a genomic environment undergoing gene duplications, deletions, and rearrangements // *Plant Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 67. – P. 483–497.
46. **Saitou N.**, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* – 1987. – Vol. 4, Iss. 4. – P. 406–425.
47. **Sakuma Y.**, Liu Q., Dubouzet J. G., Abe H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – Vol. 290, № 3. – P. 998–1009.
48. **Semple C.**, Wolfe K. H. Gene duplication and gene conversion in the *Caenorhabditis elegans* genome // *J. Mol. Evol.* – 1999. – Vol. 48. – P. 555–564.
49. **Sharoni A. M.**, Nuruzzaman M., Satoh K., Shimizu T., Kondoh H., Sasaya T., Choi I.R., Omura T., Kikuchi S. Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice // *Plant Cell Physiol.* – 2011. – Vol. 52, № 2. – P. 344–360.

50. **Skinner J. S.**, von Zitzewitz J., Szucs P., Marquez-Cedillo L., Filichkin T., Amundsen K., Stockinger E.J., Thomashow M.F., Chen T.H., Hayes P.M. Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in barley // *Plant Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 59. – P. 533–551.
51. **Stockinger E. J.**, Gilmour S. J., Thomashow M. F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94. – P. 1035–1040.
52. **Sun S.**, Yu J.P., Chen F., Zhao T.J., Fang X.H., Li Y.Q., Sui S.F. TINY, a dehydration responsive element (DRE)-binding protein-like transcription factor connecting the DRE and ethylene-responsive element-mediated signaling pathways in *Arabidopsis* // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, № 10. – P. 6261–6271.
53. **Tamura K.**, Yamada T. A perennial ryegrass CBF gene cluster is located in a region predicted by conserved synteny between Poaceae species // *Theor. Appl. Genet.* – 2007. – Vol. 114, № 2. P. 273–283.
54. **Tang H.**, Bowers J. E., Wang X., Ming R., Alam M., Paterson A.H. Synteny and collinearity in plant genomes // *Science.* – 2008. – Vol. 320. – P. 486–488.
55. **Thomashow M. F.** Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 50. – P. 571–599.
56. **Thompson J. D.**, Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22. – P. 4673–4680.
57. **Tian X.-H.**, Li X.-P., Zhou H.-L., Zhang J.-S., Gong Zh.-Zh., Chen Sh.-Y. OsDREB4 genes in rice encode AP2-containing proteins that bind specifically to the dehydration-responsive element // *J. Integr. Plant Biol.* – 2005. – Vol. 47, № 4. – P. 467–476.
58. **Todorovska E. G.**, Kolev S., Christov N. K., Balint A., Kocsy G., Vágújfalvi A., Galiba G. The expression of CBF genes at Fr-2 locus is associated with the level of frost tolerance in Bulgarian winter wheat cultivars // *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* – 2014. – Vol. 28, № 3. – P. 392–401.
59. **Tondelli A.**, Francia E., Barabaschi D., Pasquariello M., Pecchioni N. Inside the CBF locus in Poaceae // *Plant Sci.* – 2011. – Vol. 180. – P. 39–45.
60. **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. – Vol. 41. – P. 195–211.
61. **Wang Q.**, Guan Y., Wu Y., Chen H., Chen F., Chu C. Over-expression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice // *Plant Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 67. – P. 589–602.
62. **Wang Q. J.**, Xu K.Y., Tong Z. G., Wang S. H., Gao Z. H., Zhang J. Y., Zong Ch.-W., Qiao Y.-Sh., Zhang Zh. Characterization of a new dehydration responsive element binding factor in central arctic cowberry // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2010. – Vol. 101. – P. 211–219.
63. **Wei G.**, Pan Y., Lei J., Zhu Y.-X. Molecular cloning, phylogenetic analysis, expressional profiling and *in vitro* studies of TINY2 from *Arabidopsis thaliana* // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2005. – Vol. 38. – P. 440–446.
64. **Xiao H.**, Tattersall E. A., Siddiqua M. K., Cramer G. R., Nassuth A. CBF4 is a unique member of the CBF transcription factor family of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia* // *Plant Cell Environ.* – 2008. – Vol. 31. – P. 1–10.
65. **Xiao H.**, Siddiqua M., Braybrook S., Nassuth A. Three grape CBF/DREB1 genes respond to low temperature, drought and abscisic acid // *Plant Cell Environ.* – 2006. – Vol. 29, № 7. – P. 1410–1421.
66. **Xue G.-P.** Characterization of the DNA-binding profile of barley HvCBF1 using an enzymatic method for rapid, quantitative and high-throughput analysis of the DNA binding activity // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30, № 15. – P. 77.
67. **Xue G.-P.** The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation of low temperature responsive genes in barley is modulated by temperature // *Plant J.* – 2003. – Vol. 33, № 2. – P. 373–383.
68. **Yamaguchi-Shinozaki K.**, Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2006. – Vol. 57. – P. 781–803.
69. **Yang W.**, Liu X. D., Chi X. J., Wu C.A., Li Y.Z., Song L.L., Liu X.M., Wang Y.F., Wang F.W., Zhang C., Liu Y., Zong J.M., Li H.Y. Dwarf apple MbDREB1 enhances plant tolerance to low temperature, drought, and salt stress via both ABA-dependent and ABA-independent pathways // *Planta.* – 2011. – Vol. 233. – P. 219–229.
70. **Zhang X.**, Fowler S. G., Cheng H., Lou Y., Rhee S.Y., Stockinger E.J., Thomashow M.F. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis* // *Plant J.* – 2004. – Vol. 39. – P. 905–919.
71. **Zhao C.**, Zhang Z., Xie S., Si T., Li Y., Zhu J.-K. Mutational evidence for the critical role of CBF genes in cold acclimation in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2016. – Vol. 171. – P. 2744–2759.