



VYTAUTO DIDŽIOJO UNIVERSITETAS

GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS

BIOLOGIJOS KATEDRA

Lina Šnipaitienė

**ERŠKĖTINIŲ (*ROSACEAE*) ŠEIMOS AUGALŲ UŽSIGRŪDINIMO IR
ATSPARUMO ŠALČIUI TYRIMAI *in vitro***

Magistro baigiamasis darbas

Molekulinės biologijos ir biotechnologijų studijų programa, valstybinis kodas 621C71001
Molekulinės biologijos, biofizikos ir biochemijos studijų kryptis

Vadovas: dr. Rytis Rugienius

(Parašas)

(Data)

Apginta: GMF dekanas habil.dr. A.Paulauskas

(Parašas)

(Data)

Kaunas, 2015

TURINYS

SANTRAUKA.....	3
ABSTRACT.....	4
SUTRUMPINIMAI.....	5
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	9
1.1. Šalčio sukeltas stresas augalams.....	9
1.2. Dehidrinai.....	10
1.3. Dehidrinų genų įvairovė.....	12
1.4. Dehidrinų indukcija – atsakas į abiotinį stresą.....	13
1.5. Erškėtinių šeimos augalų dehidrinai.....	14
1.6. Erškėtinių šeimos augalų atsparumo šalčiui tyrimai Lietuvoje.....	15
2. TYRIMO OBJEKTAS, SĄLYGOS, METODAI.....	17
2.1. Tyrimo objektas.....	17
2.2. Terpių paruošimas.....	19
2.3. Mikroūglių sodinimas, auginimas.....	20
2.4. Mikroūglių grūdinimas, šaldymas.....	22
2.5. Šaldymo pažeidimo vertinimas.....	22
2.6. Pavyzdžių homogenizavimas.....	23
2.7. Baltymų frakcijos išskyrimas.....	24
2.8. Elektroforezė.....	25

2.9. Baltymų perkėlimas ir ryškinimas.....	28
3. REZULTATAI.....	30
3.1. Šaldymo pažeidimo vertinimas.....	30
3.2. Dehidrinų vertinimas.....	33
4. APIBENDRINIMAS.....	36
IŠVADOS.....	38
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	39

SANTRAUKA

Darbo autorius: Lina Šnipaitienė;

Darbo pavadinimas: Erškėtinių šeimos augalų užsigrūdinimo ir atsparumo šalčiui tyrimai *in vitro*;

Darbo vadovas: dr. R. Rugienius;

Darbas atliktas: Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Sodininkystės ir daržininkystės institute;

Puslapių skaičius: 44;

Lentelių skaičius: 8;

Paveikslų skaičius: 4.

Atsparumo šalčiui dehidrinai išsamiau tirti modeliniuose augaluose, dehidrinų genai identifikuoti daugelyje žolinių ir sumedėjusių augalų, tačiau apie erškėtinių (*Rosaceae*) šeimos augalų, kurie sudaro svarbiausią sodo augalų dalį, užsigrūdinimo ir atsparumo šalčiui ypatumus, dehidrinų sudėtį ir jų įtaką atsparumui šalčiui žinoma nepakankamai. Todėl Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centre, Sodininkystės ir daržininkystės institute atlikti erškėtinių šeimos augalų dehidrinų tyrimai: tirtas daržo braškės (*Fragaria ananassa*), žemuogės (*F. vesca*), paprastosios vyšnios (*Prunus cerasus*), trešnės (*P. avium*), naminės obels (*Malus domestica*), paprastosios kriaušės (*Pyrus communis*) veislių genotipų užsigrūdinimo efektyvumas, šaldant augalus kontroliuojamomis sąlygomis *in vitro*, nustatyta jonų išeiga iš ląstelių, apskaičiuota audinių pažeidimo kritinė temperatūra. Nustatyta, kad maksimalus užsigrūdinimas pasiekiamas po 4 savaičių, o grūdintų mikroūglių absoliuti kritinės temperatūros reikšmė, palyginus su negrūdintais mikroūgliais, padidėjo vidutiniškai 1,2°C. Atlikus baltymų elektroforezę ir jų imunocheminę analizę, nustatyta kad tiriamoms veislėms būdinga nuo dviejų iki penkių skirtingos molekulinės masės dehidrinų tipo baltymų raiška ir žymus jų kiekio padidėjimas, lyginant su negrūdintais mikroūgliais.

ABSTRACT

Author of term paper: Lina Šnipaitienė;

Full title of term paper: Investigations of Resistance to Cold and Hardening *in vitro* of *Rosaceae* Family plants;

Term paper advisors: R. Rugienius;

The study performed in: The Institute of Horticulture of the Lithuanian Research Center for Agriculture and Forestry;

Number of pages: 44;

Number of tables: 8;

Number of pictures: 4.

Dehydrin-like proteins, which are responsible for resistance to cold, were investigated in model plants, the genes of dehydrins were identified in many herbaceous and woody plants, however we know very little about the hardening and the specificity of the resistance to cold of the most part of the garden plants - the *Rosaceae* family plants. Therefore, the study of dehydrins of the *Rosaceae* family plants was performed in The Institute of Horticulture of the Lithuanian Research Center for Agriculture and Forestry. The efficacy of the hardening of strawberry (*Fragaria ananassa*), wild strawberry (*F. vesca*), cherry (*Prunus cerasus*), sweet cherry (*P. avium*), apple (*Malus domestica*) and pear (*Pyrus communis*) cultivars was investigated under controlled cooling conditions *in vitro*, the ion yield of cells was measured and critical temperature of the tissue damage was calculated. It was found that the maximum hardening is reached in 4 weeks and the critical temperature of the hardened microshoots has increased approximately 1,2°C, compared to non-hardened microshoots. Protein electrophoresis and immunochemical analysis showed that the expression of the two to five dehydrin-like proteins of the different molecular mass is characteristic to investigated cultivars and the significant increase of the amount of dehydrins in hardened microshoots.

SUTRUMPINIMAI

APS – amonio persulfatas;

BME – betamerkapto etanolis;

DNR – deoksiribonukleorūgštis;

HCl – druskos rūgštis;

KCl – kalio chloridas;

kDa – kilodaltonas.

KT 50 – kritinė temperatūra, kurioje jonų išlaisvinimas atitinka 50 proc. augalų žuvimą;

LAMMC SDI – Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Sodininkystės ir daržininkystės institutas;

NDS – natrio dodecilsulfatas;

PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridas;

PVPP – polivinilpolipirolidonas;

RNR – ribonukleino rūgštis;

SDS – sodos dodecilsulfatas;

TBS – tris buferis (tris-buffered saline);

TEMED – tetrametiletilendiaminas;

Tris – tris(hidroksimetil)amino metanas;

IVADAS

Erškėtinių šeimos (*Rosaceae*) augalai yra labai svarbūs mitybai ir ekonominiu požiūriu užima trečią vietą tarp visų maistui auginamų augalų. Pavyzdžiui, obelis yra plačiausiai pasaulyje auginamas sėklavaisis augalas (Augalų biotechnologijos centras, 2013). Erškėtinių šeimos vaisiai turi didelės reikšmės žmonių sveikatai, yra įvairių rūšių, formų, skonių, vartojami daugeliu formų: švieži, džiovinti, perdirbti, iš jų spaudžiamos sultys, gaminamas vynas, sidras, uogienės. Juose yra daug svarbių medžiagų, tokių kaip askorbo rūgštis, flavonoidai, fitoestrogenai, pektinai ir kiti fenoliai bei antioksidantai, kurie svarbūs kovojant su ligomis ir sveikatos stiprinimui. Kai kurie atlikti tyrimai įrodo, kad erškėtinių šeimos vaisių ar lapų ekstraktai slopina vėžį arba turi stiprų antioksidantinį poveikį. Pavyzdžiui, elaginė rūgštis, randama braškėse ir kitose erškėtinių šeimos uogose, veikia ląstelių apoptozę ir proliferaciją, todėl manoma, kad turi priešvėžinį poveikį. Kai kuriose braškių veislėse nustatoma didžiausia askorbo rūgšties koncentracija iš visų vaisių (Shulaev ir kt., 2008), jose daug geležies ir folinės rūgšties, kurios svarbios mažakraujystės prevencijai (Augalų biotechnologijos centras, 2013).

Dėl daugelio naudingų erškėtinių augalų savybių, paskutiniaisiais dešimtmečiais pradėti šių augalų genetiniai tyrimai ir kuriamos naujos biotechnologinės kryptys. Pastaraisiais metais atsirado daug naujų galimybių augalų genomikoje, nustatinėjami nauji genai ir atliekamos įvairios manipuliacijos. Tačiau vis dar mažai tyrimų atlikta, charakterizuojant dehidrinų genus. Dehidrinai yra augalams būdingi termostabilūs baltymai, kurie sintetinami žemoje temperatūroje ir augalo audiniuose mažina ledo kristalų susiformavimo temperatūrą, taip padidindami augalo atsparumą šalčiui (Lukoševičiūtė, 2013). Yra nustatyta, kad dehidrinus koduojantys genai reaguoja į stresą (šaltį ar sausrą, didelę druskų koncentraciją), bet kol kas atlikti tik pavieniai tyrimai ir nėra nustatytos atskirų dehidrinų funkcijos augaluose (Ali-Benali, Alaray, Joudrier, Gautier, 2005).

Identifikuoti dehidrinus koduojančius genus svarbu tam, kad būtų padidintas atsparumas šalčiui ir ištvermingumas žiemą bei sukurti nauji metodai šių augalų ilgalaikiam saugojimui žemoje temperatūroje. Augalų sugebėjimą išgyventi temperatūros svyravimus ir šaltį lemia augalų užsigrūdinimas. Esant žemai teigiamai temperatūrai ir trumpam fotoperiodui, aktyvuojama dehidrinus koduojančių genų raiška, augaluose pradeda kauptis dehidrinai, kurie apsaugo augalų ląstelių membranas nuo pažeidimo (Lukoševičiūtė, 2013). Augalų iššalimas šiaurinėse platumose, taip pat ir Lietuvoje, yra viena pagrindinių žemės ūkio problemų. Nepakankamas kultūrinių augalų atsparumas

šalčiui mažina derlingumą, derliaus pastovumą, žemės ūkio konkurencingumą ir valstybei sudaro papildomas išlaidas žalai kompensuoti. Dažnai dėl nepakankamo adaptyvumo nukenčia erškėtinių šeimos augalai: braškės, žemuogės, vyšnios, trešnės, obelys, kriaušės. Tačiau erškėtinių šeimos augalų dehidrinai dar labai mažai tirti, sukaupti duomenys tik apie pavienius dehidrinus ar atskiras rūšis (Rugienius, 2013). Nauji duomenys, gauti tiriant erškėtinių šeimos augalų grūdinimosi eigą, termostabilių baltymų raišką, leis vykdyti atsparių šalčiui augalų atranką, kurti naujas veisles bei tobulesnes augalų saugojimo žemoje temperūroje technologijas (Lukoševičiūtė, 2013). Dažniausiai naudojami ilgalaikiai mikroūglių *in vitro* saugojimo metodai yra kriosaugojimas ir laikymas žemos temperatūros sąlygomis, kai slopinamas augimas. Sėkmingam šių metodų sukūrimui reikia žinių apie augalų prisitaikymo galimybes ir toleranciją žemai temperatūrai (Baniulis ir kt., 2012).

Darbo tikslas – ištirti erškėtinių šeimos augalų (braškės, žemuogės, vyšnios, trešnės, obels, kriaušės) užsigrūdinimo efektyvumą, šaldant augalus kontroliuojamomis sąlygomis *in vitro*, charakterizuoti dehidrinų šeimos baltymus ir jų raiškos dėsninumus užsigrūdinimo metu.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti kritinės temperatūros pokytį po erškėtinių šeimos augalų (braškės, žemuogės, vyšnios, trešnės, obels, kriaušės) grūdinimo *in vitro*.
2. Nustatyti erškėtinių šeimos augalų grūdinimo trukmę, kuri būtų pakankama ženkliai padidinti jų atsparumą šalčiui, lyginant su negrūdiniais augalais.
3. Ištirti modelinių erškėtinių (*Rosaceae*) šeimos augalų dehidrinų šeimos baltymų raiškos dėsninumus užsigrūdinimo metu.
4. Nustatyti, kokios veislės sukaupia daugiausiai dehidrinų, o kokios veislės – mažiausiai.
5. Palyginti nustatytą grūdintų mikroūglių dehidrinų raišką su augalų ištvėringumu žiemai lauko sąlygomis.

Tyrimų metodai ir planas:

1. Erškėtinių šeimos augalų (braškės, žemuogės, vyšnios, trešnės, obels, kriaušės) mikroūglių auginimas ir dauginimas.
2. Mikroūglių grūdinimas 4°C temperatūroje šviesoje.
3. Mikroūglių šaldymas įvairiose neigiamose temperatūrose.
4. Mikroūglių pažeidimo šalčiu būklės įvertinimas - vertinamas jonų išsilavinimas iš pažeistų audinių konduktometriniu metodu. Pagal kritinį jonų išlaisvinimą, atitinkantį 50 procentų augalų žuvimą, paskaičiuojama kritinė temperatūra (KT50).

5. Baltymų frakcijos išskyrimas fenolio ekstrakcijos metodu.
6. Baltymų elektroforezė.
7. Dehidrinų identifikavimas imunocheminiu metodu.

Tyrimų naujumas ir aktualumas. Svarbiausių sodo augalų, priklausančių erškėtinių šeimai, užsigrūdinimo ir atsparumo šalčiui mechanizmai nepakankamai ištirti. Šiuo metu dar mažai atlikta erškėtinių šeimos augalų dehidrinų tyrimų, paskelbti tik pavieniai duomenys, todėl reikalingi nauji tyrimai, siekiant charakterizuoti erškėtinių šeimos augalų dehidrinus ir nustatyti jų vaidmenį užsigrūdinime. Pirmą kartą tiriant skirtingus genotipus, nustatyti dehidrinų raiškos panašumai ir skirtumai erškėtinių šeimos augaluose, leis identifikuoti svarbiausius dehidrinus ir juos koduojančius genus bei sukurti naujus molekulinis žymeklius. Naujai identifikuoti dehidrinų genai bus svarbūs augalų selekcijai, kuriant šalčiui atsparias veisles, bei tobulinant augalų genetinių išteklių saugojimo žemoje temperatūroje metodus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Šalčio sukeltas stresas augalams

Šalčio sukelta dehidratacija atsiranda todėl, kad sumažėja vandens paėmimas šaknimis, bet nepakinta transpiracija per lapus. Taip pat dėl šalčio susiformuoja ledo kristalai ląstelėse, dėl ko sumažėja skystojo vandens ląstelėse. Žema teigiama temperatūra nuo 0 iki 12 ar 15°C gali sukelti didelį tropinės ar subtropinės kilmės augalų pažeidimą, pvz., *Cucumis sativus*, *Zea mays* ir kt. Tačiau šalčiui atspariuose augaluose (*Secale cereale*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*) šios temperatūros sukelia svarbius biocheminius ir fiziologinius pokyčius, todėl augalai gali ištvirti neigiamas temperatūras (Kosova, Vitamvas, Prašil, 2007). Pavyzdžiui, šalčiui neatsparūs ryžiai žūsta, esant -5°C, tačiau juos palaikius žemoje teigiamoje temperatūroje tam tikrą laiką, jie gali išgyventi ir esant -30°C (Thomashow, 1999). Gamtoje prieš prasidedant šalčiams, oro temperatūra pamažu vėsta ir taip šalčiui atsparių augalų ląstelių citoplazmoje ir membranose įvyksta pokyčiai. Citoplazmoje pradeda kauptis mažos molekulinės masės, labai tirpūs dariniai tokie, kaip monosacharidai, oligosacharidai (sukrozė, rafinozė ir kt.), alkoholiai (sorbitolis, manitolis, pinitolis), poliaminai (sperminai, spermidinai, putrescinai) ir kt. Dėl jų kaupimosi ląstelėje sumažėja vietos vandeniui ir taip ląstelė apsaugo nuo intraląstelinių ledo kristalų formavimosi, tuo pačiu sumažėja ir citoplazmos pradinė šaldanti temperatūra (Sakai, 2009). Šaltis pirmiausiai pažeidžia membranas, ypač plazmalemą, todėl iš ląstelės pasišalina tirpūs citozolio elementai ir ląstelė žūsta. Esant šalčiui, įvyksta biocheminiai pokyčiai membranose: sumažėja sterolių ir padaugėja fosfolipidų su nesočiosiomis riebalų rūgštimis, todėl padidėja membranos pralaidumas, kad galėtų judėti transmembraniniai kompleksai. Tada ledo kristalai susiformuoja ekstraceliuliniuose tarpuose, todėl ląstelės aplinkoje sumažėja vandens, o tai gali skatinti vandens pasišalinimą iš citoplazmos, bet sumažėjęs citoplazmos vandens kiekis apsaugo nuo per didelio vandens netekimo (Thomashow, 1999; Kosova ir kt., 2007).

Prisitaikdami prie šalčio augalai pradeda kaupti dar ir tirpius baltymus ląstelių citoplazmoje. Vieni tokių baltymų yra dehidrinai, kurie dėl savo unikalios struktūros, leidžiančios jiems prisijungti didelius kiekius vandens, apsaugo ir citoplazmą, ir membranas nuo per didelio vandens netekimo (Ingram, Bartels, 1996).

Aprašyti dar du veiksniai, lemiantys augalų prisitaikymą prie šalčio: egzogeninės abscizinės rūgšties didelių nefiziologinių koncentracijų (10^{-4} ir 10^{-5} M) panaudojimas ir kontroliuotas augalo audinio džiovinimas. Žinoma, kad augalo audinio džiovinimas padidina ir endogeninės abscizinės

rūgšties kiekį, todėl manoma, kad abu šie keliai persipynę (Sakai, 2009; Kosova ir kt., 2007). Palaikant atsparumą šalčiui žiemą, svarbūs keli genetiniai mechanizmai: trumpo fotoperiodo aktyvuojami genai ir grūdinėse kultūrose nustatyti jarovizacijos genai (Kosova ir kt., 2007).

1.2. Dehidrinai

Dehidrinai yra atskira vėlyvosios embriogenezės gausių baltymų grupė (LEA – angl. „late embryogenesis abundant“), kuriai būdinga lizino amino rūgštimi turtingas K segmentas. Anksčiau dehidrinai būdavo apibrėžiami funkciškai – jais būdavo laikomi dehidratacijos indukuoti baltymai. Šiuo metu dehidrinais laikomi visi baltymai, kurie turi bent vieną lizino amino rūgštimi turtingą seką – K segmentą (Close, 1996; Kosova ir kt., 2007; Hanin ir kt., 2011). Jie yra įvairios molekulinės masės: nuo 9 iki 200kD (Hanin ir kt., 2011). Šie baltymai yra labai hidrofiliniai ir termostabilūs, juose daug glicino ir polinių amino rūgščių. Manoma, kad jie ląstelėse veikia kaip pagalbinės struktūros – apsaugo baltymus ir membranas nuo nepageidaujamų struktūrinių pokyčių, kuriuos sukelia dehidratacija (Kosova ir kt., 2007). Ląstelių dehidrataciją sukelia žema oro temperatūra, šaltis, karštis, sausra, druskingumas ir padidėjęs vandens išgarinimas (Wisniewski, Arora, 2000; Wahid, Close, 2007). Dehidrinų ekspresiją sukelia ir padidėjęs abscizinės rūgšties ląstelėje kiekis. K segmentas sudaro A2 klasės α spiralę t.y. hidrofobinių amino rūgščių likučiai lokalizuoti vienoje spiralės pusėje, o polinių amino rūgščių likučiai – kitoje pusėje (Close, 1996). Per šią hidrofobinę K segmento dalį dehidrinai sąveikauja su endomenbraninėmis sistemomis ar dalinai despiralizuotais baltymais ir taip apsaugo juos nuo dehidratacijos sukeltų pokyčių. Israelachvili ir Wennerstrom (1996) parodė, kad, esant pakankamai hidratacijai, dehidrinai ir membranų fosfolipidai yra apsupti griežta tvarka išsidėčiusių vandens molekulių, todėl negali sąveikauti tarpusavyje. Prasidėjus dehidratacijai, vandens apvalkalo nebelieka ir šios molekulės pradeda sąveikauti (Kosova ir kt., 2007).

Be K segmento, kuris dehidrinų molekulėje pasikartoja nuo 1 iki 11 kartų, dehidrinuose aptinkami dar du segmentai – tirozinu turtingas Y segmentas (Hanin ir kt., 2011) bei S segmentas, kurį sudaro pasikartojantys serino likučiai. Fosforilizuotas S segmentas gali veikti kaip branduolio lokalizacijos signalas, dėl ko branduolyje pradeda kauptis dehidrinai (Close, 1996). Be šių segmentų, dehidrinus dar sudaro ir mažiau konservatyvūs regionai – ϕ segmentai, kuriuose dažnai gausu glicino ir polinių amino rūgščių. Ingram ir Bartels (1996) išklėlė hipotezę, kad ϕ segmentai turi atsitiktinės vijos struktūrą, per kurią gausiai jungiasi prie vandens molekulių (maksimalūs intermolekuliniai vandeniliniai ryšiai) ir labai mažai jungiasi su skirtingomis amino rūgščių liekanomis (minimalūs intramolekuliniai vandeniliniai ryšiai) (Hanin ir kt., 2011). Taigi dėl šių regionų ir išryškėja

pagrindinės dehidrinų savybės: 1) didelis hidrofiliškumas; 2) termostabilumas vandeniniuose tirpaluose; 3) didelis afinitetas detergentams. Hara, Terashima, Fukaya, Kuboi (2003) įrodė, kad, esant detergentui, pvz., sodos dodesilo sulfatui (SDS), K segmentai įgyja α spiralinę struktūrą, todėl galima iškelti hipotezę, kad dehidrinai keičia savo biocheminę struktūrą nepriklausomai nuo to, ar jie kontaktuoja su membraninėmis struktūromis, ar ne (Kosova ir kt., 2007). Dėl daugelio dehidrinus sudarančių hidrofiliinių amino rūgščių, šie baltymai gali keisti savo struktūrą, priklausomai nuo juos supančios mikroaplinkos: į dehidrinų vandeninį tirpalą pridėjus detergentų (SDS), druskos (NaCl), kitų ištirpdytų medžiagų (glicerolio), dehidrinai keičia savo konformaciją (Hanin ir kt., 2011). Pasikeitus konformacijai, pakinta ir jų funkcijos. Šis fenomenas vadinamas „mėnulio šviesa“ (Hanin ir kt., 2011). Ingram ir Bartels (1996) parodė, kad dehidrinui esant α spiralinėje struktūroje, keli K segmentai sudaro ryšius, taip padidindami baltymo – baltymo arba baltymo – biomembranos sąveiką. Dehidrinams prisijungus prie dalinai dehidratuoto kitų baltymų paviršiaus, dehidrinai įgauna amfipatinę α spiralinę struktūrą ir apsaugo kitus baltymus nuo tolesnio vandens apvalkalo netekimo. Būdami nespiralinėje struktūroje, dehidrinai gali daugiau prisijungti vandens ir taip išlaikyti pastovų ląstelės dydį ir apsaugoti ją nuo kolapso (Hanin ir kt., 2011). Taigi dehidrinus pagal jų atliekamas funkcijas galima suskirstyti į grupes: surišantys vandenį dehidrinai, jonus izoliuojantys dehidrinai, stabilizuojantys DNR dehidrinai, stabilizuojantys RNR dehidrinai, stabilizuojantys baltymus dehidrinai, stabilizuojantys membranas dehidrinai (Lukoševičiūtė, 2013).

Atsižvelgiant į K, S, Y segmentų buvimą ir jų skaičių, dehidrinus galima suskirstyti į kelias skirtingas biochemines subgrupes: Y_nSK_2 dehidrinai, K_n dehidrinai, K_nS dehidrinai, SK_n dehidrinai, Y_2K_n dehidrinai (Close, 1996; Kosova ir kt., 2007; Hanin ir kt., 2011).

1.3. Dehidrinų genų įvairovė

Šiuo metu dehidrinų genai identifikuoti daugelyje rūšių. Nustatyti šie vairo (Arabidopsis thaliana) dehidrinų genai: COR47 ir LTI30 yra dažniausiai aptinkami dehidrinai indų audinyje, ERD14 ir LTI29 šaknų galiukuose (Kosova ir kt., 2007). Rouse, Marotta, Parish (1996) išanalizavo LTI30 promotoriaus β -gliukoronidazės reporterinio geno veiklą ir nustatė, kad jo ekspresiją sukėlė abscizinė rūgštis, mechaninis augalo žalojimas, šaltis ir dehidratacija. Alsheikh, Heyen, Randal (2003) nustatė, kad vykstant dehidrinu ERD14 kelių serino liekanų fosforilizacijai, kurią katalizuoja šaltis reguliuojamos kinazės, šis dehidrinas įgauna kalcį surišantį aktyvumą. Alsheikh, Swenson, Randal (2005) taip pat nustatė, kad *in vitro* fosforilizuoti COR47 ir ERD10 taip pat gali prisijungti kalcio jonus. Jau seniai žinoma, kad ląstelių atsake į įvairius aplinkos dirgiklius, įskaitant ir šaltį, dalyvauja

kalcio jonai, todėl manoma, kad kalcij surišantis aktyvumas yra specifinė *A.thaliana* dehidrinų savybė (Kosova ir kt., 2007).

Dehidrinų genai identifikuoti ir kituose žoliniuose augaluose. *Brassica napus* ir *B.juncea* dehidrinų genus BnDHN1 ir BjDHN1 nustatė Yao, Lockhart, Kalanack (2005), padaugindami kDNR sekas. Šie genai buvo ekspresuojami tik dygstančiose sėklose ir padidino sėklų atsparumą šalčiui. Deng ir kt. (2005) identifikavo kitą *B.napus* dehidrino geną, kurį indukavo absizinė rūgštis ir šaltis. Kirch, Van Berkel, Glaczinski, Salamini, Gebhardt (1997) nustatė *Solanum tuberosum* dehidrino geną *ci7*. Jo ekspresiją sukėlė šaltis (4°C), sausra didelis druskingumas ir egzogeninė absizinė rūgštis. Tačiau dehidrinai aptikti tik gumbuose, jų nebuvo lapuose, sukėlus tokias pačias sąlygas. Taip pat *S.tuberosum* ir *S.sogaranadinum* aptikti DHN24 ir DHN10 dehidrinai (Rorat ir kt. 2006). Nustatyta, kad DHN24 dehidrinai kaupiasi gumbuose transportiniuose organuose ir apikalinėse dalyse, o DHN10 kaupiasi subrendusiuose lapuose. Tai rodo, kad šių abiejų dehidrinų genų ekspresija reguliuojama organui specifinių ir streso faktorių. Neven ir kt. (1993) atrado *Spinacea oleracea* šalčio indukuojamą dehidriną CAP85, Monroy ir kt. (1993) charakterizavo *Medicago sativa* dehidriną CAS15, Wolfraim, Langis, Tyson, Dhindsa (1993) identifikavo *Medicago falkata* dehidriną CAS18. Dehidrinų genai nustatyti ir kai kuriose tropinėse augalų rūšyse, pvz., labai šalčiui jautrioje *Vigna unguiculata* aprašytas DHN1 genas, o jo ekspresuojami dehidrinai aptikti jaunosiose sėklose pagerino šių sėklų dygimą, nes dirvožemio temperatūrai esant žemiau 20°C, labai sumažėja sėklų daigumas (Ismail, Hall, Close, 1999).

Dehidrinų genai identifikuoti ir daugelyje sumedėjusių augalų: *Vaccinium corymbosum*×*Vaccinium darrowi* aprašyti du dehidrinų genai *bbdhn1*, *bbdhn7* (Levi ir kt., 1999; Dhanaraj, Slovin, Rowland, 2005), *Prunus persica* identifikuotas dehidrinas PCA60, koduojamas *Ppdhn1* geno (Wisniewski, Arora, 2000) bei kitas dehidrinų genas *Ppdhn3* (Bassett ir kt., 2006), *Poncirus trifoliata* aptikti COR11 ir COR19 dehidrinai (Cai, Moore, Guy, 1995), *Cirus paradisi* aprašytas dehidrinas COR15 (Porat, Pavoncello, Lurie, McCollum 2002), *Citrus unshiu* rasti CuCOR19 ir CuCOR15 dehidrinai (Hara, Fujinaga, Kuboi, 2005). CuCOR15 dehidrinas dar turi ir jonus sujungiantį aktyvumą, todėl manoma, kad dehidrinai gali tiesiogiai sumažinti lipidų peroksidaciją ir baltymų oksidaciją, esant šalčiui ar kitiems stresams. *Pistacia vera* nustatytas PV-DHN dehidrinas ir jį koduojantis genas PV-*dhn* (Yakubov ir kt. 2005), *Betula pendula* identifikuotas *bphti36* genas (Puhakainen ir kt. 2004). Įrodyta, kad šio geno ekspresija, esant žemai temperatūrai ir kartu trumpam fotoperiodui, buvo didesnė, nei veikiant atskirai tik žema temperatūra, arba tik trumpu

fotoperiodu, todėl *B.pendula* dehidrinu geno ekspresijai natūraliomis sąlygomis svarbūs abu veiksniai (Kosova ir kt, 2007). Welling ir kt. (2004) nustatė dar du dehidrinus beržuose: BpuDHN1 dehidriną kaupėsi pumpuruose rudenį tik prasidedant ramybės metui ir jo genas *BpuDNH1* buvo reguliuojamas žemos temperatūros ir trumpo fotoperiodo, o BpuDHN2 dehidriną kaupėsi šalčiausiais žiemos mėnesiais, o jį koduojantį geną *BpuDHN2* veikė tik žema temperatūra ir beveik neveikė trumpas fotoperiodas.

1.4. Dehidrinų indukcija - atsakas į abiotinį stresą

Kaip ir kiti vėlyvosios embriogenezės baltymai, dehidrinai kaupiasi dideliais kiekiais augalų vėlyvosios vystymosi stadijos embrionuose, vegetaciniuose audiniuose jie retai aptinkami. Nedažnai jų randama ir jaunose augalo dalyse bei tose dalyse, kurioms būdingas greitas ląstelių dalinimasis ir elongacija (šaknų galiukuose, augančiuose stiebuose, lapkočiuose ir kt.) (Rorat, Grygorowich, Irzykowski, Rey, 2004). Tačiau jei augalai patiria įvairų stresą, sukeltą ląstelių dehidrataciją (sausrą, osmosinį stresą, per žemą ar per aukštą temperatūrą, druskingumo pokyčius), dehidrinai pradeda kauptis visuose vegetaciniuose audiniuose (Bray, 1993).

Dehidrinų genų reguliuoja transkripcijos faktoriai CBF1, CBF2 ir CBF3, o šiuos transkripcijos faktorius reguliuoja tarpusavyje sąveikaujantys baltymai ICE1 ir MYB15. Ląstelės pastoviai ekspresuoja baltymą ICE1, o baltymo MYB15 ekspresiją indukuoja šaltis (Gilmour, Artus, Tomashow, 1992). Taip pat reguliavime dalyvauja LOS1 ir LOS2 baltymai (Tomashow, 2010). Daugelyje augalų nustatyti transkripcijos faktoriai CBF ortologai, kuriuos aktyvuoja žema temperatūra ir trumpos dienos fotoperiodas (Lukoševičiūtė, 2013).

Nustatyti du į šaltį reaguojančių genų reguliavimo keliai: 1) nuo abscizo rūgšties priklausomas kelias; 2) nuo abscizo rūgšties nepriklausomas kelias. Pirmam keliui būdinga tai, kad dehidrinų genų raiškos indukcija vyksta tarpininkaujant transkripcijos faktoriams bZIP (dar vadinami ABF arba AREB – į abscizo rūgštį reaguojantys transkripcijos faktoriai), kurie jungiasi prie ABRE elementų, homologiniams vairo CBF4/DREB1D transkripcijos faktoriams, kurie jungiasi prie CRT/DRE/LTRE elementų, bei MYC (mielocitomatozės) ir MYB (mieloblastozės) transkripcijos faktoriams, kurie jungiasi prie MYC ir MYB elementų dehidrinų genų promotoriuje. Nuo abscizo rūgšties nepriklausomam keliui būdingi homologiniai *A.thaliana* DREB2A ir DREB2B transkripcijos faktoriai, kurie jungiasi prie CRT/DRE/LTRE elementų (*angl.* C-repeat/drought responsive/low temperature responsive elements – pasikartojančio C/į sausrą reaguojantys/į žemą temperatūrą reaguojantys elementai) (Hanin ir kt., 2011).

Augalų grūdinimosi metu žema temperatūra sukelia genų raiškos pakitimus, kurie užtikrina augalo atsparumą šalčiui. Tokie šalčio sukeliama streso indukuojami genai vadinami COR (*angl.* cold regulated genes). Thomashow (1999), tirdamas vairėnį, nustatė, kad augalų užsigrūdinimas yra susijęs su padidėjusia COR genų raiška ir šių genų transkripcija tampa intensyvesnė, ilgėjant užsigrūdinimo trukmei. Nustatyta, kad COR genų raiškos intensyvumas priklauso ir nuo augalų rūšies bei veislės, ir susijęs su skirtingu atsparumo šalčiui (Zalunskaitė ir kt., 2008). Identifikuoti augalų atsparumą šalčiui užtikrinantys genai: COR15A, COR47/RD17, COR78/RD29A, KIN, COR6.6/KIN2 (Lukoševičiūtė, 2013). Nustatyta, kad COR15 genas koduoja į chloroplastus transportuojamus baltymus, kurie *in vivo* padidino chloroplastų atsparumą šalčiui ir *in vitro* padidino protoplastų atsparumą šalčiui (Artus ir kt., 1996). COR47 koduojamas 47kDa baltymas padeda ląstelėms ištvirti dehidrataciją ir apsaugo jas nuo pažeidimų, kurie atsiranda dėl vandens netekimo (Dure, 1993).

1.5. Erškėtinių šeimos augalų dehidrinai

Caswell su bendraautorais (1986) tyrė naminės obels (*Malus domestica*) atsparumą šalčiui ir užsigrūdinimą. Nustatyta, kad augalus galima užgrūdinti, esant žemoms teigiamoms temperatūroms ir trumpam fotoperiodui, o į maitinamasias terpes pridėjus didesnius sacharozės kiekius, obelių užsigrūdinimas padidėja. Palonen, Buszard (1997) nustatė, kad negrūdintų braškių (*F. x ananassa*) atsparumas šalčiui *in vitro* neatitinka jų atsparumo lauko sąlygomis, o augimo reguliatoriai terpėje mažina jų atsparumą šalčiui. Ndong, Ouellet, Houde, Sarhan (1997) nustatė tris braškių dehidrinus koduojančius genus: *Fcor1* ir *Fcor2* genus indukuoja žema temperatūra, o *Fcor3* reguliavimas vyksta jo slopinimu. Owens ir kt. (2002) nustatė CBF koduojančius genus vyšniose (*Prunus cerasus*). CBF faktoriai nustatyti trešnėse (*P. avium*) (Kitashiba ir kt., 2004), nykštukinėse obelyse (*M. baccata*) (Yang ir kt., 2010).

Persikuose (*P. persica*) nustatyti du dehidrinai: 60 ir 65kDa molekulinės masės. Wisniewski su kolegomis (2006) nustatė, kad persikuose 60kDa dehidrino koduojančio geno *PpDhn1* raiškai užtenka žemos temperatūros, trumpas fotoperiodas reikšmės neturėjo. Yamame (2006) tokius pačius rezultatus gavo su *P.mume* 65kDa dehidrino genu. Wisniewski, Norelli, Bassett, Artlip, Macarisin (2011) identifikavo *P.persica* CBF1 koduojantį geną *PpCBF1*.

Taigi išanalizavus literatūrą matome, kad yra atlikti tik pavieniai erškėtinių šeimos augalų tyrimai ir reikalingas tolesnis identifikuotų dehidrinų charakterizavimas.

1.6. Erškėtinių šeimos augalų atsparumo šalčiui tyrimai Lietuvoje

Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro filiale, Sodininkystės ir daržininkystės institute (LAMMC SDI) atlikti tyrimai su Europinės kriaušės (*Pyrus communis*) veislių „Oranževoje“, „Hasselpear“, „Princesė Dagmara“, „Karalienė Jadvyga“, „Senryo“, „Muskatelka Seda“, „Koncentrat“, Nr. 0408 mikroūgliais *in vitro*. Nustatyti aštuoni dehidrinų tipo baltymai, kurių molekulinė masė buvo 31, 42, 50, 54, 57, 64, 69 ir 82 kDa. Nors dehidrinų tipo baltymai nustatyti visose pasirinktose veislėse, ekspresijos lygis skyrėsi ir priklausė nuo veislės ir grūdinimo sąlygų. Trumpo fotoperiodo ir kintančios žemos temperatūros kombinacija dehidrinų ekspresiją padidino tik atskirais atvejais, tačiau pastovi žema temperatūra pastoviai indukavo šių baltymų ekspresiją. Citokinino augimo regulatoriaus ar manitolio naudojimas nežymiai sumažino žemos temperatūros poveikį. Nustatytos optimalios kriaušių grūdinimo sąlygos skyrėsi tik viena savaitė (1-2 arba 2-3 savaitės) (Baniulis ir kt., 2012). Parodyta, kad grūdinimas mažina šalčio sukeltus pažeidimus ir padidina mikroūglių išgyvenamumą. Nustatyta, kad kriaušės mikroūglių ilgalaikio saugojimo gilaus užšaldymo sąlygomis tinkamiausi yra inkapsuliacijos-dehidratacijos ir inkapsuliacijos–vitifikacijos metodai, o kriaušės prieš kriosaugojimą reikia auginti terpėje, kurioje būtų sumažintas benzil-amino purino kiekis (Lukoševičiūtė, 2013).

Braškių užsigrūdinimo ir atsparumo šalčiui bei ilgalaikio saugojimo tyrimai LAMMC SDI vykdomi jau nuo 1993m. Rugienius, Stanys (2001) nustatė, kad braškių (*F.ananassa*) atsparumas šalčiui tiesiogiai priklauso nuo grūdinimo trukmės ir sacharozės kiekio maitinamojoje terpėje, o optimali grūdinimo trukmė *in vitro* yra 35 paros. Rugienius, Sasnauskas (2005) tyrė braškių biologines ir ūkines savybes, tarp jų – ir atsparumą šalčiui. Gauti duomenys parodė, kad vidurio Lietuvos klimato sąlygomis atspariausios šalčiui yra „Salwa“, „Aga“ ir „Heros“ braškių veislės, o labiausiai šalčiui neatsparios „Elsanta“ ir „Kama“ veislės. Šių mokslininkų atlikti tyrimai (2006) su naujomis braškių veislėmis, norint patikrinti jų tinkamumą auginti Lietuvos klimato sąlygomis, parodė, kad ištvermingiausios žiemą buvo „Salut“ ir „Roxana“ veislių braškės, o neatspariausios – „Irma“ ir „Alba“ veislių braškės. Lukoševičiūtė, Rugienius, Zalunskaitė, Sasnauskas, Stanys (2007) įrodė, kad braškių užsigrūdinimas, priklausomai nuo veislės, atlydžio metu (gamtoje žiemą paitaikantis trumpalaikis oro temperatūros pakilimas), išlieka nuo dviejų iki keturių parų ir priklauso nuo fitohormonų – abscizo rūgšties ir giberelino, o pakartotinai užsigrūdinti gali per 7-21 parą. Taip pat nustatė, kad šalčiui atsparios braškės optimaliomis sąlygomis atlaiko grūdinimą 6-7 dienas, o neatsparios šalčiui – 3-4 dienas ir kad pakartotas 7 dienų grūdinimas atsparumą šalčiui *in vitro* padidino 50-60 proc. Rugienius

ir kt. (2008) tyrė žemės ūkio augalų atsparumą šalčiui. Tarp jų tiriamų augalų buvo ir erškėtinių šeimos augalas - daržinė braškė (*F.ananassa*). Tirtos „Melody“ ir „Venta“ veislės. Tyrimų metu sumodeliavus atlydį, „Melody“ veislės augalai išlaikė užsigrūdinimo lygį, nepriklausomai nuo to, kokia buvo temperatūra atlydžio metu, o „Venta“ veislės braškės po 22°C atlydžio tapo 32 procentais labiau pažeidžiamos negu po 10°C atlydžio.

Šiame institute tyrimus su daržo braškės (*F.ananassa*) šalčiui atsparios „Melody“ veislės ir neatsparios „Elsanta“ veislės mikroūgliais *in vitro* atliko Lukoševičiūtė (2013). Identifikuota 18 dehidrinų tipo baltymų nuo 9 iki 80kDa molekulinės masės, didžiausią dalį sudarė 14 ir 16kDa molekulinės masės baltymai. Grūdinant braškių mikroūglius keturias savaites, tik 18kDa baltymo kiekis reikšmingai padidėjo. Nustatyta, kad abscizinė rūgštis (100 µM) maitinamojoje terpėje padidina mikroūglių užsigrūdinimą, o giberelo rūgštis (2,9 µM) mažina. Remiantis šiais rezultatais, nustatytos optimalios braškių grūdinimo ir šaldymo sąlygos.

Rugienius ir kt. (2008) tyrė *Prunus* sp. ir nustatė, kad vyšnios *in vitro* atsparesnės šalčiui nei trešnės, o atspariausios veislės buvo „Molodeznaja“ ir „Vytėnų žvaigždė“. Lukoševičiūtė ir kt. (2009) atliko tyrimus su trešnės (*Prunus avium*) veislės „Merchant“ ir paprastosios vyšnios (*P.cerasus*) veislės „Molodeznaja“ mikroūgliais *in vitro*. Nustatyta, kad po keturių savaitių grūdinimo labiausiai padaugėjo trešnės 42 ir 51 kDa baltymų ir paprastosios vyšnios 51kDa baltymo. Nustatyta, kad trešnės 51kDa baltymo kiekis didėjo tolygiai per visas keturias grūdinimo savaites, o 42kDa baltymo kiekis padidėjo tik praėjus keturioms grūdinimo savaitėms.

Kemežienė, Rugienius, Stanys (2009) tyrė sodų augalų genetinius faktorius, lemiančius atsparumą šalčiui. Tarp jų tirtų augalų buvo daržo braškės (*F.ananassa*), paprastosios vyšnios (*P.cerasus*) ir trešnės (*P.avium*) hibridai, naminė obelis (*Malus domestica*). Juose identifikavo COR47 geno homologus (Lukoševičiūtė, 2013). Zalunskaitė ir kt. (2008) tyrė dvi braškių veisles – atsparią šalčiui „Melody“ ir jautrią šalčiui „Holiday“, dvi trešnių veisles – jautrią šalčiui „Kordija“, atsparią šalčiui „Jurgita“, dvi vyšnių veisles – jautrią šalčiui „Erdi Jubileum“, atsparią šalčiui „Molodioznaja“, taip pat vyšnių ir trešnių hibridą M323. Šie tyrimai patvirtino COR47 geno homologų transkripciją tirtuose augaluose, kai grūdinimosi periodas žemoje teigiamoje temperatūroje buvo ne trumpesnis kaip 30 dienų.

2. TYRIMO OBJEKTAS, SĄLYGOS, METODAI

2.1. Tyrimo objektas

Tyrimui naudoti erškėtinių (*Rosaceae*) šeimos augalų: daržo braškės (*Fragaria x ananassa*) veislių „Elsanta“, „Dangė“, „Melody“, „Holiday“, paprastosios žemuogės (*F. Vesca*) linijos „F.V.3“, aukštosios žemuogės *F.moschata*, naminės obels (*Malus domestica*) veislių „Gala“, „Golden delicious“, „Auksis“, „Popierinis“, rojinės obels (krebo) *M. platycarpa*, slyvalapės obels *M. prunifolia*, paprastosios vyšnios (*Prunus cerasus*) veislių „Molodioznaja“, „Orkoliya“, „Vietinė rūgščioji“, trešnės (*P. avium*) veislių „Merchant“, „Jurgita“, Europinės kriaušės (*Pyrus communis*) veislių „Hasselpeare“, „Karalienė Jadvyga“, „Senryo“, miškinės kriaušės *P.pyraster* mikroūgliai. Šių mikroūglių veislių charakteristikos pateiktos 1 lentelėje.

1 lentelė. Veislių charakteristika

Rūšis	Veislė	Tėvinės formos	Sukūrimo metai, kilmės šalis	Ištvermingumas žiemai	Literatūros šaltinis
Daržinė braškė (<i>Fragaria x ananassa</i>)	„Elsanta“	„Gorella“ x „Holiday“	1975, Olandija	Neištverminga žiemai	Rugienius, Sasnauskas, 2005
	„Melody“	SCRI 66 M1 x „Senga Sengana“	1991, Didžioji Britanija	Ištverminga žiemai	Rugienius, 2000
	„Dangė“	„Venta“ x „Redgauntlet“	1997, Lietuva	Ištverminga žiemai	Rugienius ir kt., 2004
	„Holiday“	„Raritan“ x „New York 844“	1965, JAV	Neištverminga žiemai	Jurecky, 1972
Aukštoji žemuogė (<i>F. moschata</i>)	-	-	Azija	Ištverminga žiemai	Staudt, 1999
Paprastoji žemuogė (<i>F. vesca</i> F.V.3)	-	-	Auga Šiaurės Amerikoje, Azijoje, Europoje	Ištverminga žiemai	Staudt, 1999

Europinė kriaušė (<i>Pyrus communis</i>)	„Hasselpearė“	-	Belgija	Vidutiniškai ištverminga žiemai	Būdvytytė, 1997.
	„Karalienė Jadvyga“	-	Rusija	Vidutiniškai ištverminga žiemai	Būdvytytė, 1997.
	„Senryo“	Vietinė Japonijos rūšis	Japonija	Ištverminga žiemai	Būdvytytė, 1997.
Miškinė kriaušė (<i>P. pyraeaster</i>)	-	Senovinė Europos rūšis	~1850, Europa	Ištverminga žiemai	The Plant List, 2015
Naminė obelis (<i>Malus domestica</i>)	„Popierinis“	Liaudies selekcija	Baltijos šalys	Vidutiniškai ištverminga žiemai	Blažytė, 2008
	„Auksis“	„McIntosh“ × „Gravenstein“	1951, Lietuva	Ištverminga žiemai	Būdvytytė, 1997
	„Gala“	„Golden Delicious“ × „Kidd's Orange Red“	1900 – 1949, Naujoji Zelandija	Vidutiniškai ištverminga žiemai	www.orangepippin.com/apples/gala
	„Golden Delicious“	„Grimes Golden“ × „Ambrosia“	1899, JAV	Vidutiniškai ištverminga žiemai	www.orangepippin.com/apples/golden-delicious
Rojinė obelis (<i>M. platycarpa</i>)	-	<i>M. domestica</i> × <i>M. sieversii</i>	1943, JAV		Little, 1979
Slyvalapė obelis (<i>M. prunifolia</i>)	-	Vietinė Kinijos rūšis	1803, Kinija	Ištverminga žiemai	Būdvytytė, 1997.
Paprastoji vyšnia (<i>Prunus cerasus</i>)	„Molodioznaja“	-	Rusija	Ištverminga žiemai	Būdvytytė ir kt, 1997.
	„Orkolija“	-	-	Ištverminga žiemai	Būdvytytė ir kt, 1997.
	„Vietinė rūgščioji“	Liaudies selekcija	Lietuva	Ištverminga žiemai	Blažytė, 2008
Trešnė (<i>P. avium</i>)	„Merchant“	-	1970, Didžioji Britanija	Vidutiniškai ištverminga žiemai	www.orangepippin.com/cherries/merchant
	„Jurgita“	„Hedelfinger“ ×	Lietuva	Ištverminga žiemai	Būdvytytė, 1997

		„Dniprovska”			
--	--	--------------	--	--	--

2.2. Terpių paruošimas

Ruošiamos agarizuotos MS terpės (Murashige, Skoog, 1962), kurių sudėtinės dalys yra šios:

1. Makroelementai: amonio nitratas (NH_4NO_3) 1,650 mg/l, kalcio chloridas ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 440 mg/l, magnio sulfatas ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 370 mg/l, kalio fosfatas (KH_2PO_4) 170 mg/l, kalio nitratas (KNO_3) 1,900 mg/l.

2. Mikroelementai: boro rūgštis (H_3BO_3) 6.2 mg/l, kobalto chloridas ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.025 mg/l, vario sulfatas ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.025 mg/l, geležies sulfatas ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 27.8 mg/l, mangano sulfatas ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 22.3 mg/l, kalio jonidas (KI) 0.83 mg/l, natrio molibdatos ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.25 mg/l, cinko sulfatas ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 8.6 mg/l, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.2 mg/l.

3. Vitaminai ir organinės medžiagos: i-inozitolis 100 mg/l, niacinas 0.5 mg/l, piridoksinas 0.5 mg/l, tiaminas 0.1 mg/l, indol-3-acetino rūgštis (IAA) 1–30 mg/l, kinetinas 0.04–10 mg/l, glicinas 2.0 mg/l, edaminas S 1.0 g/l, agaras 7g/l.

4. Dejonizuotas vanduo.

5. pH reguliuotojai: natrio hidroksidas (NaOH), hidrochlorido rūgštis (HCl).

Reikalinga įranga: 2l talpa tirpalui, svarstyklės, mentelė, magnetinė maišyklė, pH matuoklis, metaliniai indai ir kaitlentė kaitinimui, 130ml talpos indeliai arba mėgintuvėliai (15×1,5 cm) su dangteliais, folija, autoklavas.

Terpės paruošimo eiga:

1. Į 2l talpą įpilama 90% galutinio tūrio dejonizuoto vandens (pvz., jei ruošiam 1l galutinį tūrį, tai įpilama 900 ml dejonizuoto vandens).

2. Maišant sudedamos visos sudedamosios dalys. Maišoma magnetine maišykle.

3. Vitaminai tiksliai sveriami svarstyklėmis, sudedami į mišinį, maišoma.

4. Įpilamas likęs kiekis dejonizuoto vandens iki galutinio tūrio.

5. Tikrinamas pH (pH matuokliu), kuris turi būti 5,8. Jei pH mažesnis, lašinama šarmo (natrio hidroksido NaOH), jei pH didesnis, lašinama rūgšties (hidrochlorido rūgšties HCl). (1 pav.)

6. Perpilama į metalinius indus, kaitinama ant kaitlentės tol, kol mišinys tampa skaidrus.

7. Atvėsinama, supilstoma į 130ml talpos indelius po 50 ml į kiekvieną indelį, indeliai uždengiami folija arba supilama į mėgintuvėlius, uždengiama.

8. Autoklavuojama 30 minučių 120°C temperatūroje, esant 1 atmosferos slėgiui.



1 pav. Matuojamas pH, kol maišoma magnetine maišykle.

2.3. Mikroūglių sodinimas, auginimas

Naudojamos priemonės: kolbutės arba mėgintuvėliai su paruošta terpe, sterilios pirštinės, peiliukas (skalpelis), pincetas, žnyplės, sterilus distiliuotas vanduo, popieriniai rankšluosčiai, talpa mikroūgliams nuplauti, 70 proc. spiritas paviršių sterilizavimui, įrankių sterilizatorius. Dirbama patalpoje su Laminarinės traukos spinta (laminaru).

Darbo eiga:

1. Sterilizatoriumi sterilizuojami įrankiai: pincetas, skalpelis.
2. Su steriliomis pirštinėmis į laminarą susidedame visas reikiamas priemones: mikroūglius su talpa, sterilaus vandens butelius, sterilizuotas žnyples ir skalpelį, sterilius popierinius rankšluosčius, kurie bus naudojami kaip patiesalas mikroūglių pjovimui, mėgintuvėlius arba kolbutes su paruošta terpe. Visų talpų ir mėgintuvėlių paviršius nuvalomas 70 proc. spiritu, prieš įnešant juos į laminarą. Taip pat spiritu nuvalomi visi laminaro paviršiai.
3. Atidaroma talpa su steriliais mikroūgliais, mikroūgliai išimami iš talpos, padedami ant popierinio rankšluosčio pavirčiaus ir skalpeliu dalinami į mažesnes dalis: maždaug 10 mm aukščio, paliekant po 1-2 lapkočius. Pašalinami pažeisti mikroūgliai.
4. Steriliomis žnyplėmis paimami paruošti mikroūgliai ir sodinami į kolbutes arba mėgintuvėlius su paruošta terpe: į mėgintuvėlį po vieną mikroūglį, į stiklines kolbutes po 5 mikroūglius braškėms ir 6-7 mikroūglius obelims, kriaušėms, vyšnioms.
5. Sandariai uždengiami mėgintuvėliai dangteliais, o kolbutės folija.

Mikroūgliai auginami klimato kameroje 6 savaites (žolinių augalų, t.y. braškių) arba 8 savaites (sumedėjusių augalų: obelys, vyšnios, kriaušės) 22°C temperatūroje, naudojant 50-150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intensyvumo apšvietimą fluorescencinėmis lempomis 16/8h dienos/nakties fotoperiodu (2 pav.). Palaikomas 60 proc. santykinis drėgnumas. Po 6 ar 8 savaičių mikroūgliai dauginami: vėl paruošiamos terpės, į jas iš vieno mikroūglio sodinama po 2 mikroūglius (padauginama) ir vėl auginama tomis pačiomis sąlygomis kitiems tyrimo veiksams.



2 pav. Mikroūgliai auga mitybinėse terpėse mėgintuvėliuose ir kolbutėse

2.4. Mikroūglių grūdinimas, šaldymas

Mikroūgliai grūdinami klimato kameroje 4°C temperatūroje šviesoje. Grūdinimo trukmė: 7, 14, 28 ir 56 paros. Kontrolinis variantas – negrūdinta.

Mikroūglių šaldymas vyksta -5 - -14°C temperatūrų intervale. Kiekvienoje temperatūroje šaldoma po 10 kiekvienos veislės pavyzdžių (po 10 mėgintuvėlių). Šaldomi ir grūdinti mikroūgliai, ir negrūdinti mikroūgliai (kontrolinis variantas). Šaldymo kontrolė atliekama su kiekvienos veislės visai nešaldytais mikroūgliais (10 pavydžių) ir su mikroūgliais, šaldytais -20°C temperatūroje (10 pavydžių).

Tyrimė naudojamų mikroūglių šaldymas atliekamas „Percival LT-36VL“ kameroje (gamintojas Percival, JAV). Šaldymo eksperimentuose mikroūgliai šaldomi 2 valandas -2°C temperatūroje, paskui temperatūra mažinama 1°C per valandą greičiu. Žemiausioje temperatūroje mikroūgliai šaldomi 1 valandą.

2.5. Šaldymo pažeidimo vertinimas

Po šaldymo mikroūgliai 12 valandų inkubuojami 10 ml dejonizuoto vandens 4°C temperatūroje. Po 12 valandų matuojamas jonų išlaisvinimas (tirpalo elektrinis laidumas) konduktometriiniu metodu. Naudojamas konduktometras „Cond 720 WTW“ (gamintojas „InoLab Ltd“) (3 pav.). Paskui mikroūgliai autoklavuojami 20 minučių 120°C temperatūroje, 1 atmosferos slėgyje. Po autoklavavimo mėginiai laikomi 2-3 val. kambario temperatūroje ir vėl matuojamas tirpalo elektrinis laidumas.

Jonų išlaisvinimo procentinis santykis normalizuotas nešaldytų ir maksimaliai sušaldytų (6 val. -20°C temperatūroje) pavyzdžių atžvilgiu (Linden, 2002). Santykinis jonų išlaisvinimas temperatūroje T : $SJ_{IT} = JI_T / EL_{autokl} \times 100\%$, kur JI_T – pavyzdžio jonų išlaisvinimas, palaikius temperatūroje T ; EL_{autokl} – pavyzdžio jonų išlaisvinimas po autoklavavimo. Pažeidimo indeksas temperatūroje apskaičiuojamas pagal formulę: $T:IT = (SJ_{IT} - SJ_{kontr}) / (100 - SJ_{kontr}) \times 100\%$, kur SJ_{kontr} – santykinis jonų išlaisvinimas kontroliniuose (nešaldytuose) pavyzdžiuose. Normalizuotas pažeidimas temperatūroje apskaičiuojamas pagal formulę: $T = IT / I_{-20} \times 100\%$, kur I_{-20} – pavyzdžių, šaldytų -20°C temperatūroje, pažeidimo indekso vidurkis.



3pav. Konduktometras „InoLab Cond 720 WTW“.

©www.gzjunkai.com

Siekiant apskaičiuoti jonų išlaisvinimą, atitinkantį 50 proc. mikroūglių žuvimą, po šaldymo vertinamas mikroūglių pažeidimo laipsnis ir išgyvenusių/žuvusių mikroūglių procentas, šaldant skirtingose temperatūrose. Kritiniu jonų išlaisvinimu (KJI), atitinkančiu 50 proc. mikroūglių žuvimą, yra priimta laikyti aritmetinį vidurkį tarp jonų išlaisvinimo šaldant temperatūroje, kurioje visi šaldyti mikroūgliai yra žuvę, ir jonų išlaisvinimo šaldant temperatūroje, kurioje mikroūglių žuvinimas neužfiksuotas (Lukoševičiūtė, 2013). Kritinė temperatūra KT_{50} apskaičiuojama, naudojant tiesinę regresiją ($\bar{y} = a + b\bar{x}$, kur $a = \bar{y} - b\bar{x}$, o $b = \frac{\Sigma(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\Sigma(x-\bar{x})^2}$, kur \bar{x} - žinomas jonų išlaisvinimas procentais, \bar{y} - žinoma temperatūra, o x ir y yra imties vidurkiai. Apskaičiuojami 10 pakartojimų vidurkiai ir standartinė vidurkio nuokrypis bei standartinio nuokrypio paklaida.

Kadangi dehidrinų kaupimasis susijęs su augalų užsigrūdinimu, o maksimaliai užsigrūdinę augalai yra mažiausiai pažeidžiami šalčio, pagal jonų išlaisvinimo rezultatus, gautus po šaldymo *in vitro*, atsirenkamas optimalus grūdinimo laikas, kada dehidrinų, lemiančių atsparumą ir užsigrūdinimą, raiška yra didžiausia.

2.6. Pavyzdžių homogenizavimas

Atsirinkti mikroūgliai (kontroliniai ir grūdinti) užšaldomi -70°C temperatūroje, paskui homogenizuojami apvaliose šulinėlių lėkštutėse. Į kiekvieną šulinėlį dedamas vienodas masės kiekis, įpilama ne mažiau kaip 100 μl lizės buferio, bet ne daugiau kaip 0,5ml. Į kiekvieną šulinėlį įdedama po vieną 5/32“ dydžio metalinę granulę – šratą, šulinėliai užklijuojami siaura juostele ir homogenizuojama homogenizatoriumi MM400 (gamintojas Retsch Ltd, Vokietija) 2 min. $\frac{3}{4}$ greičiu. Kai homogenizacija baigiama, metalinės granulės pašalinamos magnetine mentele, o pavyzdžiai iš šulinėlių paimami pipete.

2.7. Baltymų frakcijos išskyrimas

Baltymų frakcija išskiriama fenolio ekstrakcijos metodu, nes prarandama mažiausiai baltymų. Naudojama Isaacson, Damasceno ir kt. (2006) rekomenduojama baltymų ekstrakcijos iš augalinių audinių metodika.

Naudojami tirpalai:

1. Fenolio buferis: 50g fenolio, 0.05g antioksidanto (8 - hydroxyquinoline), 30 ml H₂O.

Tirpalas šildomas 37 °C vonelėje. pH 7.5 (nematuojame).

2. 100 mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluorido) buferis : 0.179g PMSF, 10 ml izopropanolio.

3. 0.1 M NH₄Ae (amonio laurileris) metanolyje: 0.174g NH₄Ae, 250 metanolio.

4. Fenolio ekstrakcijos buferis: 59.9g sacharozės (galutinė 0.7 M), 1.864g KCl (galutinė 0.1M), 230 ml H₂O, nusiregulavus pH 7.5 (su HCl) H₂O iki 250 ml, 15.1425g Tris (galutinė 0.5 M), 3.6525g EDTA (etilendiamintetraacetinė rūgštis) (galutinė 50 mM).

Fenolių skyrimas:

1. Centrifuga laikoma 4°C temperatūroje, purtyklė padedama į šaldytuvą.

2. Pasiruošiamo ekstrakcijos buferį – prieš naudojimą reikia pridėti PVPP (polivinilpolipirolidono), BME (betamerkapto etanolio), PMSF ir stabilizatoriaus P9599.

1 mėg – 500 μl

10 mėg – 5000 μl + 1000 μl (atsarga) = 6000 μl

Ruošiamas ekstrakcijos buferis: 6000 μl ekstrakcijos buferio + 120 mg PVPP + 120 μl BME + 60 μl PMSF + 60 μl P9599. PMSF į tirpalą dedamas paskutinis. Paruoštas ekstrakcijos buferis laikomas ledo vonelėje.

3. Į kiekvieną mėginį pilame 500 μl ekstrakcijos buferio.

4. Paruošiamas fenolio buferis ir į kiekvieną mėginį pilame po 500 μl fenolio buferio. Buferį imame iš apatinio sluoksnio.

5. Mėginiai pavorteksuojami ir talpinami į purtyklę 4°C temperatūroje, 700 rpm, 30 min.

6. Centrifuguojame 10 min 5500 xg 4°C temperatūroje.

7. Viršutinis fenolinis sluoksnis (~200 – 250 μl) sumaišomas su 500 μl ekstrakcijos buferiu. Į ekstrakcijos buferį prieš naudojimą dedame BME t.y. į 6000 μl buferio – 120 μl BME.

8. Mėginiai vorteksuojami ir vėl inkubuojami purtyklėje +4°C temperatūroje, 700 rpm, 30 min.

9. Centrifuguojame 10 min 5500 xg 4°C temperatūroje.

10. Nusiurbamas viršutinis fenolinis sluoksnis (~100 – 150 µl), pridedama NH₄Ae metanolyje, t.y. 100 – 150 µl fenolio pridedama 750 µl NH₄Ae metanolyje. Nusiurbama švariai, be priemaišų, pasižymimas nusiurbtas tūris: kiek nusiurbėm viršutinio fenolinio sluoksnio, tiek reikės užpilti amonio acetato.

11. Mėginiai laikomi – 20°C temperatūroje.

Mėginiai kitą dieną tirpinami:

- Mėginiai centrifuguojami 5 min 15000 xg 4°C temperatūroje.
- Atsargiai nusiurbiamas supernatantas.
- Ant nuosėdų pilama 1000 µl šalto metanolio.
- Centrifuguojama 5 min 15000 xg 4°C temperatūroje (su metanoliumi plaunama 3 kartus).
- Ant nuosėdų pilame 1000 µl šalto acetono (su acetonu plaunama 1 kartą).
- Mėginiai centrifuguojami 5 min 15000 xg 4°C temperatūroje.
- Nusiurbus supernatantą mėginiai džiovinami kambario temperatūroje, kol išgaruoja acetonas. Saugoma –70°C temperatūroje.

2.8. Elektroforezė

Naudojama vienkryptė elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis gradientiniame poliakrilamido gelyje pagal Laemli (1970). Prieš elektroforezę mėginiai skiedžiami (denatūruojami baltymai). Paruošiamas pavyzdžių buferis pagal schemą, pateiktą 2 lentelėje:

2 lentelė. Elektroforezės buferio paruošimas

	1 ml	2 ml	5 ml	6.5 ml
125 mM Tris-HCl pH	0.1	0.2	0.5	0.65
2 % SDS	0.2	0.4	1	1.3
40 mM DTT (ditiotrei)	0.04	0.08	0.2	0.26
8 M Urea	0.48	0.96	2.4	3.12

Ant pavyzdžių užpilama 300 µl buferio. Kaitinama 30min 50°C temperatūroje. Trumpai pacentrifuguojama. Daromas skiedimas:

1. Į 400 µl vandens įpilti 5 µl pavyzdžio.

2. Iš 1. punkto imti 80 µl ir pridėti 320 µl vandens (1:5).
3. Iš 1. punkto imti 40 µl ir pridėti 360 µl vandens (1:10).

Elektroforezė atliekama su Protean Mini sistema (gamintojas BioRad Ltd), panaudojant minigelius (6×8cm dydžio). Kruopščiai nuplaunami minigelių stikliukai, dezinfekuojami spiritu 4 kartus juos nuvalant ir horizontaliai, ir vertikalčiai. Paruošiamas skiriamasis 5proc. ir 15proc. poliakrilamido gelis (3 lentelė):

3 lentelė. Skiriamąjo poliakrilamido gelio (5 ir 15 proc.) sudėtis

Sudėtinės dalys:	Koncentracija 5 proc.	Koncentracija 15 proc.
30proc. akrilamido/0,8proc. metilenbisakrilamido tirpalas	1,65ml	5ml
H ₂ O	6,25ml	2,9ml
Skiriamasis buferis pH 8,8	2ml	2ml
10proc. SDS (sodos dodecilsulfatas)	100ul	100ul
TEMED (tetrametiletildiaminas)	5ul	5ul
10proc. APS (amonio peroksisulfatas)	50ul	50ul
Tūris	10ml	10ml

Skiriamasis poliakrilamido gelis polimerinamas tarp stiklų elektroforezės aparato gardelėje – naudojama po 4ml skiriamąjo gelio kiekvienam minigeliui. Polimerizacijos reakcija kambario temperatūroje atliekama per 30–60 min. Ant susidariusio skiriamąjo gelio viršaus polimerinamas 5proc. koncentruojamasis poliakrilamido gelis, kurio sudėtis pateikta 4 lentelėje:

4 lentelė. Koncentruojamojo poliakrilamido gelio (5 proc.) sudėtis

Sudėtinės dalys:	Koncentracija 5 proc.
30proc. akrilamido/0,8proc. metilenbisakrilamido tirpalas	0,5ml
H ₂ O	1,7ml
Koncentruojamasis buferis pH 6,8	0,75ml
10proc. SDS	30ul

TEMED	5ul
10proc. APS	25ul
Tūris	3ml

Naudojama po 1,5ml koncentruojamojo poliakrilamido gelio kiekvienam minigeliui. Šiame koncentruojamame gelyje padaromi šulinėliai baltymų pavyzdžiams supilti – įstatomos „šukos“. Nuo stiklų viršaus koncentruojamam geliui paliekams 3cm tarpas. Vėl laukiama kol įvyks polimerizacijos reakcija – kambario temperatūroje ji vyksta per 30-45min. Paruošus skiriamąjį ir koncentruojamąjį gelius, stiklai su geliais įstatomi į elektroforezės aparatą. Į viršutinę ir apatinę aparato talpyklas pripilama elektroforezės buferio. Buferis turi pripildyti koncentruojamajame gelyje esančius šulinėlius (viršutinėje talpykloje) ir skalauti skiriamojo gelio apačią (apatinėje talpykloje). Reikia įsitikinti, ar buferis neišteka iš viršutinės talpyklos.

Elektroforezei naudojamų tirpalų sudėtys ir paruošimas:

1. 30proc. akrilamido/0,8proc. metilenbisakrilamido tirpalas: 29,9g akrilamido, 0,8g metilenbisakrilamido, distiliuoto vandens iki 100ml bendro tūrio. Tirpalas perfiltruojamas pro 0,45μm porų dydžio filtrą ir laikomas tamsoje 4°C temperatūroje.

2. Skiriamasis buferis: 22,78g Trisma druskos, ištirpinta 70ml distiliuoto vandens, sureguliuojamas pH su HCl (turi būti pH 8.8), galutinis tirpalo tūris turi būti 100ml. Tirpalas perfiltruojamas pro 0,45μm porų dydžio filtrą, pridedama 2g NDS, laikoma 4°C temperatūroje.

3. Koncentruojamasis buferis: 15,12g Trisma druskos, ištirpinta 70ml distiliuoto vandens, sureguliuojamas pH su HCl (turi būti pH 6.8), galutinis tirpalo tūris turi būti 100ml. Tirpalas perfiltruojamas pro 0,45μm porų dydžio filtrą, pridedama 0,4g NDS, laikoma 4°C temperatūroje

4. Elektroforezės buferis: 25mM Trisma druskos, 192mM glicino, 0,1proc. SDS (pH 8.3).

Į šulinėlius pipetmanu (prieš tai išėmus „šukas“) pilami paruošti baltymų pavyzdžiai. Į kiekvieną minigelį supilamas vienodas kiekis paruoštų baltymų – po 15μg. Paleidžiama elektros srovė: vienam minigeliui reikia 12mA stiprumo srovės, kadangi vienu metu dedami keturi minigeliai, tai reikia 48mA stiprumo elektros srovės. Elektroforezė leidžiama 1 val. 45 min.

2.9. Baltymų perkėlimas ir ryškinimas

Baltymų perkėlimui iš gelio elektropernašos metodu (gamintojas BioRad) naudojama hidrofiliška 0,45 μ m PVDF membrana (polivinildendilfluorido membrana) (gamintojas Carl-Roth Ltd). Paruošiamas perkėlimo buferis (1L): 25mM Tris druskos (3g), 192 mM glicino (14,4g), 20 proc. metanolio (200ml). Šis perkėlimo buferis pilamas į elektroforetinį baltymų pernešimo rezervuarą ir sluoksniuojama: 5 popieriaus sluoksniai, membrana, gelis, 5 popieriaus sluoksniai. Membrana iš pradžių pamirkoma metanolyje, paskui buferyje. Popierius mirkomas buferyje. Sluoksniuojama atsargiai, kad nebūtų oro burbulų. Perkėlimui naudojama 0,8-1mA elektros srovės 1cm² membranos, elektros srovė leidžiama 1,5val.

Kadangi antikūnai, su kuriais bus identifikuojami dehidrinai, taip pat yra baltymai, jie irgi yra linkę lipti prie popieriaus. Todėl prieš užpilant pirminiu antikūnu, atliekamas blokavimas: PVDF membranos su perneštais baltymais panardinamos į blokuojantį 5proc. „Carnation“ (karvės) pieno baltymą, ištirpintą TBS buferyje (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH turi būti 7,5) ir inkubuojamos per naktį šaldytuve 5°C temperatūroje.

Kitą dieną nupilamas karvės pieno baltymas (blotas), užpilamas paruoštas TBS (angl. tris-buffered saline) buferis, kuriame buvo 0,01proc. detergento „Tween-20“. Dedama ant purtyklės 5 min. Paskui membranos dedamos į 50ml dydžio mėgintuvėlius ir užpilamos pirminiu antikūnu, t.y. triušio polikloniniu antikūnu, kuris yra specifiskas augalų dehidrinams. Pirminio antikūno skiedimo santykis 1:7500. Mėgintuvėliai dedami ant purtyklės 2-3 val. 5rpm. Po 2-3 val. membranos plaunamos vieną kartą TBS buferiu kartu su detergentu „Tween-20“, kurio yra 0,01proc. TBS buferio kiekio. Maišoma ant purtyklės 10 min. 10-12 rpm.

Prieš užpilant antrinį antikūną (triušio polikloninį antikūną, žymėtą krienų peroksidaze, skiestą santykiu 1:10000), membranos dedamos į naujus 50 ml dydžio mėgintuvėlius ir užpilamos antriniu antikūnu. Inkubuojama 1-1,5 val. 5 rpm. Po inkubavimo membranos plaunamos 3 kartus po 5 min. su TBS buferiu kartu su detergentu „Tween-20“.

Tam, kad pamatytume, kiek antikūnų yra ant membranos (t.y., kiek yra tiriamo baltymo), ant membranų reikia užpilti krienų peroksidazės, kuria žymėtas antrinis antikūnas, substrato. Tam naudojamas ECL (angl. enhanced chemiluminescence) reagentų mišinys (gamintojas Thermo Fisher Scientific). Membranos inkubuojamos ECL reagentų mišinyje 1min. kambario temperatūroje. Naudojama ne mažiau kaip 0,125ml ECL reagentų mišinio 1cm² membranos. Po inkubavimo, pašalinamas ECL reagentų mišinio perteklius, membranas padedant ant popieriaus 5-10s. Paskui

membranos dedamos ant maistinės plėvelės, užklojama irgi plėvele, išlyginama, kad nebūtų oro burbulų. Išjungiamą šviesą, dirbama visiškoje tamsoje. Plėvelės dedamos į rentgeno kasetę ir ryškinama ant X-ray filmo – juostelės. Ekspozicija pasirenkama 10 min. Rentgenografiškai išryškinama krienų peroksidazės ir jos substrato, esančio ECL mišinyje, reakcija. Gauta nuotrauka tiriama densitometriškai – kuo tamsesnė dėmė, tuo daugiau tame mėginyje buvo tiriamo baltymo.

3. REZULTATAI

3.1. Šaldymo pažeidimo vertinimas

Gauti tyrimo duomenys rodo, kad negrūdintų vyšnių mikroūglių KT50 kito nuo $-7,5^{\circ}\text{C}$ („Molodioznaja“) iki $-8,1^{\circ}\text{C}$ („Orkolija“), trešnių KT50 buvo $-7,8^{\circ}\text{C}$ - $-7,9^{\circ}\text{C}$ (5 lentelė).

5 lentelė. Vyšnių ir trešnių mikroūglių kritinės temperatūros, esant skirtingai grūdinimo trukmei, šaldant *in vitro* (su standartinio nuokrypio paklaida)

Rūšis, veislė	Negrūdinta	Grūdinta 1sav.	Grūdinta 2sav.	Grūdinta 4sav.	Grūdinta 8sav.
<i>P. cerasus</i> „Molodioznaja“	$-7,52 \pm 1,00$	$-7,47 \pm 0,64$	$-7,35 \pm 0,38$	$-8,96 \pm 0,09$	$-8,44 \pm 0,11$
<i>P. avium</i> „Merchant“	$-7,80 \pm 0,32$	$-8,60 \pm 0,33$	$-9,06 \pm 0,15$	$-9,07 \pm 0,28$	$-9,68 \pm 1,10$
<i>P. cerasus</i> „Orkolija“	$-8,12 \pm 0,43$	$-8,47 \pm 0,27$	$-9,37 \pm 0,96$	$-9,71 \pm 0,41$	$-9,09 \pm 0,59$
<i>P. avium</i> „Jurgita“	$-7,87 \pm 0,42$	$-7,61 \pm 0,60$	$-8,65 \pm 0,17$	$-8,59 \pm 0,30$	$-8,59 \pm 0,48$
<i>P. cerasus</i> „Vietinė rūgščioji“	$-7,97 \pm 0,30$	$-8,66 \pm 0,12$	$-8,29 \pm 0,23$	$-8,83 \pm 0,18$	$-9,32 \pm 0,64$
Vidurkis	-7,86	-8,16	-8,54	-9,03	-9,03

Kuo mažesnė KT50 reikšmė, tuo didesnis mikroūglių atsparumas šalčiui. Grūdintų 2 – 8 savaites mikroūglių KT50, palyginus su negrūdintais mikroūgliais, sumažėja vidutiniškai $1,2^{\circ}\text{C}$. Tai reikšmingas sumažėjimas. Labiausiai KT50 sumažėjo trešnės „Merchant“, mažiausiai – vyšnios „Orkolija“ mikroūglių, todėl ir skiriasi ir šių augalų užsigrūdinimo galimybės. Tyrimo metu nustatyta, kad vienos savaitės grūdinimas atsparumo šalčiui nepadidino (išskyrus vyšnią „Vietinė rūgščioji“), todėl trumpas grūdinimas yra nepakankamas. Dviejų savaičių grūdinimas reikšmingai sumažino visų veislių KT50 (išskyrus vyšnios „Molodioznaja“). Trijų veislių - vyšnios „Orkolija“, trešnių „Merchant“ ir „Jurgita“ mikroūglių 4 savaičių ir 8 savaičių grūdinimas, lyginat su dviejų savaičių

trukmės grūdinimu, atsparumo šalčiui ženkliai nepadidino. Todėl galima teigti, kad šių veislių mikroūgliai maksimalų užsigrūdinimą pasiekia jau po dviejų savaitių. Po 4 savaitių grūdinimo maksimaliai užsigrūdino likusių dviejų veislių - vyšnių „Molodioznaja“ ir „Vietinė rūgščioji“ mikroūgliai. Todėl 4 savaitių grūdinimas yra pakankamas tirtiems *Prunus* genties augalams pasiekti didžiausią absoliučią KT50 reikšmę arba maksimalų atsparumą šalčiui.

Iš gautų duomenų matoma, kad negrūdintų *Malus* genties mikroūglių KT50 reikšmė kito nuo $-6,8^{\circ}\text{C}$ („Auksis“) iki $-8,3^{\circ}\text{C}$ (*M.prunifolia*), vidutinė reikšmė siekė $-7,6^{\circ}\text{C}$ (6 lenetelė).

6 lentelė. Obelių mikroūglių kritinės temperatūros, esant skirtingai grūdinimo trukmei, šaldant *in vitro* (su standartinio nuokrypio paklaida)

Rūšis, veislė	Negrūdinta	Grūdinta 1sav.	Grūdinta 2sav.	Grūdinta 4sav.	Grūdinta 8sav.
<i>M. domestica</i> „Gala“	-7.38 ± 0.21	-7.84 ± 0.17	-8.35 ± 0.12	-8.45 ± 0.10	-8.21 ± 0.25
<i>M. domestica</i> „Golden delicious“	-7.53 ± 0.89	-7.22 ± 0.33	-8.68 ± 0.78	-8.79 ± 0.18	-8.71 ± 0.13
<i>M. domestica</i> „Auksis“	-6.78 ± 0.28	-8.18 ± 0.14	-7.98 ± 0.16	-8.04 ± 0.13	-8.86 ± 0.08
<i>M. domestica</i> „Popierinis“	-7.76 ± 0.15	-7.73 ± 0.22	-7.63 ± 0.29	-7.50 ± 0.07	-8.61 ± 0.25
<i>M.platycarpa</i>	-7.84 ± 0.09	-7.53 ± 0.25	-8.26 ± 0.19	-7.92 ± 0.12	-8.98 ± 0.19
<i>M. prunifolia</i>	-8.27 ± 0.11	-8.64 ± 0.15	-7.86 ± 0.19	-8.05 ± 0.12	-9.08 ± 0.21
Vidurkis	-7,59	-7,77	-8,13	-7,96	-9,03

Grūdinimas KT50 reikšmę sumažino vidutiniškai $1,2^{\circ}\text{C}$. Obelių „Gala“, „Auksis“ mikroūgliams pakako vienos savaitės grūdinimo, kad reikšmingai padidėtų absoliuti KT50 reikšmė, *M. platycarpa* ir „Golden Delicious“ mikroūgliams prireikė dviejų savaitių, o *M. prunifolia* ir „Popierinis“ veislės mikroūgliams reikėjo net aštuonių savaitių grūdinimo. Aštuonias savaites grūdintų *Malus* mikroūglių KT50 svyravo nuo $-8,2^{\circ}\text{C}$ („Gala“) iki $-9,1^{\circ}\text{C}$ (*M. prunifolia*).

Gauti duomenys rodo, kad negrūdintų *Fragaria* genties mikroūglių KT50 svyravo nuo $-6,7^{\circ}\text{C}$ („Holiday“) iki $-7,7^{\circ}\text{C}$ („Dangė“, *F. Vesca* FV3) (7 lentelė).

7 lentelė. Braškių ir žemuogių mikroūglių kritinės temperatūros, esant skirtingai grūdinimo trukmei, šaldant *in vitro* (su standartinio nuokrypio paklaida)

Rūšis, veislė	Negrūdinta	Grūdinta 1sav.	Grūdinta 2sav.	Grūdinta 4sav.	Grūdinta 8sav.
<i>F. ananassa</i> „Elsanta“	-7.28 ± 0.21	-7.44 ± 0.10	-7.63 ± 0.09	-8.32 ± 0.10	-8.59 ± 0.12
<i>F. ananassa</i> „Dangė“	-7.70 ± 0.89	-7.38 ± 0.10	-7.60 ± 0.08	-8.09 ± 0.18	-9.03 ± 0.08
<i>F. ananassa</i> „Melody“	-7.32 ± 0.28	-7.27 ± 0.16	-7.69 ± 0.09	-8.30 ± 0.13	-8.96 ± 0.13
<i>F. ananassa</i> „Holiday“	$-6,70 \pm 0,09$	$-7,13 \pm 0,09$	$-7,49 \pm 0,06$	$-8,44 \pm 0,25$	$-8,62 \pm 0,17$
<i>F. moschata</i>	-7.44 ± 0.15	-7.57 ± 0.13	-7.76 ± 0.09	-8.39 ± 0.07	-9.21 ± 0.29
<i>F. vesca</i> FV3	-7.73 ± 0.09	-7.25 ± 0.13	-7.69 ± 0.05	-7.99 ± 0.12	-8.57 ± 0.08
Vidurkis	-7,36	-7,34	-7,64	-8,25	-8,83

Grūdinimas *Fragaria* mikroūglių KT50 reikšmę, kaip ir *Prunus* ir *Malus* genčių mikroūglių, sumažino vidutiniškai $1,2^{\circ}\text{C}$. Visų *Fragaria* veislių mikroūglių maksimaliam užsigrūdinimui reikėjo 8 savaitių, bet reikšmingas KT50 absoliučios reikšmės sumažėjimas, lyginant su negrūdintais mikroūgliais, matomas jau po 2-4 grūdinimo savaitių. Didžiausias šios reikšmės sumažėjimas – $1,9^{\circ}\text{C}$ „Holiday“ ir $1,8^{\circ}\text{C}$ *F. moschata* bei $1,6^{\circ}\text{C}$ „Melody“ veislės mikroūgliams. *F. moschata* ir „Melody“ veislių augalai pasižymi ir didesniu atsparumu šalčiui ir lauko sąlygomis (Rugienius, Stanys 2001; Lukosevičiūtė ir kt, 2009), o veislė „Holiday“ yra neištverminga lauko sąlygomis, todėl grūdinant šios veislės KT50 sumažėjo daugiausiai.

Tyrimų rezultatų duomenimis negrūdintų kriaušių mikroūglių KT50 svyravo neženkliai: nuo $7,4^{\circ}\text{C}$ („Hasselpere“, „Karalienė Jadvyga“) iki $7,5^{\circ}\text{C}$ (*P. pyrastrer*, „Karalienė Jadvyga“) (8 lentelė).

8 lentelė. Kriaušių mikroūglių kritinės temperatūros, esant skirtingai grūdinimo trukmei, šaldant *in vitro* (su standartinio nuokrypio paklaida)

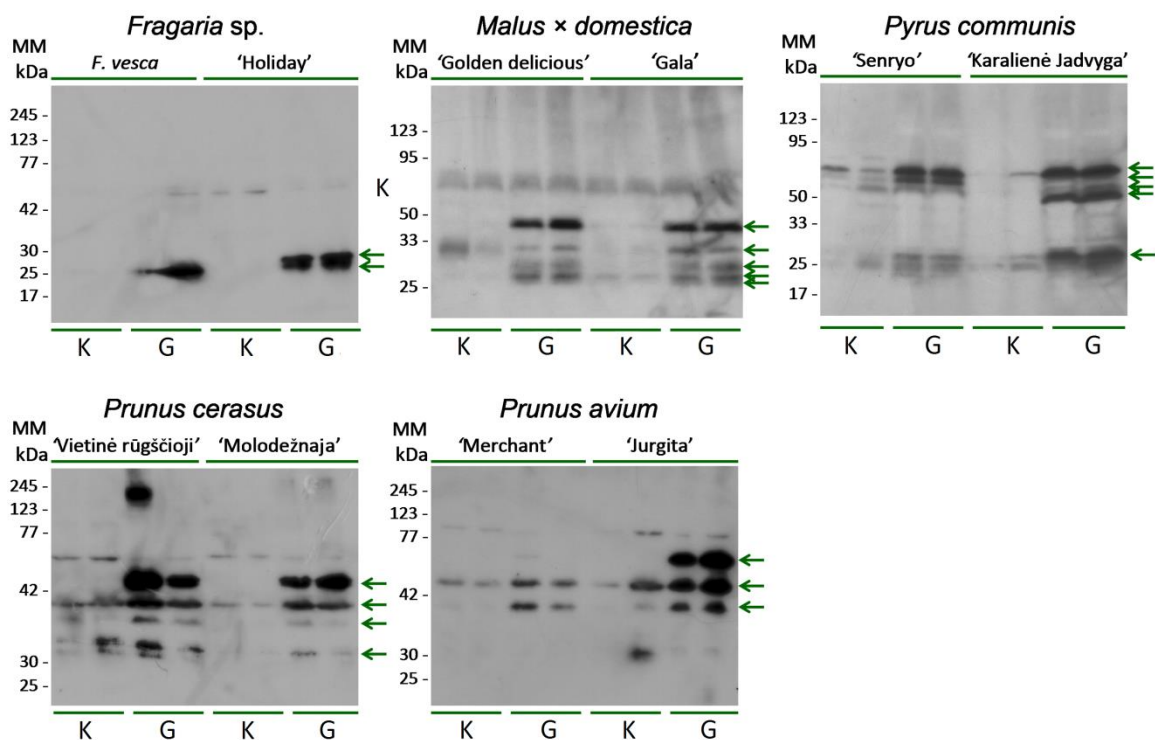
Rūšis, veislė	Negrūdinta	Grūdinta 1sav.	Grūdinta 2sav.	Grūdinta 4sav.	Grūdinta 8sav.
<i>P.pyraster</i>	-7.54±0.07	-7.61±0.09	-7.65±0.09	-8.21±0.10	-8.45±0.24
<i>P. communis</i> „Hasselpeare“	-7.37±0.14	-7.61±0.09	-7.78±0.24	-8.06±0.11	-8.38±0.11
<i>P. communis</i> „Senryo“	-7.54±0.08	-7.75±0.11	-7.95±0.09	-8.33±0.05	-8.47±0.16
<i>P. communis</i> „Karalienė Jadvyga“	-7.42±0.05	-7.97±0.08	-8.07±0.14	-8.54±0.34	-8.64±0.13
Vidurkis	-7.47	-7.74	-7.86	-8.29	-8.49

Grūdinimas *Pyrus* genties mikroūglių absoliučią KT50 reikšmę taip pat sumažino beveik 1,2°C. Visos kriaušių mikroūglių veislės maksimalų užsigrūdinimą pasiekia po 8 savaičių. Aštuonias savaites grūdintų *Pyrus* genties mikroūglių KT50 svyravo nuo 8,4°C („Hasselpeare“) iki 8,6°C („Karalienė Jadvyga“). Didžiausias šios reikšmės sumažėjimas 1,2°C nustatytas „Karalienė Jadvyga“ veislės mikroūgliams.

Mūsų tyrimai, kurių metu buvo įvertintas šalčio sukeltas jonų išlaisvinimas po mikroūglių šaldymo *in vitro* ir nustatyta kritinė temperatūra (KT50), rodo, kad pakankama grūdinimo trukmė maksimaliam tiriamų augalų atsparumui šalčiui pasiekti ir dehidrinų raiškai įvertinti yra 4 savaitės (*M.platicarpa*, *M.prunifolia*, *Pyrus*, *Fragaria* rūšys maksimaliai užsigrūdina po 8 savaičių, tačiau nėra reikšmingo KT50 sumažėjimo, lyginant su 4 savaičių grūdinimu). Kadangi dehidrinų kaupimasis susijęs su užsigrūdinimu ir atsparumu šalčiui, mūsų tyrime dehidrinai buvo išskiriami ir analizuojami 4 savaites užgrūdintuose ir negrūdintuose (kontrolė) augaluose.

3.2. Dehidrinų vertinimas

Imunocheminiu metodu su dehidrinams specifišku triušio polikloniniu antikūnu išskirti dehidrinai. Tyrimo rezultatai rodo, kad tiriamoms veislėms būdinga nuo dviejų iki penkių skirtingos molekulinės masės dehidrinų tipo baltymų (3 pav.).



3. pav. Daržinės braškės, paprastosios žemuogės, naminės obels, paprastosios kriaušės, paprastosios vyšnios ir trešnės baltymų ekstraktų immunocheminė analizė taikant dehidrinams specifiską antikūnį. K – kontrolė, G – grūdinta, MM – molekulinė masė.

© R.Rugienius

Po grūdinimo obels veislių „Gala“ ir „Golden delicious“ mikroūgliuose padidėjo penkių dehidrinų tipo baltymų, kurių molekulinė masė buvo apytiksliai 26, 28, 30, 32 ir 43 kDa, kiekis, lyginant su kontroliniais augalais. „Golden delicious“ mikroūglių kontrolės pavyzdžiuose pastebimas 32 kDa masės baltymą atitinkanti žymė. Galima daryti išvadą, kad kai kuriems ir negrūdintiems augalams būdingas tam tikrų dehidrinų kaupimasis. Kitų dehidrinų tipo baltymų reikšmingesnių kiekių kontrolės pavyzdžiuose nenustatyta.

Po grūdinimo vyšnios veislių „Molodeznaja“ ir „Vietinė rūgščioji“ mikroūgliuose padidėjo apytiksliai 33, 37, 40 ir 51 kDa molekulinės masės dehidrinų kiekis, labiausiai padidėjo 51 kDa dydžio baltymo kiekis: negrūdintų augalų pavyzdžiuose jo nematome, o po grūdinimo šio baltymo žymė yra viena ryškiausių.

Trešnės veislių „Jurgita“ ir „Merchant“ mikroūgliuose po 4 savaitių grūdinimo padidėjo 42, 51 ir 65 kDa molekulinės masės dehidrinų kiekis. Taip pat nustatytas labai ryškus skirtumas tarp dehidrinų raiškos lygio skirtingoms veislėms: 65 kDa baltymas nenustatytas „Merchant“ veislei, tačiau

šio baltymo raiška labai stipriai padidėja „Jurgita“ veislės grūdintuose mikroūgliuose. Galima daryti išvadą, kad šis baltymas yra analogiškas minėtam vyšnių baltymui.

Kriaušės veislių „Karalienė Jadvyga“ ir „Senryo“ grūdintų augalų mikroūgliuose nustatyti 27, 50, 60, 70 ir 75 kDa molekulinės masės dehidrinų tipo baltymai. Kontroliniuose pavyzdžiuose pastebima dalies šių baltymų raiška. Tačiau visiems šiems baltymams būdingas kiekio padidėjimas, lyginant su negrūdintų augalų pavyzdžiais.

Mažiausias dehidrinų tipo baltymų kiekis nustatytas žemoje teigiamoje temperatūroje grūdintų braškės veislės „Holiday“ mikroūgliuose. Nustatytas dviejų dehidrinų (26 ir 28 kDa) kiekio padidėjimas.

4. APIBENDRINIMAS

Nagrinėtoje užsienio ir Lietuvos literatūroje pakankamai detaliai aprašyta dehidrinų biocheminė sandara ir galimi veikimo būdai. Dehidrinai yra įvairios molekulinės masės: nuo 9 iki 200kD (Hanin ir kt., 2011). Šiems baltymams būdingi tokie konservatyvūs segmentai: 1-11 kartų pasikartojantis ir lizino amino rūgštimi praturtintas K segmentas (Kosova ir kt., 2007), tirozinu turtingas Y segmentas (Hanin ir kt. 2011), S segmentas, kurį sudaro pasikartojantys serino likučiai (Close, 1996). Be konservatyvių segmentų, dehidrinus sudaro ϕ segmentai, kuriuose dažnai gausu glicino ir polinių amino rūgščių (Ingram ir Bartels, 1996).

Dehidrinai kaupiasi vėlyvosios vystymosi stadijos embrionuose, vegetaciniuose audiniuose jie retai aptinkami. Tačiau jei augalai patiria įvairų stresą, sukeltą ląstelių dehidrataciją (sausrą, osmosinis stresas, per žemą ar per aukštą temperatūrą, druskingumo pokyčius), dehidrinai pradeda kauptis visuose vegetaciniuose audiniuose (Bray, 1997). Nustatyti du į šaltį reaguojančių genų reguliavimo keliai: 1) nuo abscizo rūgšties priklausomas kelias; 2) nuo abscizo rūgšties nepriklausomas kelias.

Dehidrinų tyrimams ruošiamos agarizuotos MS terpės (Murashige, Skoog, 1962), į jas sodinami sterilizuoti mikroūgliai, auginami klimato kameroje 6 savaites (žolinių augalų) arba 8 savaites (sumedėjusių augalų) 22°C temperatūroje, naudojant 50-150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ intensyvumo apšvietimą fluorescencinėmis lempomis 16/8h dienos/nakties fotoperiodu. Palaikomas 60 proc. santykinis drėgnumas.

Mikroūgliai grūdinami klimato kameroje 4°C temperatūroje šviesoje. Grūdinimo laikotarpis: 7, 14, 28, 56 paros. Kontrolinis variantas – negrūdinta.

Mikroūglių šaldymas vyksta -5 - -14°C temperatūrų intervale. Kiekvienoje temperatūroje šaldoma po 10 kiekvienos veislės pavyzdžių (po 10 mėgintuvėlių). Šaldomi ir grūdinti mikroūgliai, ir negrūdinti mikroūgliai (kontrolinis variantas). Kontrolė atliekama su visai nešaldytais mikroūgliais (10 pavydžių) ir su mikroūgliais, šaldytais -20°C temperatūroje (10 pavydžių).

Po šaldymo atliekamas jonų išlaisvinimo iš pažeistų audinių vertinimas konduktometriiniu metodu, apskaičiuojama kritinė temperatūra. Pagal nustatytą kritinę temperatūrą pasirinkti 4 savaites grūdinti mikroūgliai dehidrinų išskyrimui: jų pavyzdžiai homogenizuoti, išskirta baltymų frakcija fenolio ekstrakcijos metodu, baltymai išskirti poliakilamido gelio elektroforeze denatūruoančiomis

sąlygomis „Protean Mini“ sistema, dehidrinai identifikuoti imunocheminiu metodu su dehidrinams specifiniu triušio polikloniniu antikūnu.

Gauti rezultatai parodė, kad per 4 savaites augalai maksimaliai užsigrūdina ir nustatoma maksimali dehidrinų raiška. Grūdintų mikroūglių absoliuti kritinės temperatūros reikšmė, palyginus su negrūdintais mikroūgliais, sumažėjo vidutiniškai 1,2°C. Atlikus baltymų elektroforezę ir jų imunocheminę analizę, nustatyta kad tiriamoms veislėms būdinga nuo dviejų iki penkių skirtingos molekulinės masės dehidrinų tipo baltymų raiška ir žymus jų kiekio padidėjimas, lyginant su negrūdintais mikroūgliais. Daugiausiai dehidrinų tipo baltymų nustatyta *Malus* genties veislių „Gala“ ir „Golden delicious“ ir *Pyrus* genties veislių „Karalienė Jadvyga“ ir „Senryo“ mikroūgliuose: po elektroforezės ir imunocheminės analizės šiuose mikroūgliuose nustatyta, kad padidėjo penkių dehidrinų tipo baltymų, kurių molekulinė masė buvo apytiksliai 26, 28, 30, 32 ir 43 kDa *Malus* genties mikroūgliams ir 27, 50, 60, 70 ir 75 kDa *Pyrus* genties mikroūgliams, kiekis, lyginant su kontroliniais augalais. Mažiausias dehidrinų tipo baltymų kiekis nustatytas braškės veislės „Holiday“ mikroūgliuose. Nustatytas dviejų dehidrinų (26 ir 28 kDa) kiekio padidėjimas.

IŠVADOS:

1. Atlikus tyrimus nustatyta, kad grūdintų mikroūglių absoliuti kritinės temperatūros reikšmė, palyginus su negrūdintais mikroūgliais, sumažėjo vidutiniškai 1,2°C.

2. Tyrimo metu nustatyta, kad grūdinimo trukmė, reikalinga maksimaliam užsigrūdinimui pasiekti, priklauso nuo augalo rūšies ir veislės: *M. platicarpa*, *M. prunifolia*, *Pyrus* ir *Fragaria* rūšyse ši trukmė yra 8 savaitės, *P. cerasus* ir *M. domestica* – svyruoja tarp 4 ir 8 savaičių, *P. avium* – tarp 2 ir 4 savaičių. Pakankama grūdinimo trukmė, įvertinti dehidrinų raišką užsigrūdinimo metu, yra 4 savaitės.

3. Tiriamoms veislėms būdinga 2-5 skirtingos molekulinės masės dehidrinų raiška ir žymus jų kiekio padidėjimas, lyginant su negrūdintais mikroūgliais.

4. Daugiausiai dehidrinų tipo baltymų nustatyta obels veislių „Gala“ ir „Golden delicious“ ir kriaušės veislių „Karalienė Jadvyga“ ir „Senryo“ mikroūgliuose: nustatyta po penkis skirtingos molekulinės masės dehidrinų tipo baltymus. Mažiausiai - dviejų - dehidrinų tipo baltymų sukauptė braškės „Holiday“ veislės mikroūgliai. Taigi daugiausiai dehidrinų sukaupia ir žiemą ištvermingesni yra sumedėję augalai, o mažiau dehidrinų sukaupia ir žiema mažiau ištvermingi yra žoliniai augalai.

5. Daugiausiai dehidrinų sukaupiančios veislės lauko sąlygomis yra vidutiniškai ištvermingos žiemą, todėl maksimaliam atsparumui šalčiui pasiekti svarbu ne tik dehidrinų kiekis, bet ir jų sudėtis.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ali-Benali M.A., Alaray, R., Joudrier, P., Gautier, M.F. Comparative expression of five Lea genes during wheat seed development and in response to abiotic stresses by real-time quantitative RT-PCR. *Biochemica et Biophysica Acta*, N.1730,2005, p.56-65.
2. Alsheikh, M.K., Heyen, B.J., Randall, S.K. Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, N. 278, American Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2003, p.40882-40889.
3. Alsheikh, M.K., Svensson, J.T., Randall, S.K. Phosphorylation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. *Plant, Cell and Environment*. N. 28, Blackwell publishing, 2005, p.1114-1122.
4. Artus, N.N., Uemura, M., Steponkus, P.L., Gilmour, S.J., Lin, C., Thomashow, M.F. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* *COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. N.9, 1996, p.13404-13409.
5. Augalų biotechnologijos centras. <http://www.PlantBioNet.lt> [2013 12 10]
6. Baniulis, D., Stepulaitienė, I., Lukoševičiūtė, V., Blažytė, A., Stanys, V., Rugienius, R. Accumulation of dehydrin-like proteins in pear microshoots during cold acclimation *in vitro*. *Žemdirbystė=Agriculture*, N. 99(3), 2012, p.293-298.
7. Bassett, C.L., Wisniewski, M.E., Artlip, T.S., Norelli, J.L., Renaut, J., Farrell, R.E.Jr. Global analysis of genes regulated by low temperature and photoperiod in peach bark. *Journal of American Society for horticultural Science*. N.131, 2006, p.551-563.
8. Blažytė, A. Lietuvos augalų nacionaliniai genetiniai ištekliai. Senosios Lietuviškos vaismedžių veislės. *Lietuvos Respublikos Aplinkos ministerija, Augalų genų bankas*. Akademija, 2008.
9. Bray, E.A. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*. N.103,1993, p.1035-1040.
10. Būdvytytė A. The Catalogue of Lithuanian Plant Genetic Resources. 1997.
11. Cai, Q., Moore, G.A., Guy, C.L. An unusual group 2 LEA gene family in citrus responsive to low temperature. *Plant Molecular Biology*. N. 29, 1995, p.11-23.
12. Caswell, K. L., Tyler, N. J., Stushnoff, C. Cold hardening of *in vitro* apple and Saskatoon shoot cultures. *HortScience*. N. 21, 1986, p.1207-1209.

13. Close, T.J. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*, N.97(4), 1996, p.795-803.
14. Deng, Z.X., Pang, Y.Z., Kong, W.W., Chen, Z.H., Wang, X.L., Liu, X.J., Pi, Y., Sun, X.F.M., Tang, K.X. A novel ABA dependent dehydrin *ERD10* gene from *Brassica napus*. *DNA sequence*. N. 16, Taylor and Francis, 2005, p.28-35.
15. Dhanaraj, A.L., Slovin, J.P., Rowland, L.J. Isolation of a cDNA clone and characterization of expression of the highly abundant, cold acclimation-associated 14 kDa dehydrin of blueberry. *Plant Science*. N. 168, 2005, p.949-957.
16. Dure, L.. Structural motifs in Lea proteins. Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. *Current Topics in Plant Physiology*. N.10, 1993, p.91-103.
17. Gilmour, S.J., Artus, N.N., Thomashow, M.T. cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. N.18, 1992, p.13-21.
18. Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y. Takeda, S. Masmoudi, K. Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant signaling and behavior*. N.10(6), 2011, p.1503-1509.
19. Hara, M., Terashima, S., Fukaya, T., Kuboi, T. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, N.217(2), 2003, p.290-298.
20. Hara, M., Fujinaga, M., Kuboi, T. Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *Journal of experimental botany*. N.56, 2005, p.2695-2703.
21. Ingram, J., Bartels, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review Plant Physiology, Plant Molecular Biology*. 1996; N.47 p.377-403.
22. Isaacson T., Damasceno C. M.B., Saravanan R.S., He Y., Catala C., Saladie M., Rose J.K.C. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nature Protocols 1*. 2006; p.769-774.
23. Ismail, A.M., Hall, A.E., Close, T.J. Allelic variation of a dehydrin gene cosegregates with chilling tolerance during seedling emergence. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. N.96, 1999, p.13566-13570, ISSN 1091-6490.
24. Israelachvili, J., Wennerström, H. Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions. *Nature*, 1996, N. 379, p.219-225.
25. Yakubov, B., Barazani, O., Shachack, A., Rowland, L.J., Shoseyov, O., Golan-Goldhirsh, A. Cloning and expression of a dehydrin-like protein from *Pistacia vera* L. *Trees* N. 19, 2005, p.224-230.

26. Yamame, H., Kashiwa, Y., Kakehi, E., Yonemori, K., Mori, H., Hayashi, K., Iwamoto, K., Tao, R., Kataoka, I. Differential expression of dehydrin in flower buds of two Japanese apricot cultivars requiring different chilling requirements for bud break. *Tree Physiology*, N.2 (12), 2006, p.1559-1563.
27. 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*, 2010, doi:10.1007/s00425-010-1279-6.
28. Yao, K., Lockhart, K.M., Kalanack, J.J. Cloning of dehydrin sequences from *Brassica juncea* and *Brassica napus* and their low temperature-inducible expression in germinating seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*. N. 43, Elsevier, 2005, p.83-89.
29. Jurecky, D. K. 'Holiday' strawberry. *New York's Food and life sciences bulletin*. N. 171, 1972, p.1-2.
30. Kang D., Song Gho Y., Suh M., Kang C. Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie Brilliant Blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull. Korean Chemical Society*. 2002, Vol. 23, N. 11.
31. Kemežienė, I., Rugienius, R., Stanys, V. Genetinių faktorių, lemiančių atsparumą šalčiui sodo augaluose, tyrimas ir modifikavimas. *Ataskaitinės mokslinės konferencijos medžiaga*. 2009, 22:30–36.
32. Kirch, H.H., Van Berkel, J., Glaczinski, H., Salamini, F., Gebhardt, C. Structural organization, expression and promoter activity of a cold-stress-inducible gene of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Molecular Biology*, N. 33, 1997, p.897-909, ISSN 1573-5028.
33. Kitashiba, H., Ishizaka, T., Isuzugawa, K., Nishimura, K., Suzuki, T. Expression of a sweet cherry DREB1/CBF ortholog in *Arabidopsis* confers salt and freezing tolerance. *Plant Physiology*. N. 161, 2004, p.1171-1176.
34. Kosova, K., Vitamvas, P., Prašil, I.T. The role of dehydrins in plant response to cold. *Biologia Plantarum*, N. 51(4), 2007, p.601-617.
35. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage. *Nature*, 1970, 4(227):680-685.
36. Levi, A., Panta, G.R., Parmentier, C.M., Muthalif, M.M., Arora, R., Shanker, S., Rowland, L.J. Complementary DNA cloning, sequencing and expression of an unusual dehydrin from blueberry floral buds. *Plant Physiology*. N. 107, 1999, p.98-109.

37. Linden L. Measuring cold hardiness in woody plants. Academic dissertation. Helsinki, 2002, p.1-57.
38. Little, E.L. Checklist of the United States trees (native and naturalized). 1979. *Agricultural handbook 541*, US Department of Agriculture, Forest Service, Washington D.C.
39. Lukoševičiūtė, V., Rugienius, R., Zalunskaitė, I., Sasnauskas, A., Stanys, V. Strawberry cold hardening investigations *in vitro*. *Acta Horticulturae*, N.842, 2007, p.789-792.
40. Lukoševičiūtė, V., Rugienius, R., Stanienė, G., Stanys, V., Baniulis, D. Grūdinimo įtaka termostabilių baltymų kiekiui trešnės ir paprastosios vyšnios mikroūgliuose *in vitro* sąlygose. *Sodininkystė ir daržininkystė*. N.28(4), 2009, p.35-43.
41. Lukoševičiūtė, V. Braškių užsigrūdinimo ir atsparumo šalčiui charakterizavimas *in vitro* ir *in vivo*. *Daktaro disertacija*. Akademija, 2013, p.6-20.
42. Monroy, A.F., Castonguay, Y., Laberge, S., Sarhan, F., Vezina, L.P., Dhindsa, R.S. A new cold-induced alfalfa gene is associated with enhanced hardening at subzero temperature. *Plant Physiology*. N.102, 1993, p.873-879.
43. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
44. NDong C., Ouellet F., Houde M. , Sarhan F. Gene expression during cold acclimation in strawberry. *Plant Cell Physiology*. N.38, 1997, p. 863–870.
45. Neven, L.G., Haskell, D.W., Hofig, A., Li, Q.B., Guy, C.L. Characterization of a spinach gene responsive to low temperature and water stress. *Plant Molecular Biology*, N.21, 1993, p.291-305, ISSN 1573-5028.
46. Owens, C. L., Thomashow, M.F., Jancock, J.F., Iezzoni, A.F. *CBF1* orthologs in sour cherry and strawberry and the heterologous expression of *CBF1* in strawberry. *Journal of the American Society for Horticulture Science*, N.127, 2002, p.489-494.
47. Palonen, P., Buszard, D. *In vitro* screening for cold hardiness of raspberry cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. N.53, 1997, p.231-216.
48. Porat, R., Pavoncello, D., Lurie, S., McCollum, T.G. Identification of a grapefruit cDNA belonging to a unique class of citrus dehydrins and characterization of its expression patterns under temperature stress conditions. *Plant Physiology*. N.115, 2002, p.598-603.

49. Puhakainen, T., Li, C., Malm, M.B., Kangasjarvi, J., Heino, P., Palva, T. Short-day potentiation of low temperature-induced gene expression of a C-repeat-binding factor-controlled gene during cold acclimation in silver birch. *Plant Physiology*. N.136, 2004, p.4299-4307.
50. Reski R, Abel WO. 1985. Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* 165:354–358.
51. Rorat, T., Grygorowicz, W.J., Irzykowski, W., Rey, P. Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factor related to organ type and leaf developmental stage during vegetative growth. *Planta*, N.218, 2004, p.878-885.
52. Rorat, T., Szabala, B.M., Grygorowicz, W.J., Wojtowicz, B., Yin, Z., Rey, P.. Expression of SK3-type dehydrin in transporting organs is associated with cold acclimation in *Solanum* species. *Planta*, N.224, 2006, p.205-221.
53. Rouse, D.T., Marott, R., Parish, R.W. Promoter and expression studies on an *Arabidopsis thaliana* dehydrin gene. - *FEBS Letters* N. 381, Elsevier, 1996, p.252-256.
54. Rugienius, R. Atsparių šalčiui braškių sėjinukų atrankos technologijų *in vitro*, *in vivo* ir *in situ* palyginimas. *Sodininkystė ir daržininkystė*. N. 19(2), 2000, p.3-10.
55. Rugienius, R., Stanys, V. *In vitro* screening of strawberry plants for cold resistance. *Euphytica*. N.122, 2001, p.269-277.
56. Rugienius, R., Sasnauskas, A., Šikšnianas, T. ‘Saulene’ and ‘Dange’ – two recent Lithuanian strawberry cultivars. *Acta Horticulturae*. N. 649, 2004, p.73-76.
57. Rugienius, R., Sasnauskas, A. Braškių veislių ir hibridinių klonų tyrimas. *Sodininkystė ir daržininkystė*. N.24(1), 2005, p.34-41.
58. Rugienius, R., Sasnauskas, A. Braškių veislių tyrimas Lietuvoje pagal tarptautinę COST 863 programą. *Sodininkystė ir daržininkystė*. N.25(4), 2006, p.43-52.
59. Rugienius, R., Lukoševičiūtė, V., Stanienė, G., Stanys, V. Žemės ūkio augalų atsparumo šalčiui tyrimai *in vitro*. *Sodininkystė ir daržininkystė*. N.27(3), 2008, p.47-61.
60. Rugienius, R. Dehydra projektas. Nespausdinta medžiaga, 2013.
61. Sakai, A.. Strategy of plant cold hardiness. Japan, 2009, p.1-230.
62. Shulaev, V., Korban, S.S., Sosinski, B., Abbott, A.G., Aldwinckle H.S., Folta, K.M, Iezzoni, A., Main, D. Aru's, P., Dandekar, A.M., Lewers, K., Brown, S.K., Davis, T.M., Gardiner, S.E., Potter, D., Veilleux, R.E. Multiple Models for Rosaceae Genomics. *Plant Physiology*, N.147, American Society of Plant Biologists, 2008, p.985–1003.

63. Staudt, G. Systematic and Geographical Distribution of the American Strawberry Species: Taxonomic Studies in the Genus *Fragaria* (Rosaceae: Potentilleae). *University of California Publications in Botany*, Berkeley, CA. N. 81, 1999, p. 122.
64. The Plant List. www.theplantlist.org [2015 04 27]
65. Thomashow, M.F. Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway. *Plant Physiology*. N.154, 2010, p.571-577.
66. Thomashow, M.F. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, N.50, 1999, p.571-599.
67. Wahid, A., Close, T.J. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biologia Plantarum*. N.51(1), 2007, p.104-109.
68. Welling, A., Rinne, P., Vihera-Aarnio, A., Kontunen-Soppela, S., Heino, P., Palva, E.T. Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.). *Journal of experimental botany*. N.55, 2004, p.507-516.
69. Wisniewski M.E., Bassett C.L., Renaut J, Farrell R., Jr., Tworkowski T., Artlip T.S. Differential regulation of two dehydrin genes from peach (*Prunus persica*) by photoperiod, low temperature and water deficit. *Tree physiology*. N.26, Heron Publishing – Victoria, 2006, p.575-584.
70. Wisniewski M.E., Norelli J., Bassett C., Artlip T., Macarasin D. Ectopic expression of a novel peach (*Prunus persica*) CBF transcription factor in apple (*Malus 3 domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness. *Planta*. N.233, Springer-Verlag, 2011, p.971-983.
71. Wisniewski, M.E., Arora, R. Structural and biochemical aspects of cold hardiness in woody plants. *Kluwer Academic Publishers*, 2000, p.419-437.
72. Wolfrain, L.A., Langis, R., Tyson, H., Dhindsa, R.S. cDNA sequence, expression, and transcript stability of a cold acclimation-specific gene, *cas18*, of alfalfa (*Medicago falcata*) cells. *Plant Physiology*. N.101, 1993, p.1275-1282.
73. www.orangeippin.com/apples/gala, [2015 04 19].
74. www.orangeippin.com/apples/golden-delicious, [2015 04 19].
75. www.orangeippin.com/cherries/merchant , [2015 04 19].
76. Zalunskaitė, I., Rugienius, R., Vinskienė, J., Bendokas, V., Gelvonauskienė, D., Stanys, V. Expression of COR gene homologues in different plants during cold acclimation. *Biologija*. N. 54, 2008, p.33-35.