

Grūdinimo įtaka termostabilių baltymų kiekiui trešnės ir paprastosios vyšnios mikroūgliuose *in vitro* sąlygomis

**Vanda Lukoševičiūtė, Rytis Rugienius, Gražina Stanienė,
Vidmantas Stanys, Danas Baniulis**

*Lietuvos sodininkystės ir daržininkystės institutas, Kauno g. 30, LT-54333 Babtai,
Kauno r., el. paštas v.lukoseviciute@lsdi.lt*

Vykdamas šalčiui atsparių trešnės (*Prunus avium* L.) ir paprastosios vyšnios (*Prunus cerasus* L.) selekciją ir kuriant genetinių išteklių saugojimo *in vitro* sąlygomis metodus, yra reikalingos žinios apie užsigrūdinimą sąlygojančius procesus. Sumedėjusiems augalams būdingi sezoniniai dehidrinų genų raiškos pokyčiai, o dehidrinų kaupimasis audiniuose tiesiogiai susijęs su atsparumu šalčiui. Atlikus šį darbą buvo įvertinta grūdinimo įtaka termostabilių baltymų kiekiui trešnės ir paprastosios vyšnios mikroūgliuose, auginamuose *in vitro* sąlygomis. Po keturių savaičių grūdinimo laikotarpio daugiausia pagausėjo trešnės 42 kDa ir 51 kDa molekulinės masės baltymų ir vyšnios 51 kDa baltymo. Galbūt šie baltymai yra analogiški panašios molekulinės masės dehidrinams, identifikuotiems kituose augaluose. Nustatyta, kad trešnės 51 kDa baltymo kiekis nuosekliai didėja per keturias grūdinimo savaites, o 42 kDa baltymo kiekis padidėjo tik po keturių savaičių. Paprastosios vyšnios mikroūgliuose po dviejų savaičių grūdinimo padidėjo tik 51 kDa baltymo kiekis. Kiekybinė termostabilių baltymų raiškos analizė atskleidė skirtingų genotipų adaptacijos žemoje temperatūroje dėsningumus. Tai yra naudingas metodas mikroūglių saugojimo *in vitro* sąlygoms optimizuoti.

Reikšminiai žodžiai: atsparumas šalčiui, *Prunus avium*, *Prunus cerasus*, dehidrinas, genų raiška.

Įvadas. Trešnė (*Prunus avium* L.) ir paprastoji vyšnia (*Prunus cerasus* L.) yra ekonomiškai reikšmingi kaulavaisiai augalai šiaurinėse Europos ir Kanados srityse. Šaltą žiemą šie vaismedžiai yra pažeidžiami šalčio. Kai kurių veislių žiediniai pumpurai žiemą pašąla, dažnai šalnos pažeidžia žiedus ir vaisių užuomazgas (Mathers, 2004; Mathers, 2004). Todėl pasaulyje ir Lietuvoje yra vykdomos šalčiui atsparių vyšnių ir trešnių selekcijos programos (Lukosevicius, 1995). Selekcijos darbui atlikti reikalingos žinios apie augalų užsigrūdinimą, apie atsparumą šalčiui lemiančius veiksnius ir juos kontroliuojančius genus.

Sumedėję vidurinės klimato juostos augalai prieš žiemą užsigrūdina. Šio proceso metu vyksta genų raiškos pakitimai, užtikrinantys audinių atsparumą žemos temperatūros poveikiui (apžvalga (Wisniewski, 2003)). Trumpos dienos fotoperiodas ir žema temperatūra daugelyje augalų aktyvuoja transkripcijos faktorių CBF, kuris reguliuoja

su atsparumu šalčiui susijusių genų, taip pat ir dehidrinų, raišką (Thomashow, 2001; Owens, 2002). Dehidrinai yra augalams būdingi baltymai, kurių kaupimąsi audiniuose sąlygoja su ląstelių dehidratacija susijęs stresas, sukeliamas šalčio, sausros arba didelės druskų koncentracijos (Close, 1996). Manoma, kad šių baltymų funkcija yra apsaugoti ląstelės struktūrinį vientisumą – ląstelių membranų ir makromolekulių struktūrą – nuo streso sukiamų pažeidimų.

Užgrūdinto persiko (*Prunus persica*) žievėje identifikuoti du dehidrinai – 50 ir 60 kDa molekulinės masės baltymai (Arora, Wisniewski, 1994; Artlip, 1997; Wisniewski, 2006). Dehidrinų genų raiška tirta *Prunus mume* pumpuruose ir atskleistas ryšys tarp 65 kDa baltymo kiekio ir skirtingų genotipų atsparumo šalčiui (Yamane, 2006). Tačiau literatūroje nėra duomenų apie trešnės ir paprastosios vyšnios dehidrinus. Nėra tirta žemos temperatūros įtaka dehidrinų raiškai *Prunus* genties augaluose *in vitro* sąlygomis.

Žinios apie augalų atsparumą stresui žemoje temperatūroje turi ypač didelės reikšmės panaudojant *in vitro* metodus genų ištekliams saugoti. Vegetatyviškai dauginami augalai saugomi ilgalaikio krio-saugojimo sąlygomis arba vidutinio ilgio laikotarpį mikroūgliai saugomi *in vitro* augimą slopinančiomis sąlygomis (Shibli, 2006; Shatnawi, 2007). Dažniausiai mikroūglių augimui slopinti naudojama žema temperatūra. Augalai nevienodai atsparūs žemoms temperatūroms ir užšalimui – tai priklauso nuo genotipo, todėl *in vitro* saugojimo metodams parinkti yra reikalingos priemonės, leidžiančios įvertinti skirtingų genotipų atsparumo šalčiui ypatumus.

Darbo tikslas – įvertinti inkubavimo žemoje temperatūroje *in vitro* sąlygomis įtaką termostabilių baltymų frakcijos raiškai trešnės ir paprastosios vyšnios mikroūgliuose.

Tyrimo objektas, metodai ir sąlygos. Tyrimui naudoti trešnės veislės ‘Merchant’ ir paprastosios vyšnios veislės ‘Molodeznaja’ mikroūgliai. Jie auginti *in vitro* sąlygomis ant MS terpės (Murashige, Skoog, 1962) su 0,75 mg · l⁻¹ benzil-amino purino, 3,0 % sacharozės, 0,8 % agarą. Po persodinimo ūgliai auginti 10 dienų 22 ± 3 °C temperatūroje, naudojant 50–150 μmol·m⁻²·s⁻¹ intensyvumo apšvietimą fluorescencinėmis lempomis 16/8 valandų dienos/nakties fotoperiodu. Tuomet ūgliai grūdinti dvi ir keturias savaites 4 ± 1 °C temperatūroje, naudojant 25–50 μmol·m⁻²·s⁻¹ intensyvumo apšvietimą 16/8 valandų dienos/nakties fotoperiodu. Kontroliniai mikroūgliai grūdinti nebuvo.

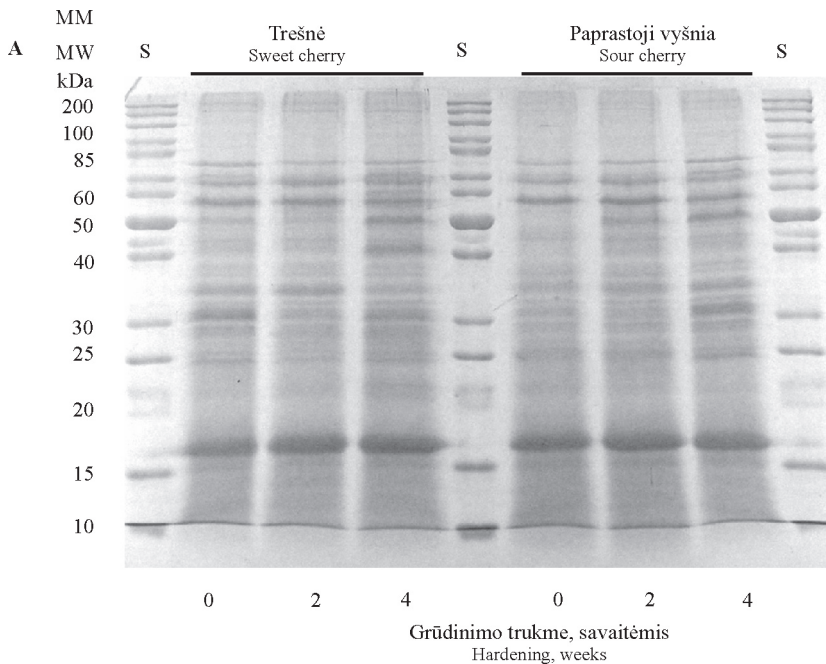
Termostabilių baltymų frakcija išskirta taikant modifikuotą metodą pagal Dhanaraj (Dhanaraj, 2005). Audiniai homogenizuoti 2 ml·g⁻¹ žalios masės ekstrakcijos tirpalo (30 mM Tris-HCl, pH–8,5, 25 mM ditiotreitolas, 1 mM fenil-metil-sulfonil-floridas, 5 mM benzamidinas, 5 mM ε-amino-karproinė rūgštis, 5 % polivinil-polipirolidonas) homogenizatoriumi MM400 (Retsch Ltd.). Ekstraktas centrifuguotas 16 000 × g, 20 min. Supernatantas perkeltas į naują mėgintuvėlį ir kaitintas verdančiame vandenyje 10 min, tuomet centrifuguotas 16 000 × g, 20 min. Supernatantas sumaišytas su trimis tūriais šalto acetono ir inkubuotas -20 °C temperatūroje per naktį. Baltymų precipitatas išskirtas centrifuguojant 16 000 × g, 30 min, tuomet išdžiovintas ore. Baltymo koncentracija įvertinta Bradford metodu (Bradford, 1976) panaudojant RotiQuant reagentą (Karl-Roth Ltd.). Baltymai buvo ištirpinti Laemmli elektroforezės pavyzdžių tirpale ir 15 μg baltymo frakcionuota 12 % poliakrilamido gelyje denatūruojančios

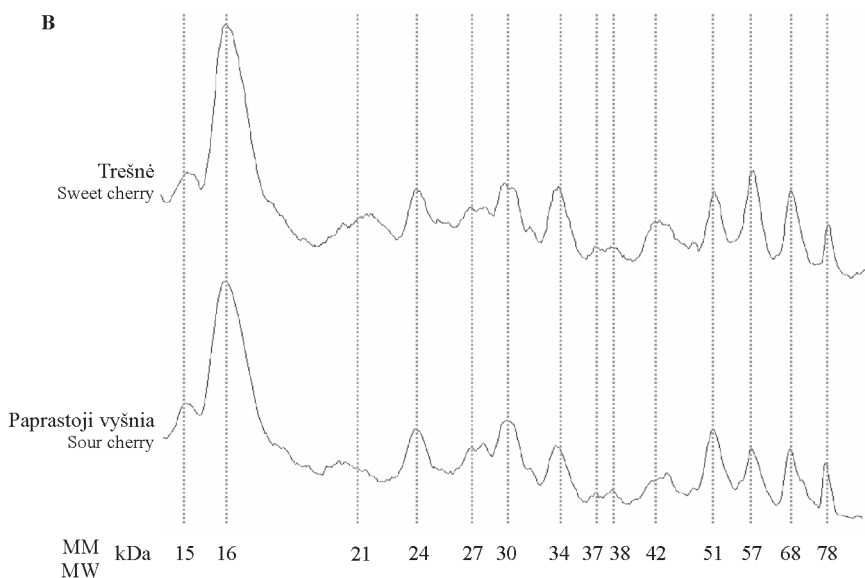
elektroforezės metodu (Laemmli, 1970) panaudojant Protean Mini sistemą (BioRad Ltd.). Molekulinei masei nustatyti taikytas PageRuler Unstained Protein Ladder standartas (UAB „Fermentas“). Gelis dažytas Kumasi briliantinio mėlio G-250 dažikliu.

Gelių densitometrinei analizei atlikti naudota programa „ImageJA“ v. 1. 42. Nustatytas smailių plotas ir įvertintas santykinis baltymo kiekis – procentinė baltymo kiekio dalis nuo bendro vertintų baltymų kiekio. Vidurkis ir standartinė vidurkio paklaida apskaičiuota naudojant ne mažiau kaip keturis matavimų pakartojimus iš dviejų nepriklausomų eksperimentų.

Rezultatai. Dehidrinai yra labai hidrofiliški ir termostabilūs baltymai (Close, 1989), todėl dažnai jų genų raiškos analizei atlikti yra naudojamos termostabilių baltymų frakcijos (Dhanaraj, 2005; Bakalova, 2008). Panaudojant elektroforezę frakcionuojant trešnės ir paprastosios vyšnios mikroūglių termostabilius baltymus buvo įvertinti keturiolikos būdingų baltymų kiekio pakitimai po dviejų ir keturių savaičių grūdinimo (1 pav.). Didžiausią termostabilių baltymų frakcijos dalį sudarė 16 kDa molekulinės masės baltymas – apytiksliai 35 % visų analizuotų termostabilių baltymų kiekio trešnės ir 40–44 % – vyšnios pavyzdžiuose (2 pav.). Kitų tirtų baltymų santykinis kiekis buvo nuo 0,4 iki 10,4 % bendro tirtų termostabilių baltymų kiekio.

Lyginant su kontrolės mikroūgliais, grūdintos trešnės mikroūglių termostabilių baltymų frakcijoje nustatyti septynių baltymų kiekio pakitimai (2A pav). Po dviejų savaičių grūdinimo padidėjo 51 ir 57 kDa baltymų ir sumažėjo 27 ir 30 kDa baltymų kiekis. Be šių baltymų, po keturių savaičių grūdinimo reikšmingai padidėjo 42 kDa baltymo ir sumažėjo 34 ir 37 kDa baltymų kiekis.



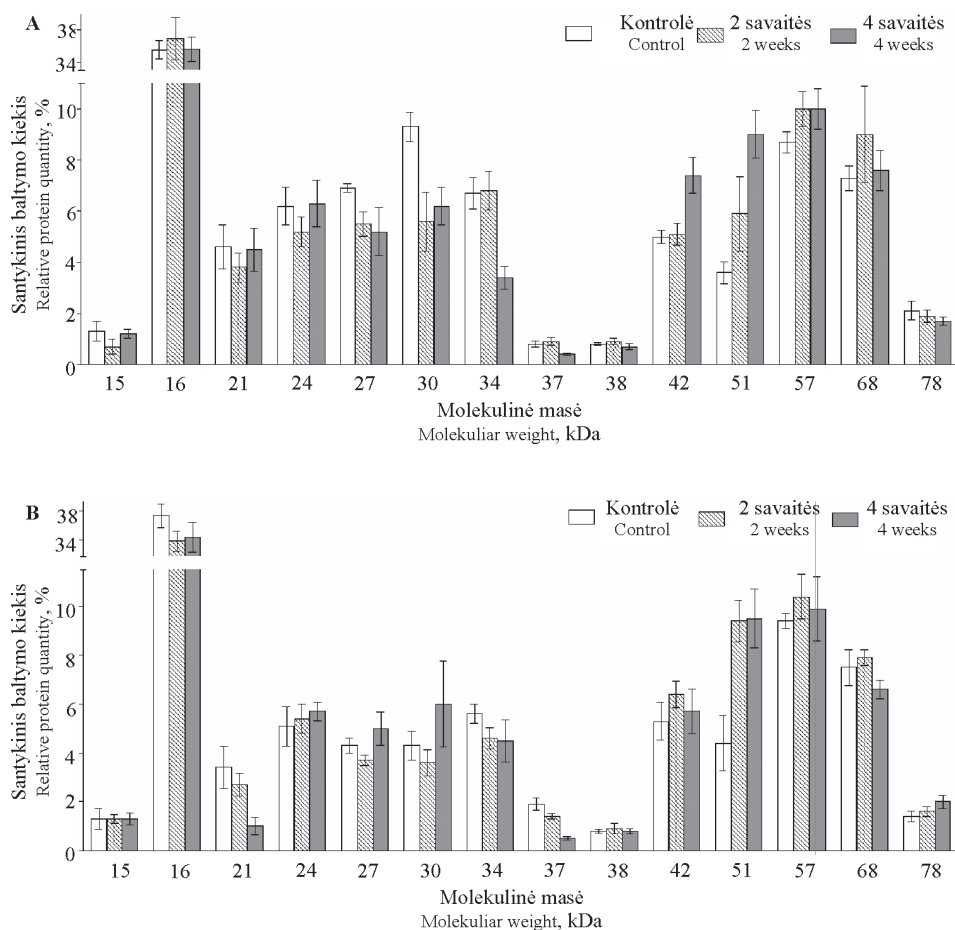


1 pav. Trešinės ir paprastosios vyšnios mikroūglių termostabilių baltymų frakcijos analizė elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje metodu. Termostabilių baltymų elektroferograma (A) ir būdingos densitometrinės kreivės (B). Brūkšnine linija pažymėtos smailės naudotos baltymų kiekio analizei atlikti. MM – molekulinė masė, S – molekulinės masės standartas.

Fig. 1. Electrophoresis of thermostable protein fraction of sweet and sour cherry. Electropherogram of thermostable protein fraction (A) and typical results of densitometry analysis (B). Peaks labeled with dashed line were used for quantitative protein analysis. MW – molecular weight, S – molecular weight standard.

Vyšnios augalų termostabilių baltymų frakcijoje grūdinimo metu reikšmingai pakito keturių baltymų kiekis (2B pav.). Po dviejų savaičių grūdinimo padidėjo 51 kDa baltymo kiekis, o 34 ir 37 kDa baltymų kiekis sumažėjo. Po keturių savaičių grūdinimo padidėjo 51 kDa baltymo ir sumažėjo 21 ir 37 kDa baltymų kiekis.

Aptarimas. Sumedėjusių augalų užsigrūdinimas yra sudėtingas procesas. Jį sąlygoja kompleksinė žemos temperatūros ir trumpos dienos poveikio sąveika. Sumedėjusiems augalams būdingi sezoniniai dehidrinus koduojančių genų raiškos pokyčiai. Nustatyta, kad dehidrinų kaupimasis ląstelėje tiesiogiai susijęs su atsparumu šalčiui (Wisniewski, 1996; Sauter, 1999; Wisniewski, Arora, 2000). Vienu dehidrinų raiškai yra svarbus trumpos dienos fotoperiodo poveikis, kitų dehidrinų raiškos indukcijai yra svarbesnis žemos temperatūros poveikis (Welling, 2004; Wisniewski, 2006). Nustatyta, kad persiko 60 kDa molekulinės masės dehidriną koduojančio geno PpDhn1 raiškos indukcijai yra pakankamas žemos temperatūros poveikis ir raiška nepriklauso nuo fotoperiodo (Wisniewski, 2006). Taip pat nustatyta, kad žemoje temperatūroje 65 kDa dehidrino kiekis *Prunus mume* augaluose padidėja (Yamane, 2006). Šiuo darbu buvo tirta žemos temperatūros įtaka termostabilių baltymų raiškai trešinės ir paprastosios vyšnios augaluose *in vitro* sąlygomis.



2 pav. Termostabilių baltymų kiekio pakitimai trešnės (A) ir paprastosios vyšnios (B) mikroūgliuose grūdinimo metu. Pateiktas santykinio kiekio vidurkis ir standartinė vidurkio paklaida gauti panaudojant ne mažiau kaip keturis pakartojimus iš dviejų nepriklausomų eksperimentų.

Fig. 2. Variation of thermostable protein quantity in sweet (A) and sour cherry (B) during cold hardening. Data presented as mean and standard error of the mean represents more than four repetitions from two separate experiments.

Didžiausias raiškos padidėjimas po keturių savaičių grūdinimo laikotarpio būdingas trešnės 42 kDa (nuo $5,0 \pm 0,26$ iki $7,4 \pm 0,71$ % bendro tirtų baltymų kiekio) ir 51 kDa (nuo $3,6 \pm 0,43$ iki $9,0 \pm 0,93$ %) baltymams ir vyšnios 51 kDa (nuo $4,4 \pm 1,12$ iki $9,6 \pm 1,21$ %) baltymui (2 pav.). Galbūt šie baltymai yra analogiški panašios molekulinės masės dehidrinams, identifikuotiems kituose augaluose: *P. persica* 50 kDa (Artlip, 1997; Wisniewski, 2006) ir 60 kDa (Arora, Wisniewski, 1994), *P. mume* 65 kDa (Yamane, 2006) ir *A. thaliana* COR47 (Nylander, 2001).

Termostabilių baltymų frakcijose gausiausio 16 kDa baltymo kiekis po

keturių savaičių grūdinimo reikšmingai nepakito nei trešnės, nei paprastosios vyšnios mikroūgliuose. Tačiau reikia pažymėti, kad vienaskilčiams ir dviskilčiams augalams yra būdingas analogiškos molekulinės masės dehidrinas Dsp16, kurio didelis kiekis kaupiasi veikiant abszcizinei rūgščiai arba dėl ankstyvame etape dehidrataciją sukėliantio streso, taip pat ir žemos temperatūros sukeliama streso (Piatkowski, 1990; Schneider, 1993; Close, 1993). Tyrimu nustatyta didelė pastovi ši baltymo koduojančio geno raiška trešnės ir paprastosios vyšnios mikroūgliuose galbūt yra auginimo *in vitro* sąlygomis sukeliama streso pasekmė ir inkubavimas žemoje temperatūroje papildomo poveikio neturi.

Neaiški kitų termostabilių baltymų, kurių kiekis nepakito arba sumažėjo grūdinimo metu, reikšmė mikroūglių atsparumui šalčiui. Nustatyta, kad kai kurių augalams būdingų dehidrinų aktyvumas reguliuojamas ne genų raiškos lygmeniu, bet modifikuojant po transliacijos, t. y. prijungiamos glikozilo arba fosfato grupės (Vilardell, 1990; Levi, 1999). Tokios modifikacijos nekeičia baltymo kiekio ląstelėje, todėl jų reikšmei įvertinti reikalingos papildomos priemonės, nustatančios baltymų modifikacijas, lokalizaciją ar funkcinį aktyvumą.

Vegetatyviniu būdu dauginamų augalų genetiniams ištekliams saugoti svarbios *in vitro* technologijos (Shibli, 2006; Shatnawi, 2007). Kai saugojimo trukmė vidutinė, mikroūgliai dažnai auginami žemoje temperatūroje. Tokiomis sąlygomis sulėtėja jų augimas, todėl žemoje temperatūroje mikroūgliai gali būti laikomi nuo keleto iki keliasdešimties mėnesių. Augalų gyvybingumas ilgalaikio saugojimo metu priklauso nuo genotipo (Kovalchuk, 2009), t. y. augalui būdingo atsparumo žemoms temperatūroms ir sugebėjimo užsigrūdinti. Iki šiol dehidrinų raiška žemoje temperatūroje *in vitro* sąlygomis auginamuose *Prunus* genties augalų mikroūgliuose nebuvo tirta. Šis tyrimas parodė, kad žemoje temperatūroje mikroūgliuose yra aktyvuojama dehidrinų raiška, t. y. indukuojami adaptacijos mechanizmai, kurie didina atsparumą streso veiksniams. Taip pat tyrimas atskleidė genų raiškos kinetikos ypatumus, būdingus skirtingoms *Prunus* rūšims. Trešnės 51 kDa baltymo kiekis nuosekliai didėjo per keturias grūdinimo savaites, 57 kDa baltymo kiekis padidėjo po dviejų savaičių ir toliau nekito, o 42 kDa baltymo kiekis padidėjo tik po keturių savaičių (2A pav.). Paprastosios vyšnios mikroūgliuose po dviejų savaičių grūdinimo nustatytas tik 51 kDa baltymo kiekio padidėjimas, o 42 ir 57 kDa baltymų kiekis nepakito (2B pav.). Šie rezultatai rodo, kad termostabilių baltymų frakcijos kiekybinė analizė leidžia įvertinti atskiriems genotipams būdingą užsigrūdinimo proceso eigą ir efektyvumą. Tai yra naudingas metodas nustatant optimalias mikroūglių saugojimo *in vitro* sąlygas.

Išvados. 1. Kiekybinė termostabilių baltymų frakcijos analizė parodė, kad po keturių savaičių grūdinimo *in vitro* sąlygomis laikotarpio mikroūgliuose daugiausia pagausėjo trešnės 42 kDa ir 51 kDa baltymų ir paprastosios vyšnios 51 kDa baltymo.

2. Tirtiems baltymams būdinga skirtinga kiekio kitimo kinetika grūdinimo metu. Nustatyta, kad trešnės 51 kDa baltymo raiška nuosekliai didėjo per keturias grūdinimo savaites, o 42 kDa baltymo kiekis padidėjo tik po keturių savaičių. Paprastosios vyšnios mikroūgliuose po dviejų savaičių grūdinimo padaugėjo tik 51 kDa baltymo. Tokie baltymų kaupimosi dėsniniai atspindi skirtingų genotipų grūdinimo ypatumus ir gali būti panaudoti augalo užsigrūdinimo efektyvumui kiekybiškai charakterizuoti.

Literatūra

1. Arora R., Wisniewski M. E. 1994. Cold-acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus-persica* (L.) Batsch). 2. A 60-kilodalton bark protein in cold-acclimated tissues of peach is heat-stable and related to the dehydrin family of proteins. *Plant Physiology*, 105(1): 95–101.
2. Artlip T. S., Callahan A. M., Bassett C. L., Wisniewski M. E. 1997. Seasonal expression of a dehydrin gene in sibling deciduous and evergreen genotypes of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Plant Molecular Biology*, 33(1): 61–70.
3. Bakalova S., Nedeva D., McKee J. 2008. Protein profiles in wheat seedlings subjected to dehydration stress. *Applied Ecology and Environmental Research*, 6(2): 37–48.
4. Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
5. Close T. J. 1996. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*, 97(4): 795–803.
6. Close T. J., Fenton R. D., Yang A., Asghar R., DeMason D. A., Crone D. E., Meyer N. C., Moonan F. 1993. Dehydrin: the protein. In: T. J. Close, E. A. Bray (eds.), *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 104–118.
7. Close T. J., Kortt A. A., Chandler P. M. 1989. A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Molecular Biology*, 13(1): 95–108.
8. Dhanaraj A. L., Slovin J. P., Rowland L. J. 2005. Isolation of a cDNA clone and characterization of expression of the highly abundant, cold acclimation-associated 14 kDa dehydrin of blueberry. *Plant Science*, 168(4): 949–957.
9. Yamane H., Kashiwa Y., Kakehi E., Yonemori K., Mori H., Hayashi K., Iwamoto K., Tao R., Kataoka I. 2006. Differential expression of dehydrin in flower buds of two Japanese apricot cultivars requiring different chilling requirements for bud break. *Tree Physiology*, 26(12): 1 559–1 563.
10. Kovalchuk I., Lyudvikova Y., Volgina M., Reed B. M. 2009. Medium, container and genotype all influence *in vitro* cold storage of apple germplasm. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 96(2): 127–136.
11. Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
12. Levi A., Panta G. R., Parmentier C. M., Muthalif M. M., Arora R., Shanker S., Rowland L. J. 1999. Complementary DNA cloning, sequencing and expression of an unusual dehydrin from blueberry floral buds. *Physiologia Plantarum*, 107(1): 98–109.

13. Lukosevicius A. 1995. Stone fruit breeding in Lithuania. *Fruit Varieties Journal*, 49(1): 19–21.
14. Mathers H. M. 2004. Supercooling and cold hardiness in sour cherry germplasm: Flower buds. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(5): 675–681.
15. Mathers H. M. 2004. Supercooling and cold hardiness in sour cherry germplasm: Vegetative tissue. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(5): 682–689.
16. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497.
17. Nylander M., Svensson J., Palva E. T., Welin B. V. 2001. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 45(3): 263–279.
18. Owens C. L., Thomashow M. F., Jancock J. F., Iezzoni A. F. 2002. *CBF1* orthologs in sour cherry and strawberry and the heterologous expression of *CBF1* in strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127: 489–494.
19. Piatkowski D., Schneider K., Salamini F., Bartels D. 1990. Characterization of five abscisic acid-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Cratogeomys plantagineum* and their relationship to other water stress genes. *Plant Physiology*, 94: 1 682–1 688.
20. Sauter J. J., Westphal S., Wisniewski M. 1999. Immunological identification of dehydrin-related proteins in the wood of five species of *Populus* and in *Salix caprea* L. *Journal of Plant Physiology*, 154(5–6): 781–788.
21. Schneider K., Wells B., Schmelzer E., Salamini F., Bartels D. 1993. Desiccation leads to the rapid accumulation of both cytosolic and chloroplastic proteins in the resurrection plant *Cratogeomys-plantagineum* Hochst. *Planta*, 189(1): 120–131.
22. Shatnawi M. A., Shibli R., Qrunfleh I., Bataineh K., Obeidat M. 2007. *In vitro* propagation and cryopreservation of *Prunus avium* using vitrification and encapsulation dehydration methods. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 5(2): 204–208.
23. Shibli R. A., Shatnawi M. A., Subath W. S., Ajlouni M. M. 2006. *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A review. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2(4): 372–382.
24. Thomashow M. F., Gilmour S. J., Stockinger E. J., Jaglo-Ottosen K. R., Zarka D. G. 2001. Role of the Arabidopsis CBF transcriptional activators in cold acclimation. *Physiologia Plantarum*, 112(2): 171–175.
25. Vilardell J., Goday A., Freire M. A., Torrent M., Martinez M. C., Torne J. M., Pages M. 1990. Gene sequence, developmental expression, and protein-phosphorylation of Rab-17 in maize. *Plant Molecular Biology*, 14(3): 423–432.
26. Welling A., Rinne P., Vihera-Aarnio A., Kontunen-Soppela S., Heino P., Palva E. T. 2004. Photoperiod and temperature differentially regulate the expression of two dehydrin genes during overwintering of birch (*Betula pubescens* Ehrh.). *Journal of Experimental Botany*, 55(396): 507–516.

27. Wisniewski M. E., Arora R. 2000. Structural and biochemical aspects of cold hardiness in woody plants. In: S. Mohan Jain, S. C. Minocha (eds.), *Molecular Biology of Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers, New York, 419–437.
28. Wisniewski M., Bassett C., Gusta L. V. 2003. An overview of cold hardiness in woody plants: Seeing the forest through the trees. *HortScience*, 38(5): 952–959.
29. Wisniewski M. E., Bassett C. L., Renaut J., Farrell R., Tworzoskii T., Artlip T. S. 2006. Differential regulation of two dehydrin genes from peach (*Prunus persica*) by photoperiod, low temperature and water deficit. *Tree Physiology*, 26(5): 575–584.
30. Wisniewski M., Close T. J., Artlip T., Arora R. 1996. Seasonal patterns of dehydrins and 70-kDa heat-shock proteins in bark tissues of eight species of woody plants. *Physiologia Plantarum*, 96(3): 496–505.

SODININKYSTĖ IR DARŽININKYSTĖ. SCIENTIFIC ARTICLES. 2009. 28(4).

Thermostable protein expression during hardening of sweet and sour cherry microshoots *in vitro*

V. Lukoševičiūtė, R. Rugienius, G. Stanienė, V. Stanys, D. Baniulis

Summary

Breeding of cold resistant sweet (*Prunus avium* L.) and sour cherry (*Prunus cerasus* L.) cultivars and development of *in vitro* storage methods for preservation of genetic resources requires knowledge of cold hardening processes in plants. Seasonal changes of dehydrin expression are characteristic to woody plants, and accumulation of dehydrins is linked to cold resistance. This short note presents results of low temperature induced changes of thermostable protein expression analysis in sweet and sour cherry microshoots grown *in vitro*. The largest increase in relative protein quantity was observed for 42 kDa and 51 kDa molecular weight proteins in sweet cherry and 51 kDa protein in sour cherry after four weeks of hardening. It is likely that the identified proteins are analogues of similar molecular weight dehydrins identified in plants. An expression of the 51 kDa protein gradually increased in sweet cherry microshoots during four week hardening, while change in the 42 kDa protein quantity was observed only after four weeks. An increase in 51 kDa protein expression was observed only after two weeks of hardening in sour cherry. The described quantitative analysis of dehydrin expression reveal low temperature adaptation features characteristic to different genotypes and demonstrate potential use of the technique in optimisation of *in vitro* microshoot storage methods.

Key words: cold hardiness, sour cherry, sweet cherry, dehydrin, gene expression.