

Veiksniai, lemiantys žieminio rapso (*Brassica napus* L.) ūglių atsparumą šalčiui *in vitro*

Remigijus Peleckis,

Natalija Burbulis,

Aušra Blinstrubienė,

Vaida Jonytienė

Aleksandro Stulginskio universitetas,
Studentų g. 11,
LT-53361 Akademija, Kauno r.
El. paštas natalija.burbulis@asu.lt

Tyrimai atlikti Aleksandro Stulginskio universiteto Biologijos ir augalų biotechnologijos institute ir Jungtinio tyrimų centro Agrobiotechnologijos laboratorijoje. Tirtas veislės, grūdinimo trukmės ir egzogeninės L-glutamato rūgšties poveikis elektrolitų laidumo pokyčių dinamikai žieminio rapso ūgliuose. Ūgliai auginti Murashige ir Skoog (MS) maitinamojoje terpėje, papildytoje 0, 1, 2, 3 ir 4 mM l⁻¹ L-glutamato rūgšties. Ūglių atsparumas šalčiui įvertintas nustatant lapų audinių, šaldytų 24 val. –8 °C temperatūroje, elektrolitų laidumą. Nustatyta, kad egzogeninės L-glutamato rūgšties priedas maitinamojoje terpėje skatino endogeninio prolino sintezę tirtų žieminio rapso veislių ne-grūdintuose ir grūdintuose ūgliuose. Žieminio rapso ūglių atsparumą šalčiui *in vitro* sąlygomis labiausiai padidino sinerginis L-glutamato rūgšties ir grūdinimo poveikis. Nepriklausomai nuo grūdinimo trukmės ir L-glutamato rūgšties koncentracijos maitinamojoje terpėje, atspariausi šalčiui buvo veislės 'SY Kolumb' ūgliai.

Raktažodžiai: elektrolitų laidumas, endogeninis prolino, L-glutamato rūgštis, šaltis, žieminis rapsas

ĮVADAS

Mokslininkai teigia, kad žema temperatūra – vienas pagrindinių veiksnių, lemiančių augalų geografinį paplitimą (Jan et al., 2009). Dėl žemos temperatūros poveikio augalų audinių tarpląstelinėje erdvėje ir ląstelių sienelių audiniuose formuojasi ledas, nes tarpląstelinio skysčio užšalimo taškas yra aukštesnis nei citoplazmos. Dėl ledo, besiformuojančio tarpląstelinėje erdvėje, pakinta osmosinis potencialas, įvyksta ląstelių dehidratacija (Sinha et al., 2015). Be to, žema temperatūra skatina aktyviųjų deguonies junginių, tarp jų ir vandenilio peroksido (H₂O₂), superoksido (O₂⁻) ir laisvųjų radikalų (HO·) sintezę (Halliwell, 2007; Renaut et al., 2008; Chinnusamy et al., 2010). Padidėjęs šių junginių kiekis sukelia membranų komponentų oksidacinius procesus ir antros fotosintezės sistemos pažeidimus (Suzuki, Mittler,

2006). Dėl įvairių biotinių ir abiotinių stresų poveikio daugelyje augalų suintensyvėja prolino sintezė bei slopinamas jo katabolizmas (Kavi Kishor et al., 2005; Less, Galili, 2008; Kumar et al., 2010; Hildebrandt et al., 2015). Didesnis prolino kiekis šalčiui atspariuose augaluose įrodo, kad ši aminorūgštis dalyvauja užsigrūdinimo procese. Egzogeninis prolino padidina šalčiui jautrių genotipų ląstelių membranų stabilumą ir sumažina elektrolitų laidumą. Manoma, kad prolino veikia kaip organinis katijonas, reikalingas citozoliniam rūgštingumui ir membranų vientisumui palaikyti (Kaur et al., 2011; Janmohammadi, 2012). Nustatyta, kad dėl egzogeninio prolino poveikio augaluose sumažėja streso metu sintetinamų aktyviųjų deguonies junginių, todėl teigiama, kad ši aminorūgštis stimuliuoja antioksidantų veiklą (Hong et al., 2000; Hayat et al., 2012). Mokslininkai teigia, kad prolino indukuoja daugelio genų,

kurių promotoriai turi ACTCAT seką, ekspresiją (Yadav, 2010).

Augaluose prolino gali būti sintetinis iš glutamato arba ornitino, tačiau moksliniais tyrimais įrodyta, kad pagrindinis pirmtakas jo sintezei yra glutamo rūgštis (Szekely et al., 2008; Sharma, Verslues, 2010). Prolino biosintezė vyksta citoplazmoje arba chloroplastuose, dalyvaujant Δ^1 -pirolino-5-karboksilato sintetazei ir Δ^1 -pirolino-5-karboksilato reduktazei. Tuo tarpu mitochondrijose prolino dehidrogenazė arba prolino oksidazė ir Δ^1 -pirolino-5-karboksilato dehidrogenazė katalizuoja glutamato sintezę iš prolino (Verslues, Sharma, 2010).

Ląstelių membranų vientisumui nustatyti taikomas elektrolitų nuotėkio matavimas. Dėl įvairių stresorių poveikio augalų ląstelių membranos praranda selektyvų pralaidumą ir pajėgumą išlaikyti ląstelėje esančius junginius. Todėl elektrolitų laidumo pokytis naudojamas vertinant augalų atsparumą šalčiui (Campos et al., 2003; Dai et al., 2007).

Tyrimų tikslas – įvertinti L-glutamato rūgšties poveikį žieminio rapso ūglių atsparumui šalčiui *in vitro* sąlygomis.

TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS

Tyrimai atlikti ASU Biologijos ir augalų biotechnologijos institute ir JTC Agrobiotechnologijos laboratorijoje. Žieminio rapso veislių 'Cult', 'Sherlock' ir 'SY Kolumb' sėklos nuplaautos tekančiu vandeniu, 5 min. sterilizuotos 70 % etanolio vandeniniame tirpale, 10 min. 10 % natrio hipochlorito vandeniniame tirpale ir tris kartus perplautos steriliu distiliuotu vandeniu. Sterilios sėklos daigintos Murashige ir Skoog (MS) (Murashige, Skoog, 1962) maitinamojoje terpėje be augimo reguliatorių, papildytoje 10,0 g l⁻¹ sacharozės ir 8,0 g l⁻¹ agaru. Terpės pH – 5,5. Sėklos daigintos esant 25/18 °C (dieną / naktį) temperatūrai, 16/8 val. (dieną / naktį) fotoperiodui ir 50 μmol m⁻² s⁻¹ apšviestumui. Izoliuoti epikotiliai perkelti ant MS maitinamosios terpės, papildytos 1, 2, 3 ir 4 mM l⁻¹ L-glutamato rūgšties. Lapų formavimosi tarpsniu (kodas 1,05–1,07) ūgliai grūdinti 7, 14, 21 ir 28 dienas esant 4 °C temperatūrai, 16/8 val. (dieną / naktį) fotoperiodui ir 50 μmol m⁻² s⁻¹ apšviestumui. Ūglių atsparumas įvertintas nustatant lapų audinių, šaldytų 24 val. –8 °C temperatūroje, elektrolitų laidumą.

Prolino kiekis nustatytas taikant modifikuotą ninhydrino metodą (McClinchey, Kott, 2008). Iš augalų paimti aštuoni 7 mm skersmens lapo diskai, pasverti ir įdėti į mėgintuvėlį. Užpilami 2 ml distiliuoto vandens ir verdami vandens vonelėje 30 min., tada atvėsunami iki kambario temperatūros. Naujame mėgintuvėlyje sumaišoma 100 μl mėginio, 400 μl distiliuoto vandens ir 1 ml ninhydrino. Paruošiami du 1 mM L-prolino tirpalo standartai. Šie tirpalai verdami vandens vonelėje 20 min. ir atvėsunami ant ledo. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama 3 ml tolueno ir gerai suplakama. Mėgintuvėliai laikomi tamsoje 2 h, susiformavęs chromoforas įpilamas į kvarco kiuvetę, absorbcija matuojama bangos ilgiui esant 520 nm spektrofotometru *Spectro UV-VIS Dual beam* (Labomed, Inc).

Prolino kiekis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$P = \frac{\left(\frac{a}{0,2164}\right) \times 2}{m};$$

a – absorbcija esant bangos ilgiui 520 nm; m – augalinės medžiagos masė g; P – prolino kiekis μM g⁻¹.

Elektrolitų laidumas nustatytas pagal F. Dai su bendraautorais (2007) sudarytą metodiką. Išpjauti 1 cm² lapo audiniai patalpinami mėgintuvėliuose ir dedami į programuojamą šaldiklį, temperatūra žeminama po 0,5 °C h⁻¹ greičiu. Pavyzdžiai apipurškiami dejonizuotu vandeniu, šaldomi tyrime numatytoje temperatūroje, ekspozicijos laikas 2 h. Temperatūra didinama iki 0 °C po 0,5 °C h⁻¹ greičiu. Diskai užpilami 30 ml dejonizuoto vandens ir padedami ant purtyklės 24 h. Tirpalo laidumas matuotas konduktometru *CyberScan PC 6000* (Eutech Instruments) prieš ir po autoklavavimo.

Procentinis elektrolitų laidumas apskaičiuotas pagal formulę:

$$el = \left(\frac{EL}{AUT}\right) \times 100;$$

el – elektrolitų laidumas %; EL – augalinės ištraukos elektrolitų laidumas prieš autoklavavimą; AUT – augalinės ištraukos elektrolitų laidumas po 15 min. autoklavavimo 121 °C temperatūroje.

Tyrimo duomenų statistinė analizė atlikta naudojantis kompiuterinėmis programomis iš programų paketo SELEKCIJA (Tarakanovas, Raudonius, 2003). Vidurkiai ir standartinė paklaida apskaičiuoti STAT_ENG programa. Duomenys, išreikšti procentais, transformuoti per kvadratinės šaknies arksinusą. Įvairių veiksnių (veislės, grūdinimo trukmės ir L-glutamato rūgšties koncentracijos) ir jų sąveikos poveikis įvertintas trijų veiksnių dispersine analize naudojant Tukey's HSD testą.

TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

L-glutamato rūgšties koncentracijos ir grūdinimo trukmės poveikis prolino kiekio dinamikai pateiktas 1 lentelėje.

Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad dėl žemos teigiamos temperatūros poveikio (grūdinimo metu) daugelio augalų rūšių ląstelėse aktyvėja

įvairių junginių, tarp jų ir endogeninio prolino sintezė (Kavi Kishor et al., 2005; Kaur et al., 2011; Hayat et al., 2012). Įvertinus grūdinimo poveikį prolino kiekiui žieminio rapso ūgliuose nustatyta, kad ilginant grūdinimo trukmę nuo 0 iki 28 dienų prolino kiekis padidėjo 7,70 karto ('SY Kolumb'), 8,43 karto ('Sherlock') ir 8,10 karto ('Cult'). Tyrimais nustatyta, kad endogeninio prolino pokyčio dinamiką lemia ir egzogeninės L-glutamato rūgšties priedas maitinamojoje terpėje. Negrūdintuose ūgliuose dėl L-glutamato rūgšties poveikio prolino kiekis padidėjo 1,92 karto ('SY Kolumb'), 2,28 karto ('Sherlock') ir 1,92 karto ('Cult'), po 28 grūdinimo dienų – atitinkamai 1,16; 1,34 ir 1,23 karto. Tiek negrūdintuose, tiek grūdintuose ūgliuose prolino kiekis nuosekliai didėjo didinant L-glutamato rūgšties koncentraciją maitinamojoje terpėje iki 3 mM l⁻¹, tolesnis L-glutamato rūgšties koncentracijos didinimas neturėjo esminės įtakos

1 lentelė. L-glutamato rūgšties koncentracijos ir grūdinimo trukmės poveikis prolino kiekiui (μM g⁻¹) žieminio rapso ūgliuose (tarp toje pačioje eilutėje esančių variantų vidurkių, pažymėtų ne ta pačia raide, skirtumai yra esminiai (P < 0,05))

Table 1. The effect of L-glutamic acid concentration and acclimation duration on proline content (μM g⁻¹) in shoots of winter rapeseed (means presented in the same row not sharing a common letter are significantly different (P < 0.05))

Grūdinimo trukmė Acclimation duration	L-glutamato rūgšties koncentracija Concentration of L-glutamic acid				
	0 mM l ⁻¹	1 mM l ⁻¹	2 mM l ⁻¹	3 mM l ⁻¹	4 mM l ⁻¹
‘Cult’					
0 d.	17,23 ± 0,81d	20,37 ± 0,96c	27,37 ± 1,01b	32,53 ± 1,09a	33,00 ± 1,44a
7 d.	59,43 ± 1,36d	67,80 ± 1,84c	74,73 ± 1,50b	82,53 ± 1,77a	81,70 ± 2,12a
14 d.	98,60 ± 1,82d	108,33 ± 4,95c	121,60 ± 1,44b	132,83 ± 2,00a	134,03 ± 1,50a
21 d.	125,73 ± 2,22d	138,67 ± 2,37c	149,27 ± 2,08b	162,47 ± 2,08a	163,03 ± 2,19a
28 d.	139,70 ± 2,28d	147,60 ± 2,94c	153,57 ± 2,37b	169,70 ± 2,5a	171,20 ± 2,76a
‘Sherlock’					
0 d.	14,43 ± 0,93d	19,97 ± 1,20c	25,67 ± 1,01b	32,60 ± 0,98a	32,87 ± 0,69a
7 d.	51,57 ± 1,67d	62,37 ± 1,36c	71,60 ± 1,47b	79,37 ± 1,42a	79,87 ± 2,05a
14 d.	72,53 ± 1,68d	85,80 ± 1,23c	104,50 ± 1,63b	123,67 ± 1,88a	124,53 ± 1,77a
21 d.	108,70 ± 2,37d	131,87 ± 1,90c	43,27 ± 2,08b	159,87 ± 2,09a	160,97 ± 1,98a
28 d.	121,73 ± 2,08d	132,60 ± 1,52c	148,33 ± 1,99b	163,27 ± 2,18a	163,40 ± 2,24a
‘SY Kolumb’					
0 d.	19,80 ± 1,47d	24,97 ± 1,24c	28,87 ± 1,77b	37,67 ± 1,62a	37,97 ± 1,33a
7 d.	68,13 ± 1,36d	73,50 ± 1,53c	79,13 ± 1,59b	87,87 ± 1,90a	88,53 ± 1,85a
14 d.	105,53 ± 2,40d	117,97 ± 2,05c	127,23 ± 1,94b	139,40 ± 1,88a	141,67 ± 2,43a
21 d.	137,40 ± 2,37d	149,50 ± 2,29c	158,13 ± 2,13b	168,33 ± 2,05a	169,40 ± 2,34a
28 d.	152,53 ± 2,22d	159,67 ± 2,35c	163,00 ± 2,38b	176,43 ± 2,74a	177,63 ± 2,49a

prolino kiekiui. Daugiausia prolino nustatyta veislės 'SY Kolumb' ūgliuose, augintuose maitinamojoje terpėje, papildytoje 4 mM l⁻¹ L-glutamato rūgšties po 28 grūdinimo dienų. Šiame variante veislių 'Sherlock' ir 'Cult' ūgliai prolino sukauptė atitinkamai 14,23 ir 6,43 μM g⁻¹ mažiau.

Žieminio rapsų ūglių atsparumas šalčiui (išreikštas elektrolitų laidumu) varijavo, priklausomai nuo veislės, grūdinimo trukmės ir L-glutamato rūgšties koncentracijos maitinamojoje terpėje (2 lentelė).

Grūdinant ūglius, augintus be L-glutamato rūgšties priedo maitinamojoje terpėje, elektrolitų laidumas po 28 grūdinimo dienų sumažėjo nuo 30,3 % ('SY Kolumb') iki 32,3 % ('Sherlock'), palyginti su negrūdintais ūgliais. L-glutamato rūgšties priedas maitinamojoje terpėje taip pat esmingai mažino tiek negrūdintų, tiek grūdintų žieminio rapsų ūglių elektrolitų laidumą. Tyrimais nusta-

tytas sinerginis L-glutamato rūgšties ir grūdinimo trukmės poveikis žieminio rapsų ūglių atsparumui šalčiui. Pavyzdžiui, dėl 4 mM l⁻¹ L-glutamato rūgšties ir 28 dienų grūdinimo poveikio elektrolitų laidumas sumažėjo 48,0 % ('SY Kolumb'), 48,4 % ('Sherlock') ir 47,6 % ('Cult'), palyginti su negrūdintais ūgliais, augintais maitinamojoje terpėje be L-glutamato rūgšties priedo.

Dispersinės analizės rezultatai rodo, kad esminę įtaką elektrolitų laidumui turėjo visi tiriamieji veiksniai ir jų deriniai (3 lentelė).

Įvertinus diferencijuotą tirtų veiksnių poveikį nustatyta, kad didžiausią teigiamą įtaką rapsų ūglių atsparumui (šalčiui) turėjo grūdinimo trukmė. Įvertinus veislės ir grūdinimo trukmės sąveikos dispersinės analizės rezultatus nustatyta, kad visų rapsų veislių ūglių elektrolitų laidumas labiausiai sumažėjo po 28 grūdinimo dienų. Grūdinimo trukmės ir L-glutamato rūgšties koncentracijos

2 lentelė. L-glutamato rūgšties koncentracijos ir grūdinimo trukmės poveikis elektrolitų laidumui (%) žieminių rapsų ūgliuose (tarp toje pačioje eilutėje esančių variantų vidurkių, pažymėtų ne ta pačia raide, skirtumai yra esminiai ($P < 0,05$))

Table 2. The effect of L-glutamic acid concentration and acclimation duration on electrolyte leakage (%) in shoots of winter rapeseed (means presented in the same row not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$))

Grūdinimo trukmė Acclimation duration	L-glutamato rūgšties koncentracija Concentration of L-glutamic acid				
	0 mM l ⁻¹	1 mM l ⁻¹	2 mM l ⁻¹	3 mM l ⁻¹	4 mM l ⁻¹
'Cult'					
0 d.	89,3 ± 1,41a	86,4 ± 1,39b	80,3 ± 1,30c	73,4 ± 1,26d	72,1 ± 1,16d
7 d.	78,4 ± 1,22a	77,1 ± 1,18a	71,5 ± 1,20b	68,3 ± 1,14c	64,8 ± 1,02d
14 d.	72,2 ± 0,96a	69,2 ± 1,02b	64,7 ± 1,03c	57,6 ± 0,99d	56,9 ± 0,93d
21 d.	69,7 ± 0,84a	65,7 ± 0,74b	55,6 ± 0,83c	49,9 ± 0,80d	50,6 ± 0,76d
28 d.	58,3 ± 0,80a	52,2 ± 0,77b	48,6 ± 0,77c	41,4 ± 0,72d	41,7 ± 0,70d
'Sherlock'					
0 d.	95,7 ± 1,39a	93,4 ± 1,41a	88,6 ± 1,33b	82,1 ± 1,28c	81,8 ± 1,21c
7 d.	89,3 ± 1,30a	85,5 ± 1,24b	81,9 ± 1,21c	75,6 ± 1,13d	74,9 ± 1,05d
14 d.	79,7 ± 0,99a	77,3 ± 1,28a	73,8 ± 0,98b	70,1 ± 0,99c	69,7 ± 0,92c
21 d.	74,9 ± 0,82a	72,4 ± 1,98a	67,6 ± 0,84b	61,5 ± 0,79c	60,8 ± 0,80c
28 d.	63,4 ± 0,78a	60,2 ± 1,18b	54,7 ± 0,74c	48,4 ± 0,73d	47,3 ± 0,67d
'SY Kolumb'					
0 d.	83,1 ± 1,29a	80,5 ± 1,30ab	78,3 ± 1,28b	72,2 ± 1,26c	72,6 ± 1,18c
7 d.	75,2 ± 1,26a	71,3 ± 1,20b	69,8 ± 1,16b	64,9 ± 1,09c	64,5 ± 1,05c
14 d.	68,3 ± 0,95a	64,9 ± 0,94b	59,7 ± 0,89c	55,4 ± 0,87d	55,1 ± 0,85d
21 d.	61,5 ± 0,80a	56,1 ± 0,76b	51,6 ± 0,81c	45,3 ± 0,77d	44,9 ± 0,74d
28 d.	52,8 ± 0,76a	46,2 ± 0,71b	41,3 ± 0,72c	35,5 ± 0,70d	35,1 ± 0,68d

3 lentelė. Tirtų veiksmų poveikio elektrolitų laidumui dispersinės analizės rezultatai

Table 3. The variance analysis of the effect of investigated factors on electrolyte leakage

Dispersijos Variance	Dispersijų kvadratų suma Sum of squares	Laisvės laipsnių skaičius Degrees of freedom	Kvadratų vidurkis Mean square	Faktinis Ficherio kriterijus F actual	Tykimybės lygmuo Probability level
A	2 724,662	2	1 362,331	874,7**	<0,000001
B	12 308,667	4	3 077,167	1 975,73**	<0,000001
C	3 054,093	4	763,523	490,23**	<0,000001
A × B	61,098	8	7,637	2,74**	0,000022
A × C	34,155	8	4,269	3,44**	0,007538
B × C	63,378	16	3,961	2,54**	0,001725
A × B × C	95,911	32	2,997	1,92**	0,004832

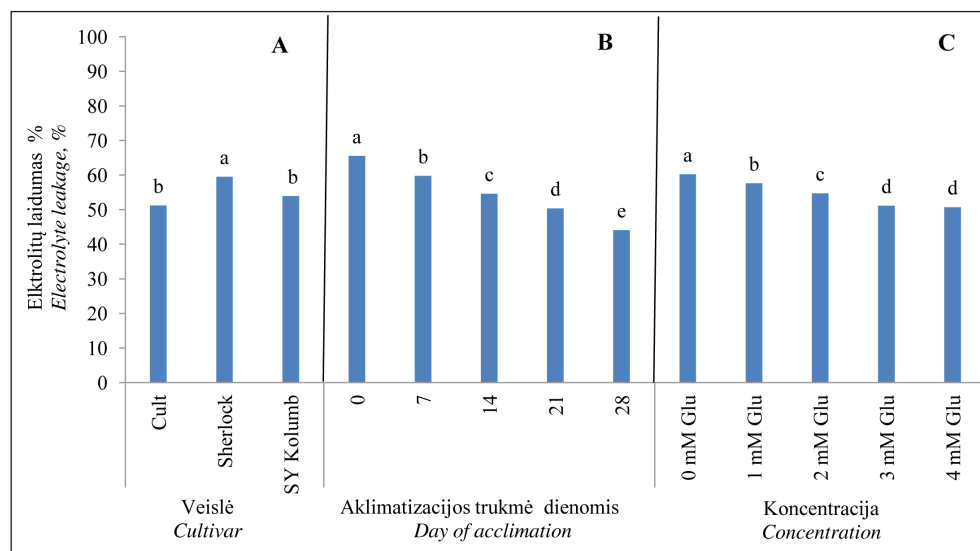
Pastaba / Note: veislė (A); grūdinimo trukmė (B); L-glutamato rūgšties koncentracija (C) / Cultivar (A); Acclimation duration (B); Concentration of L-glutamic acid (C).

sąveikos dispersinės analizės rezultatai rodo, kad atspariausi šalčiui buvo ūgliai, auginti terpėje, papildytoje 3–4 mM l⁻¹ L-glutamato rūgšties bei grūdinti 28 dienas. Įvertinus visų trijų tirtų veiksmų sąveikos poveikį nustatyta, kad atspariausi šalčiui buvo veislės 'SY Kolumb' ūgliai po 28 grūdinimo dienų, auginti terpėje, papildytoje 3–4 mM l⁻¹ L-glutamato rūgšties.

Tyrimais nustatyta, kad genotipas – vienas iš veiksmų, lemiančių žieminio rapso atsparumą

šalčiui. Jautriausi šalčiui buvo veislės 'Sherlock' ūgliai, kurių vidutinis elektrolitų laidumas buvo 5,63 % didesnis, palyginti su veislės 'Cult' ūgliais, ir 8,36 % didesnis, palyginti su veislės 'SY Kolumb' ūgliais. Tarp veislių 'Cult' ir 'SY Kolumb' elektrolitų laidumo skirtumai neesminiai ir statistiškai nepatikimi (pav., A).

Grūdinimo trukmė taip pat turėjo esminės įtakos ūglių atsparumui šalčiui. Po 28 grūdinimo dienų, vidutinis tirtų žieminio rapso ūglių



Pav. Veislės (A), grūdinimo trukmės (B) ir L-glutamato rūgšties koncentracijos (C) poveikis žieminio rapso ūglių vidutiniam elektrolitų laidumui (tarp variantų vidurkių, pažymėtų ne ta pačia raide, skirtumai yra esminiai ($P < 0,01$))

Figure. Effect of cultivar (A), acclimation duration (B) and L-glutamic acid concentration (C) on the mean electrolyte leakage in shoots of winter rapeseed (means not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.01$))

audinių elektrolitų laidumas sumažėjo 21,42 %, palyginti su negrūdintais ūgliais (pav., B). Statistiškai įvertinus L-glutamato rūgšties poveikį žeminio rapso ūglių elektrolitų laidumui nustatyta, kad tirtų veislių ūglių atsparumą šalčiui *in vitro* padidinti pakanka 3 mM l⁻¹ koncentracijos (pav., C), nes skirtumai tarp elektrolitų laidumo dėl 3 ir 4 mM l⁻¹ koncentracijų poveikio neesminiai ir statistiškai nepatikimi. Teigiamas egzogeninės glutamo rūgšties priedas maitinamojoje terpėje taip pat nustatytas tiriant ryžių atsparumą šalčiui *in vitro* sąlygomis (Jia et al., 2016).

Mūsų tyrimo rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad L-glutamato rūgšties priedas maitinamojoje terpėje didina žeminio rapso atsparumą šalčiui, skatinant intensyvesnę endogeninio prolino, būtiną ląstelių membranų stabilumui palaikyti streso sąlygomis, sintezę.

IŠVADOS

1. Egzogeninės L-glutamato rūgšties priedas maitinamojoje terpėje skatino endogeninio prolino sintezę tirtų žeminio rapso veislių negrūdintuose ir grūdintuose ūgliuose.

2. Žeminio rapso ūglių atsparumą šalčiui *in vitro* sąlygomis labiausiai padidino sinerginis L-glutamato rūgšties ir grūdinimo trukmės poveikis.

3. Nepriklausomai nuo grūdinimo trukmės ir L-glutamato rūgšties koncentracijos maitinamojoje terpėje, atspariausi šalčiui buvo veislės 'SY Kolumb' ūgliai.

Gauta 2017 03 10

Priimta 2017 06 22

LITERATŪRA

- Campos P. S., Quartin V., Ramalho J. C., Nunes M. A. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology*. Vol. 160. P. 283–292.
- Chinnusamy V., Zhu J. K., Sunkar R. 2010. Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 639. P. 39–55.
- Dai F., Zhou M., Zhang G. 2007. The change of chlorophyll fluorescence parameters in winter barley during recovery after freezing shock and as affected by cold acclimation and irradiance. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. 45. P. 915–921.
- Halliwell B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*. Vol. 35. P. 1147–1150.
- Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M. N., Wani A. S., Pichtel J., Ahmad A. 2012. Role of proline under changing environments. *Plant Signaling & Behavior*. Vol. 7. P. 1456–1466.
- Hildebrandt T. M., Nesi A. N., Araujo W. L., Braun H. P. 2015. Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant*. Vol. 8. P. 1563–1579.
- Hong Z. L., Lakkineni K., Zhang Z. M., Verma D. P. S. 2000. Removal of feedback inhibition of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology*. Vol. 122. P. 1129–1136.
- Jan N., Mahboob-ul-Hussain M., Andrabi K. I. 2009. Cold resistance in plants: A mystery unresolved. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 12. No. 3. P. 1–15.
- Janmohammadi M. 2012. Metabolomic analysis of low temperature responses in plants. *Current Opinion in Agriculture*. Vol. 1. P. 1–6.
- Jia Y., Zou D., Wang J., Sha H., Liu H., Inayat M. A., Sun J., Zheng H., Nan Xia N., Zhao H. 2016. Effects of γ -aminobutyric acid, glutamic acid, and calcium chloride on rice (*Oryza sativa* L.) under cold stress during the early vegetative stage. *Journal of Plant Growth Regulation*. Vol. 36. P. 240–253.
- Kaur G., Kumar S., Thakur P., Malik J. A., Bhandhari K., Sharma K. D., Nayyar H. 2011. Involvement of proline in response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to chilling stress at reproductive stage. *Scientia Horticulturae*. Vol. 128. No. 3. P. 174–181.
- Kavi Kishor P. B., Sangam S., Amrutha R. N., Laxmi P. S., Naidu K. R., Rao K. R., Rao S., Reddy K. J., Theriappan P., Sreenivasulu N. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*. Vol. 88. P. 424–438.
- Kumar V., Shriram V., Kavi Kishor P. B., Jawali N., Shitole M. G. 2010. Enhanced proline accumulation and salt stress tolerance of transgenic indica rice by over-expressing P5CSF129A gene. *Plant Biotechnology Reports*. Vol. 4. P. 37–48.
- Less H., Galili G. 2008. Principal transcriptional programs regulating plant amino acid metabolism in response to abiotic stresses. *Plant Physiology*. Vol. 147. No. 1. P. 316–330.
- McClinchey S. L., Kott L. S. 2008. Production of mutants with high cold tolerance in spring canola (*Brassica napus*). *Euphytica*. Vol. 162. P. 18–27.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiology Plantarum*. Vol. 15. P. 473–497.
- Sharma S., Verslues P. E. 2010. Mechanisms independent of ABA or proline feedback have

- a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant Cell and Environment*. Vol. 33. P. 1838–1851.
18. Sinha S., Kukreja B., Arora P., Sharma M., Pandey G. K., Agarwal M., Chinnusamy V. 2015. The omics of cold stress responses in plants. In: *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*. Ed. G. K. Pandey. Springer. P. 143–194.
 19. Suzuki N., Mittler R. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum*. Vol. 126. P. 45–51.
 20. Szekely G., Abraham E., Cselo A., Rigo G., Zsigmond L., Csiszar J., Ayaydin F., Strizhov N., Jasik J., Schmelzer E., Koncz C., Szabados L. 2008. Duplicated P5CSgenes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant Journal*. Vol. 53. P. 11–28.
 21. Renaut J., Hausman J. F., Bassett C., Artlip T., Cauchie H. M., Witters E., Wisniewski M. 2008. Quantitative proteomic analysis of short photoperiod and low-temperature responses in bark tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Tree Genetic & Genomes*. Vol. 4. P. 589–600.
 22. Tarakanovas P., Raudonius S. 2003. *Agronominių tyrimų duomenų statistinė analizė taikant kompiuterines programas ANOVA, STAT, SPLIT-PLOT iš paketo „Selekcija“ ir „Irristat“*. Akademija, Kėdainių r. 57 p.
 23. Verslues P. E., Sharma S. 2010. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis Book*. Vol. 8. Available from: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0140>
 24. Yadav S. K. 2010. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. Vol. 30. P. 515–527.
- Remigijus Peleckis, Natalija Burbulis, Aušra Blinstrubienė, Vaida Jonytienė**
- FACTORS AFFECTING RESISTANCE OF WINTER RAPESEED (*BRASSICA NAPUS* L.) SHOOTS TO COLD STRESS *IN VITRO***
- S u m m a r y*
- Research was carried out at the Institute of Biology and Plant Biotechnology of Aleksandras Stulginskis University and at the Laboratory of Agrobiotechnology of the Joint Research Centre. The effect of cultivar, acclimation duration and exogenous L-glutamic acid on the changes of proline level and electrolyte leakage in shoots of winter rapeseed was evaluated. The shoots were cultivated in the MS medium supplemented with 0, 1, 2, 3 and 4.0 mM l⁻¹ L-glutamic acid. The resistance of shoots to cold stress (at –8 °C for 24 h) was estimated by an electrolyte leakage test. It was found that the exogenous L-glutamic acid stimulates the synthesis of endogenous proline in non-acclimated as well as acclimated shoots. The highest increasing in cold resistance of winter rapeseed shoots has been obtained under the synergic effect of L-glutamic acid and acclimation. The shoots of cultivar ‘SY Kolumb’ were most cold-resistant independent of the acclimation duration and the concentration of L-glutamic acid in the medium.
- Keywords:** cold, electrolyte leakage, endogenous proline, L-glutamic acid, winter rapeseed