■ ОРИГІНАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 581.1:577.13

РОЛЬ АКТИВНИХ ФОРМ ОКСИГЕНУ ТА ІОНІВ КАЛЬЦІЮ У РЕАЛІЗАЦІЇ ПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ γ-АМІНОМАСЛЯНОЇ КИСЛОТИ НА ПРОРОСТКИ ПШЕНИЦІ ЗА УМОВ ТЕПЛОВОГО СТРЕСУ

Ю.Є. КОЛУПАЄВ [1, 2, 3 *], І.В. ШАХОВ [1, 3], О.І. КОКОРЕВ [1],
А.І. ДЯЧЕНКО [4], О.П. ДМИТРІЄВ [4]

[1] Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України, пр-т Героїв Харкова, 142, Харків, 61060, Україна
[2] Полтавський державний аграрний університет, вул. Сковороди, 1/3, Полтава, 36003, Україна
[3] Державний біотехнологічний університет, вул. Алчевських, 44, Харків, 61022, Україна
[4] Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна
E-mail: *plant_biology@ukr.net

γ-аміномасляна кислота (ГАМК) вважається молекулою, що поєднує властивості стресового метаболіту і сигнальної молекули. Водночас значення її функціональної взаємодії з іншими сигнальними посередниками, зокрема, активними формами Оксигену (АФО) та іонами кальцію, для реалізації стрес-протекторної дії на рослинні клітини залишається малодослідженим. Вивчали вплив ГАМК на стійкість проростків пшениці (Triticum aestivum L., сорт Досконала) до потенційно летального теплового стресу та участь АФО і кальцію у прояві ефектів ГАМК. Обробка проростків ГАМК в концентраціях 0,5 і 1 мМ спричиняла істотне підвищення їх виживаності після ушкоджувального прогріву у водяному термостаті (10 хв за температури 45 °С). Під впливом ГАМК відбувалося транзиторне підвищення вмісту Гідроген пероксиду у коренях проростків із наступним зростанням активності антиоксидантних ферментів — супероксиддисмутази, каталази і гваяколпероксидази. Вказані ефекти ГАМК повністю усувалися попереднім внесенням у середовище інкубації коренів скавенджера Гідроген пероксиду диметилтіосечовини (ДМТС) та значною мірою пригнічувалися в присутності інгібітору НАДФН-оксидази імідазолу. Водночас обробка проростків хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА лише частково нівелювала зростання вмісту H_2O_2 і майже не впливала на підвищення активності антиоксидантних ферментів у коренях за дії ГАМК. Обробка інгібітором надходження кальцію з внутрішньоклітинних компартментів неоміцином викликала часткове зменшення впливу ГАМК на показники стану про-/антиоксидантної системи в коренях пшениці, але не усувала ці ефекти повністю. Під впливом ГАМК значно зменшувалися спричинювані тепловим стресом ушкодження мембран клітин коренів, що проявлялося у зниженні виходу з клітин УФ-В-поглинальних сполук та зменшенні вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів. При цьому стрес-протекторна дія ГАМК повністю усувалася обробкою ДМТС та змінювалась у присутності кальцієвих антагоністів. Зроблено висновок про важливу роль АФО, генерованих за участю НАДФН-оксидази, в реалізації захисної дії ГАМК на проростки пшениці за умов теплового стресу та часткову залежність її протекторних ефектів від кальцієвого гомеостазу.

Ключові слова: *Triticum aestivum, γ-аміномасляна кислота, активні форми Оксигену, кальцій, тепловий стрес, окиснювальні пошкодження, антиоксидантна система.*

Вступ. γ-аміномасляна кислота (ГАМК), чотиривуглецева непротеїногенна амінокислота, виявлена у більшості прокаріотичних та еукаріотичних організмів. Незважаючи на те, що у тваринних і рослинних клітинах ГАМК було знайдено майже одночасно (в серединці минулого століття) (Steward, 1949; Roberts, Frankel, 1950), її функції як біорегулятора впродовж наступних десятиліть досліджувалися в основному на ссавцях. Зважаючи на це, ГАМК давно визнана як ключовий нейротрансмітер гальмівного типу (Sears et al, 2021). Водночас у рослин ГАМК тривалий час розглядалася як

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2024

звичайний продукт метаболізму, в останні два десятиліття як один зі стресових метаболітів (Seifikalhor et al, 2019), і лише останнім часом дослідники фокусують увагу на ГАМК як на сигнально-регуляторній молекулі (Suhel et al, 2023).

Основним шляхом синтезу ГАМК у рослин є її утворення з глутамату за допомогою глутаматдекарбоксилази (Sita, Kumar, 2020; Ansari et al, 2021). Подальша її метаболізація в мітохондріях в реакціях так званого ГАМК-шунту призводить до утворення спершу сукцинат напівальдегіду і далі сукцинату з одночасним відновленням НАД (Bor, Turkan, 2019).

ГАМК міститься у клітинах у досить високих концентраціях, що становлять десятки мкмоль/г маси сирої речовини (Al-Quraan et al, 2015; Xu et al, 2021a). При цьому її вміст у рослинних тканинах істотно зростає у відповідь на дію стресових чинників. Зокрема, ефекти збільшення кількості ГАМК і посилення експресії генів глуаматдекарбоксилази виявлені у різних видів рослин за дії екстремальних температур, посухи, засолення, іонів важких металів, затоплення тощо (Xing et al, 2007; Bor et al, 2009; Al-Quraan, Al-Share, 2016; Al-Quraan et al, 2019; Ansari et al, 2021; Tan et al, 2022).

Також у численних дослідження зафіксовано підвищення стійкості рослин до абіотичних стресових чинників під впливом екзогенної ГАМК. Наприклад, показано підвищення теплостійкості *Oryza sativa* (Nayyar et al, 2014), *Agrostis stolonifera* (Zeng et al, 2021) та *Lens culinaris* (Bhardwaj et al, 2021) за обробки ГАМК. Виявлено зростання за обробки ГАМК стійкості рослин пшениці на різних фазах розвитку до зневоднення і засолення (Wang et al, 2022; Kolupaev et al, 2023a; Zhao et al, 2023). Схожі ефекти продемонстровані і на ряді інших видів культурних рослин (Cheng et al, 2018; Tang et al, 2020; Jin et al, 2019).

Однією з можливих причин стрес-протекторної дії ГАМК вважають її позитивний вплив на підтримання редокс-гомеостазу за стресових умов (Bor, Turkan, 2019). Зокрема, вважається, що посилення функціонування ГАМК-шунту є важливим механізмом підтримання пулу відновників і функціонування циклу трикарбонових кислот за стресових умов (Bouche et al, 2003). Також досить давно в системі *in vitro* показана пряма антирадикальна дія ГАМК, що перевищує відповідні ефекти таких відомих стресових метаболітів з антиоксидантною активністю, як пролін і гліцин-бетаїн (Smirnoff, Cumbes, 1989). Водночас у багатьох дослідженнях показано зростання активності і посилення експресії генів антиоксидантних ферментів за обробки рослин ГАМК (Jin et al, 2019; Tang et al, 2020; Zhou et al, 2022).

Разом з тим, питання про залучення сигнальних посередників у реалізацію стрес-протекторної дії ГАМК на рослинні клітини залишається відкритим. Так, незважаючи на численні дані про зменшення спричинюваних стресовими чинниками окиснювальних пошкоджень за обробки рослин ГАМК, участь АФО як можливих посередників в індукуванні ГАМК антиоксидантної системи залишається слабо дослідженою. В літературі ми знайшли лише дві роботи, що вказують на роль АФО, генерованих за участю НАДФН-оксидази, в посиленні адаптації рослин до абіотичних стресів. Так, показано, що обробка ГАМК спричиняла короткочасне посилення експресії гена *CaGR60*, що кодує НАДФН-оксидазу, в коренях рослин бобового чагарника карагани (*Caragana intermedia*) (Shi et al, 2010). При цьому за дії екзогенної ГАМК відзначалося підвищення солестійкості рослин. Схожі результати було отримано на рослинах дині (*Cucumis melo*). Обробка ГАМК посилювала експресію гена однієї з форм каталітичної субодиниці НАДФН-оксидази (*RBOHD*) і накопичення H_2O_2 за нормальних умов, але виявляла захисний ефект за дії содового засолення, знижуючи вміст Гідроген пероксиду і малонового діальдегіду (МДА) у листках (Jin et al, 2019). При цьому скавенджер H_2O_2 диметилтіосечовина (ДМТС) та інгібітор НАДФН-оксидази дифеніленіодоніум усували спричинюване ГАМК гальмування розвитку окиснювального стресу в клітинах.

Водночас дотепер відсутні дані про залучення АФО в реалізацію стрес-протекторного впливу ГАМК на рослини за умов температурних стресів. При цьому відомо, що АФО є важливими посередниками в процесах розвитку індукованої теплостійкості рослин, що досягається короткочасною дією помірно високої температури (ефект теплового загартуван-

ня) (Kolupaev, Oboznyi, 2012; Kolupaev et al, 2023b).

Відкритим залишається і питання про участь кальцію в формуванні АФО-сигналів за дії на рослини ГАМК, хоча є дані про залучення кальцію як в процеси теплового загартування рослинних клітин (Finka, Goloubinoff, 2014; Karpets et al, 2015), так і в процеси активації НАДФН-оксидази (Kohli et al, 2019). З іншого боку, є відомості про можливість посилення дією ГАМК надходження Ca^{2+} в клітини за рахунок відкривання кальцієвих каналів, що активуються гіперполяризацією (Ramesh et al, 2017). Проте можливі причинно-наслідкові зв'язки між змінами під впливом ГАМК кальцієвого гомеостазу, генерації АФО і формуванням відповіді антиоксидантної системи та розвитком теплостійкості рослинних клітин залишаються недослідженими.

Метою роботи було виявлення залучення АФО в процеси активації антиоксидантної системи і розвитку теплостійкості проростків пшениці за дії на них ГАМК. Також у завдання роботи входило вивчення інгібіторним методом залежності вказаних процесів від кальцієвого гомеостазу.

Матеріали і методи. Експериментальним об'єктом слугували 3-добові (на момент початку роботи) етіольовані проростки пшениці м'якої озимої (*Triticum aestivum* L.) сорту Досконала. Для їх отримання зернівки, люб'язно надані Національним центром генетичних ресурсів рослин (Харків, Україна), знезаражували впродовж 2 хв в 70 % етанолі, надалі впродовж 15 хв 2%-вим розчином NaClO. Після обробки зернівки 8–10 разів промивали дистильованою водою і пророщували в темному термостаті впродовж 3 діб за температури 24 °С. Надалі по 30 приблизно однакових за розміром проростків переносили в інші чашки Петрі з дистильованою водою (контроль) або розчинами ГАМК в концентраціях діапазону від 0,1 до 2,5 мМ.

При вивченні впливу скавенджера H_2O_2 диметилтіосечовини (ДМТС, 150 мкМ), інгібітору НАДФН-оксидази імідазолу (10 мкМ), хелатора кальцію ЕГТА (400 мкМ) та інгібітору залежного від фосфоліпази С утворення інозитол-1,4,5-фосфату ($ІФ_3$) неоміцину (200 мкМ) на теплостійкість проростків та біохімічні показники інкубація коренів у розчинах становила 26 год (Kolupaev et al, 2019; Shkliarevskyi et al, 2020). При оцінці спільної дії ГАМК з вказаними антагоністами сигнальних процесів останні додавали в середовище інкубації коренів за 2 год до введення в нього ГАМК.

Усі біохімічні показники визначали у коренях проростків, оскільки вони більш чутливі до впливів екзогенних сполук та теплового стресу (Kolupaev et al, 2019; Shkliarevskyi et al, 2020). Під час інкубації проростків на досліджуваних розчинах визначали вміст в них Гідроген пероксиду та активність антиоксидантних ферментів — супероксиддисмутази (СОД), каталази та гваяколпероксидази.

Після закінчення інкубації на розчинах ГАМК та досліджуваних інгібіторів проростки піддавали ушкоджувальному прогріву у водяному ультратермостаті за температури 45 °С впродовж 10 хв (Shkliarevskyi et al, 2020). Надалі їх переносили на дистильовану воду. Частину проростків через 5 год після теплового стресу використовували для аналізу активності антиоксидантних ферментів, вмісту продукту пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) малонового діальдегіду (МДА) та виходу УФ-В-поглинальних речовин (див. нижче), а іншу частину проростків витримували впродовж трьох діб за температури 24 °С і освітлення 9 клк для оцінки виживаності. До категорії «живих» відносили проростки, у яких не було помітних некрозів і які мали здатність до росту після впливу стресового чинника.

Для оцінки виходу речовин, що поглинають в УФ-В області спектру (переважно вільних нуклеотидів), корені інтактних проростків занурювали в стаканчики з дистильованою водою на 1 год, після чого відокремлювали від проростків і зважували. Абсорбцію інкубаційного розчину визначали при A_{252} та A_{264} на спектрофотометрі СФ-46 («ЛОМО»). Вихід речовин оцінювали в умовних одиницях як відношення усередненої величини, виміряної при зазначених довжинах хвилі, до маси коренів і виражали у відсотках до величин, обчислених для коренів проростків, що не піддавалися ушкоджувальному прогріву (Shkliarevskyi et al, 2020).

Для визначення вмісту продуктів ПОЛ корені гомогенізували у розчині, що містив 0,25%-

ву 2-тіобарбітурову кислоту в 10%-вій трихлороцтовій кислоті (ТХО) (Kolupaev et al, 2020). Гомогенат нагрівали на киплячій водяній бані впродовж 30 хв, охолоджували, після чого центригували при 12000 g впродовж 15 хв і визначали абсорбцію супернатанту при 532 нм. Для оцінки неспецифічного світлопоглинання, зумовленого переважно наявністю розчинних вуглеводів, абсорбцію зразків вимірювали за 600 нм. При розрахунках цю величину віднімали від основного результату вимірювань.

Вміст гідроген пероксиду визначали феротіоціанатним методом, екстрагуючи його з розтертих на холоді коренів 5 % ТХО. Проби центрифугували на центрифузі MPW 350R (MPW MedInstruments, Польща) при 8000 g впродовж 10 хв за температури близько 4 °С, і в супернатанті визначали концентрацію H_2O_2 (Sagisaka, 1976).

Активність антиоксидантних ферментів визначали за методиками, докладно описаними раніше (Kolupaev, Oboznyi, 2012; Shkliarevskyi et al, 2020). Наважки коренів гомогенізували за температури 2–4 °С в 0,15 М K,Na-фосфатному буфері (pH 7,6) з додаванням ЕДТА (0,1 мМ) і дитіотрейтолу (1 мМ). Для аналізу використовували супернатант після центрифугування гомогенату при 8000g впродовж 10 хв при 4 °С.

Загальну активність СОД (КФ 1.15.1.1) визначали при pH реакційної суміші 7,6, використовуючи метод, в основі якого здатність ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніони, що утворюються внаслідок аеробної взаємодії НАДН та феназинметосульфату. Активність каталази (КФ 1.11.1.6) аналізували при pH реакційної суміші 7,0 за кількістю H_2O_2, розкладеного за одиницю часу. Активність гваяколпероксидази (КФ 1.11.1.7) визначали, використовуючи як донор Гідрогену гваякол, а як субстрат – H_2O_2. Попередньо за допомогою K,Na-фосфатного буфера pH реакційної суміші доводили до 6,2.

Вимірювання проводили у чотирьох біологічних повтореннях. При оцінці виживаності проростків після теплового стресу кожне повторення містило не менше 30 проростків. Наведено середні величини та їх стандартні похибки. Вірогідність відмінностей між варіантами оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення. Обробка проростків ГАМК в діапазоні концентрацій від 0,1 до 2,5 мМ спричиняла підвищення їх виживаності після ушкоджувального нагрівання (рис. 1). При цьому ефект, вірогідний за $P \leq 0,05$, відзначався при використанні концентрацій 0,5 і 1 мМ. За вищої та нижчої концентрацій ГАМК ефекти бути вірогідними лише на рівні $P \leq 0,1$. Зважаючи на це, у подальших експериментах при дослідженні впливу ГАМК на біохімічні показники проростків її використовували в концентрації 0,5 мМ.

Вміст H_2O_2 у коренях проростків контрольного варіанта впродовж періоду спостережень істотно не змінювався (рис. 2). Додавання 0,5 мМ ГАМК у середовище інкубації коренів проростків спричиняло швидке транзиторне підвищення у них вмісту Гідроген пероксиду (рис. 2). Тенденцію до такого ефекту спостерігали вже через 20 хв від початку обробки ГАМК, а через 1–2 год вміст H_2O_2 у коренях дослідного варіанта вірогідно перевищував значення контролю. Проте вже через 3 год інкубації вміст H_2O_2 у коренях, що перебували на середовищі з ГАМК, не відрізнявся від величин у контролі, такі ж значення було зафіксовано і наприкінці спостережень (через 24 год інкубації) (рис. 2).

Транзиторний характер зростання вмісту Гідроген пероксиду у коренях за обробки ГАМК може вказувати на підвищення на відповідних фазах експерименту активності антиоксидантних ферментів. І дійсно, вже через 2 год від початку впливу ГАМК у коренях зростала активність СОД (рис. 3, *а*). Такий ефект зберігався протягом всього періоду експозиції проростків на середовищі з додаванням ГАМК (24 год). Схожий характер підвищення активності під впливом ГАМК спостерігали і для двох інших антиоксидантних ферментів — каталази і гваяколпероксидази (рис. 3, *б*, *в*).

Ушкоджувальний прогрів проростків спричиняв зниження активності СОД і каталази у коренях проростків пшениці, водночас попередня обробка ГАМК сприяла стабілізації активності цих ферментів (рис. 3, *а*, *б*). Активність гваяколпероксидази після нагріву проростків істотно не змінювалася, а у варіанті з обробкою ГАМК вона була дещо вищою, ніж у контролі (рис. 3, *в*).

У наступній серії експериментів досліджували вплив антагоністів АФО і кальцію на прояв модуляції вмісту H_2O_2 у коренях проростків, спричинюваної дією ГАМК. Обробка проростків скавенджером Гідроген пероксиду ДМТС зменшувала його вміст у коренях і повністю усувала ефект зростання кількості H_2O_2, спричинюваний дією ГАМК (рис. 4). Імідазол — інгібітор НАДФН-оксидази, ключового ферменту, що забезпечує генерацію АФО клітинною поверхнею, спричиняв деяке зниження вмісту Гідроген пероксиду у коренях і значною мірою зменшував ефект підвищення вмісту Гідроген пероксиду, зумовлений дією ГАМК.

Обробка коренів хелатором позаклітинного кальцію сама по собі незначною мірою знижувала вміст у них H_2O_2 (рис. 4). При цьому, однак, вона частково знімала ефект підвищення вмісту АФО у коренях за дії ГАМК. Як інший антагоніст кальцію ми використовували неоміцин, який, зв'язуючи фосфатидилінозитолбіфосфати, інгібує фосфатидилінозитолспецифічну фосфоліпазу С (Liu et al, 2006) і тим самим перешкоджає накопиченню продукту реакції — $ІФ_3$, який впливає на надходження кальцію в цитозоль із внутрішньоклітинних компартментів (Lee, Lee, 2008). Під впливом неоміцину вміст H_2O_2 у коренях істотно не змінювався. Однак цей інгібітор значною мірою нівелював зростання кількості Гідроген пероксиду, спричинюване обробкою коренів ГАМК (рис. 4). Таким чином, різні антагоністи кальцію частково усували посилення генерації АФО за обробки проростків ГАМК.

Антагоністи АФО і кальцію до певної міри модулювали і вплив ГАМК на активність антиоксидантних ферментів (рис. 5). Скавенджер Гідроген пероксиду ДМТС та інгібітор НАДФН-оксидази імідазол самі по собі істотно не впливали на активність СОД у коренях проростків пшениці, проте повністю усували її підвищення, спричинюване обробкою ГАМК (рис. 5, *а*).

Обробка коренів обома антагоністами кальцію (ЕГТА і неоміцином) не впливала на активність СОД (рис. 5, *а*). При цьому дія хелатору кальцію ЕГТА не змінювала прояву ефектів ГАМК: у варіанті з комбінованою обробкою ГАМК і ЕГТА активність СОД була такою ж

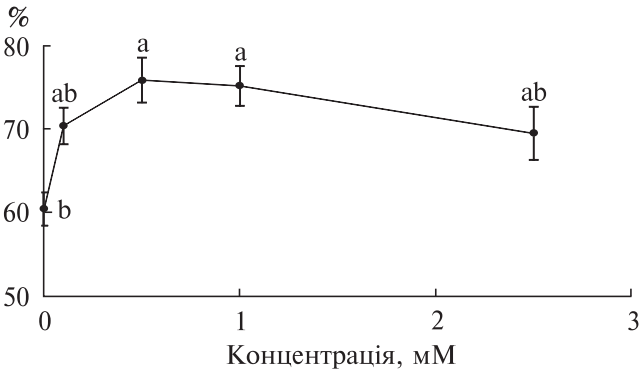


Рис. 1. Концентраційна залежність впливу ГАМК на виживаність (%) проростків пшениці після прогріву за температури 45 °С (10 хв). Однаковими латинськими літерами позначені величини, відмінності між якими не вірогідні за $P \le 0,05$

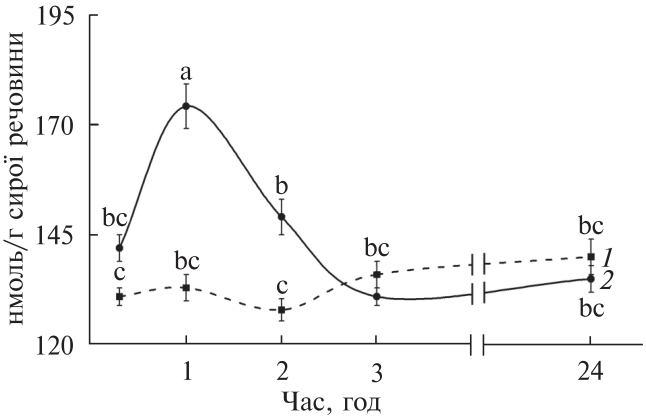
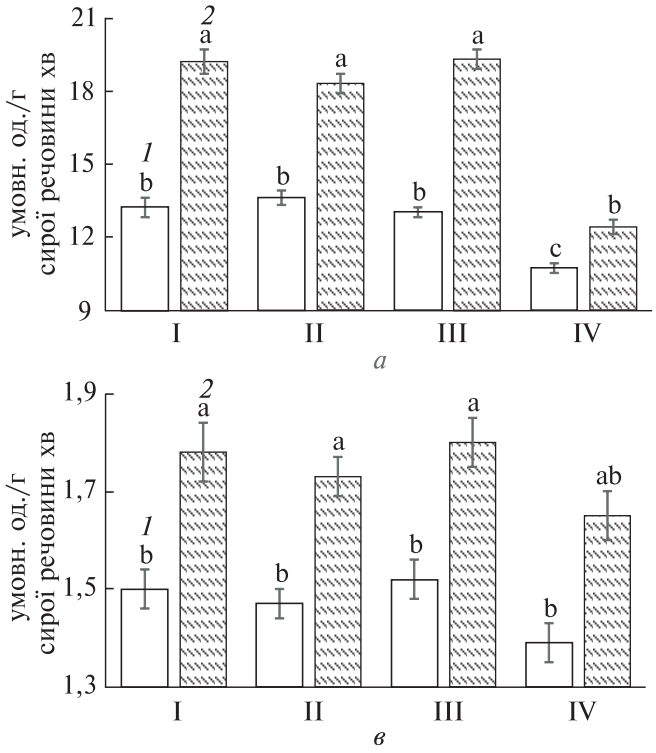


Рис. 2. Динаміка вмісту Гідроген пероксиду (нмоль/г сирої речовини) в коренях проростків пшениці за обробки 0,5 мМ ГАМК. *1* — контроль; *2* — ГАМК (0,5 мМ). Однаковими латинськими літерами позначені величини, відмінності між якими не вірогідні за $P \le 0,05$

підвищеною, як і у варанті з обробкою лише ГАМК. Натомість антагоніст надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів неоміцин вірогідно зменшував прояв впливу ГАМК на активність СОД (рис. 5, *а*).

Активність каталази у коренях проростків пшениці в присутності антагоністів АФО ДМТС та імідазолу вірогідно не змінювалася, хоча за обробки скавенджером H_2O_2 відзначалася тенденція до деякого її зниження (рис. 5, *б*). При цьому як ДМТС, так і імідазол усували підвищення активності каталази, спричинюване обробкою коренів ГАМК.



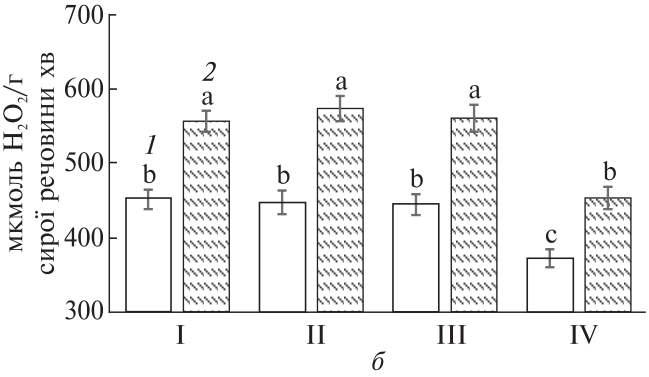


Рис. 3. Активність СОД (*а*, умов. од./г сирої речовини хв), каталази (*б*, ммоль H_2O_2/г сирої речовини хв) і гваяколпероксидази (*в*, умов. од./г сирої речовини хв) у коренях проростків пшениці за дії ГАМК та ушкоджувального прогріву. I, II, III – відповідно через 2, 4 і 24 год після інкубації проростків на розчинах з додаванням ГАМК; IV – через 5 год після ушкоджувального прогріву за температури 45 °С (10 хв). *1* — контроль; *2* — ГАМК (0,5 мМ). Однаковими латинськими літерами позначені величини, відмінності між якими не вірогідні за $P \le 0,05$

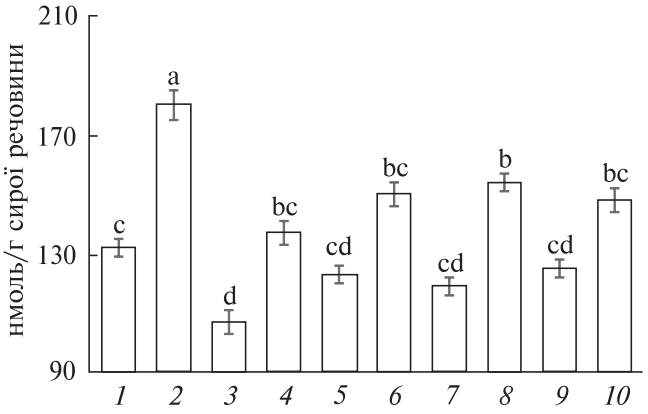


Рис. 4. Вплив ГАМК, антагоністів АФО і кальцію на вміст Гідроген пероксиду (нмоль/г сирої речовини) у коренях проростків пшениці. *1* — контроль; *2* — ГАМК (0,5 мМ); *3* — ДМТС (0,15 мМ); *4* — ГАМК (0,5 мМ) + ДМТС (0,15 мМ); *5* — імідазол (10 мкМ); *6* — ГАМК (0,5 мМ) + імідазол (10 мкМ); *7* — ЕГТА (0,4 мМ); *8* — ГАМК (0,5 мМ) + ЕГТА (0,4 мМ); *9* — неоміцин (0,2 мМ); *10* — ГАМК (0,5 мМ) + неоміцин (0,2 мМ). Однаковими латинськими літерами позначені величини, відмінності між якими не вірогідні за $P \le 0,05$. Примітка. Вміст гідроген пероксиду визначали через 1 год від початку обробки коренів ГАМК або через 3 год від початку дії антагоністів АФО і кальцію

Антагоністи кальцію (ЕГТА і неоміцин) самі по собі не впливали на активність каталази в коренях (рис. 5, *б*). При цьому хелатор позаклітинного кальцію ЕГТА не впливав і на ефект підвищення активності ферменту, спричинюваний дією ГАМК. Проте інгібітор надходження кальцію з внутрішньоклітинних компартментів неоміцин повністю усував підвищення активності каталази в коренях у варіанті з обробкою ГАМК.

За обробки ДМТС та імідазолом активність гваяколпероксидази у коренях істотно не змінювалася (рис. 5, *в*). Водночас як скавенджер Гідроген пероксиду, так і інгібітор НАДФН-оксидази повною мірою нівелювали зростання активності гваякопероксидази, спричинюване дією ГАМК.

Обидва антагоністи кальцію — ЕГТА і неоміцин — за відсутності ГАМК практично не впливали на активність гваяколпероксидази у коренях проростків (рис. 5, *в*), але хелатор позаклітинного кальцію ЕГТА дещо зменшував індуковане ГАМК зростання активності ферменту. Більш помітний ефект чинив неоміцин, цей інгібітор надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів по-

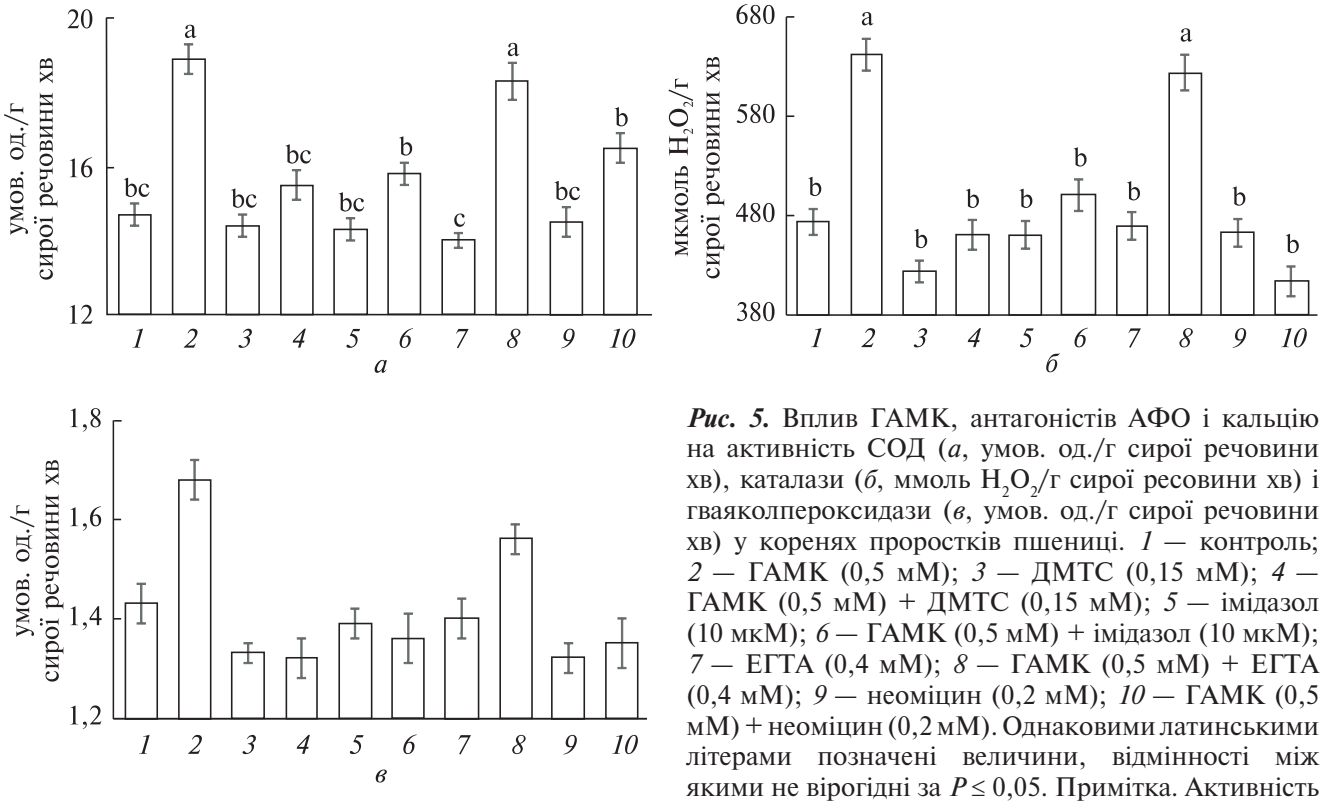


Рис. 5. Вплив ГАМК, антагоністів АФО і кальцію на активність СОД (*а*, умов. од./г сирої речовини хв), каталази (*б*, ммоль H_2O_2/г сирої ресовини хв) і гваяколпероксидази (*в*, умов. од./г сирої речовини хв) у коренях проростків пшениці. *1* — контроль; *2* — ГАМК (0,5 мМ); *3* — ДМТС (0,15 мМ); *4* — ГАМК (0,5 мМ) + ДМТС (0,15 мМ); *5* — імідазол (10 мкМ); *6* — ГАМК (0,5 мМ) + імідазол (10 мкМ); *7* — ЕГТА (0,4 мМ); *8* — ГАМК (0,5 мМ) + ЕГТА (0,4 мМ); *9* — неоміцин (0,2 мМ); *10* — ГАМК (0,5 мМ) + неоміцин (0,2 мМ). Однаковими латинськими літерами позначені величини, відмінності між якими не вірогідні за $P \le 0{,}05$. Примітка. Активність ферментів визначали через 24 год від початку обробки коренів ГАМК або через 26 год від початку дії антагоністів АФО і кальцію

вністю усував зростання активності гваяколпероксидази у варіанті з обробкою проростків ГАМК (рис. 5, *в*).

Таким чином, можна констатувати залежність спричинюваного ГАМК зростання активності всіх трьох досліджуваних антиоксидантних ферментів у коренях від АФО, генерованих з участю НАДФН-оксидази, і не такий однозначний вплив антагоністів кальцію на цей ефект ГАМК. Зокрема, на даній експериментальній моделі ми виявили майже повну відсутність впливу хелатора зовнішньоклітинного кальцію ЕГТА на активацію антиоксидантних ферментів дією ГАМК. Натомість неоміцин – інгібітор залежного від активності фосфоліпази С надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів повністю або частково усував спричинюване обробкою проростків ГАМК підвищення активності усіх трьох антиоксидантних ферментів.

Про залучення АФО і внутрішньоклітинного кальцію в реалізацію ефектів ГАМК свідчать й інтегральні показники, що характеризують стійкість проростків до теплових пошкоджень та окиснювального стресу, що їх супроводжує. Тепловий стрес спричиняв накопичення у коренях одного з основних кінцевих продуктів ПОЛ — МДА (рис. 6, *а*). Попередня обробка проростків ГАМК майже повністю усувала прояв такого ефекту. Досліджувані антагоністи АФО (ДМТС та імідазол) і кальцію (ЕГТА і неоміцин) самі по собі істотно не впливали на спричинюване дією стресора накопичення МДА в коренях. При цьому антиоксидант ДМТС та інгібітор НАДФН-оксидази практично повністю усували ефект захисту від розвитку окиснювального стресу, який спричиняла обробка проростків ГАМК: у варіантах з комбінованою обробкою проростків ГАМК і ДМТС та ГАМК і імідазолом підвищення вмісту МДА було таким самим істотним, як і в контрольному варіанті без обробки ГАМК.

Антагоністи кальцію також зменшували здатність ГАМК перешкоджати розвитку ПОЛ у коренях після теплового стресу. У варіанті з комбінованою обробкою проростків ГАМК і

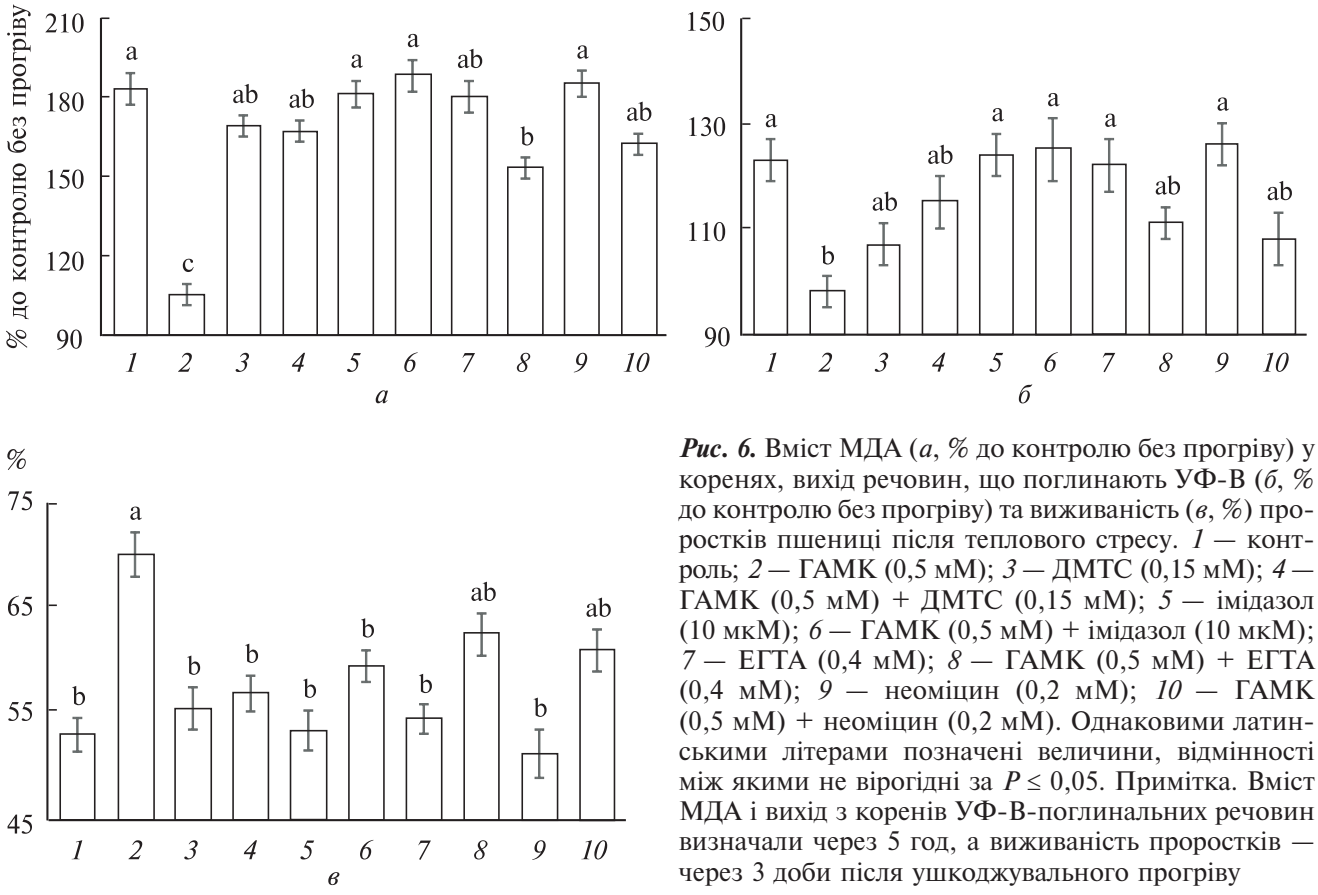


Рис. 6. Вміст МДА (*а*, % до контролю без прогріву) у коренях, вихід речовин, що поглинають УФ-В (*б*, % до контролю без прогріву) та виживаність (*в*, %) проростків пшениці після теплового стресу. *1* — контроль; *2* — ГАМК (0,5 мМ); *3* — ДМТС (0,15 мМ); *4* — ГАМК (0,5 мМ) + ДМТС (0,15 мМ); *5* — імідазол (10 мкМ); *6* — ГАМК (0,5 мМ) + імідазол (10 мкМ); *7* — ЕГТА (0,4 мМ); *8* — ГАМК (0,5 мМ) + ЕГТА (0,4 мМ); *9* — неоміцин (0,2 мМ); *10* — ГАМК (0,5 мМ) + неоміцин (0,2 мМ). Однаковими латинськими літерами позначені величини, відмінності між якими не вірогідні за $P \le 0,05$. Примітка. Вміст МДА і вихід з коренів УФ-В-поглинальних речовин визначали через 5 год, а виживаність проростків — через 3 доби після ушкоджувального прогріву

ЕГТА вміст МДА був вищим, ніж у варіанті з дією самої ГАМК, проте нижчим, ніж у необробленому контролі, тобто захисний ефект ГАМК в присутності ЕГТА нівелювався не повністю (рис. 6, *а*). Натомість в присутності інгібітору надходження кальцію з внутрішньоклітинних компартментів неоміцину спричинюваний ГАМК ефект зменшення розвитку ПОЛ майже не проявлявся.

Характер змін показника виходу з клітин коренів УФ-В-поглинальних речовин, що характеризує цілісність мембран, у варіантах експерименту узгоджується з показником інтенсивності ПОЛ (рис. 6, *б*). Тепловий стрес посилював вихід речовин, що поглинають УФ-В, що свідчить про ушкодження мембран. Водночас обробка ГАМК повністю усувала зростання виходу УФ-В-поглинальних речовин, спричинюване ушкоджувальним нагрівом. При цьому ДМТС також зменшував вихід цих речовин з клітин коренів, але значно меншою мірою, ніж ГАМК. Це може бути пов'язане з його прямою антиоксидантною дією. Проте за комбінованої обробки ГАМК і ДМТС мембранозахисний вплив ГАМК істотно знижувався. Імідазол не впливав на стабільність мембран коренів за теплового стресу, але повністю усував ефект зменшення виходу УФ-В-поглинальних речовин, спричинюваний дією ГАМК. Таким чином у присутності антиоксиданту або інгібітору НАДФН-оксидази стабілізації мембран, яку викликала обробка проростків ГАМК, майже не спостерігалося.

Обидва антагоністи кальцію (ЕГТА і неоміцин) практично не впливали на показник виходу з коренів речовин, що поглинають в УФ-В, за стресових умов (рис. 6, *в*). При цьому вони лише незначною мірою зменшували прояв мембраностабілізувальної дії ГАМК. У варіантах з комбінованою дією ГАМК і кальцієвих антагоністів показник виходу УФ-В-поглинальних речовин вірогідно не відрізнявся від величин цього показника ані в контролі, ані у варіанті з обробкою ГАМК.

Зрештою, зміни показників, що характеризують стан мембран (вміст МДА і вихід речовин, що поглинають в УФ-В), в цілому узгоджуються зі змінами під впливом досліджуваних чинників найбільш інтегрального показника — виживаності проростків після ушкоджувального нагрівання (рис. 6, *в*). Антагоністи АФО ДМТС та імідазол самі по собі істотно не впливали на виживаність проростків після теплового стресу, проте практично повністю усували її підвищення, спричинюване дією ГАМК.

ЕГТА і неоміцин, які перешкоджають змінам вмісту цитозольного кальцію, істотно не впливали на теплостійкість. При цьому за комбінованої дії ГАМК з обома кальцієвими антагоністами відзначалося деяке зменшення її позитивного впливу на виживаність проростків після теплового стресу. Але виживаність проростків у варіантах з поєднанням обробки ГАМК та ЕГТА або неоміцином істотно не відрізнялася від такої як у контролі, так і у варіанті з ГАМК. Іншими словами, ефект модифікації антагоністами кальцію впливу ГАМК на виживаність проростків не був вірогідним за $P \leq 0{,}05$ (рис. 6, *в*).

Таким чином, отримані нами результати досить однозначно засвідчують залучення АФО в реалізацію стрес-протекторної дії ГАМК на проростки пшениці за умов ушкоджувального нагрівання. На це вказує практично повне нівелювання скавенджером H_2O_2 спричинюваних ГАМК ефектів зниження інтенсивності ПОЛ і виходу УФ-В-поглинальних речовин, підвищення активності антиоксидантних ферментів і виживаності проростків після теплового стресу (рис. 5, 6). Більше того, стрес-протекторні ефекти ГАМК за умов наших експериментів майже не проявлялися у присутності інгібітору НАДФН-оксидази імідазолу. Це свідчить про роль саме цього ферменту в активації утворення АФО клітинами коренів за дії ГАМК. В цілому такі результати узгоджуються з даними про участь Гідроген пероксиду в індукованому ГАМК розвитку солестійкості дині (Jin et al, 2019). У цитованій роботі зареєстроване усунення захисного впливу фоліарної обробки рослин ГАМК дією скавенджера H_2O_2 ДМТС та інгібітору НАДФН-оксидази дифеніленіодонію. Водночас НАДФН-оксидаза ймовірно не єдине ферментативне джерело АФО у рослин. У наших експериментах усунення інгібітором НАДФН-оксидази спричинюваного ГАМК підвищення вмісту Гідроген пероксиду в коренях було хоча й помітним, але все ж не абсолютно повним (рис. 4). Зважаючи на це, варто зауважити, що за дії ГАМК на корені рослин *Caragana intermedia* зафіксоване посилення експресії не лише гена, що кодує каталітичну субодиницю НАДФН-оксидази *Rboh*, а й гена Cu-аміноксидази, яка також може брати участь в утворенні АФО (Shi et al, 2010).

Напевно АФО, утворювані НАДФН-оксидазою і, можливо, іншими ферментами, є необхідними посередниками в індукуванні протекторних систем рослин за дії абіотичних чинників, насамперед, антиоксидантної системи. Так, за умов наших експериментів відзначалося підвищення активностей антиоксидантних ферментів в коренях (СОД, каталази і гваяколпероксидази) і збереження їх на більш високому рівні за умов теплового стресу (рис. 3, 5). З використанням методів протеоміки на рослинах *Agrostis stolonifera* показано, що обробка ГАМК сприяла збільшенню за теплового стресу вмісту таких важливих для захисту від окиснювального стресу ферментів, як Cu/Zn-СОД і деяких форм аскорбатпероксидази (Li et al, 2020). У зразків ароматичної і лікарської рослини *Origanum vulgare*, оброблених ГАМК, при вирощуванні при підвищених температурах відзначалося зростання тимолу, карвакролу та інших вторинних метаболітів (Garoosi et al, 2023). Також обробка ГАМК зменшувала у рослин цього виду прояви окиснювальних пошкоджень за теплового стресу. У рослин *Lens culinaris* розвиток теплостійкості, спричинюваний дією ГАМК, супроводжувався підвищенням активності ряду антиоксидантних ферментів та вмісту таких стрес-протекторних сполук з антиоксидантною активністю, як пролін і гліцин-бетаїн (Bhardwaj et al, 2021).

Поряд з АФО в реалізації стрес-протекторного впливу ГАМК за дії на рослини високих температур напевно беруть участь й інші внутрішньоклітинні сигнальні посередники, зокрема, найбільш універсальний з них — Ca^{2+}. Не виключено, що посилення генерації АФО з участю НАДФН-оксидази під впливом ГАМК

пов'язане з активацією надходження кальцію в цитозоль. Показано, що взаємодія ГАМК з мембранними білками GLR та інгібування іонних каналів ALMT можуть спричиняти підвищення вмісту кальцію в цитозолі (Bor, Turkan, 2019) і це може безпосередньо активувати каталітичну субодиницю НАДФН-оксидази. Відомо, що цей основний АФО-генерувальний фермент містить два N-кінцевих Ca^{2+}-зв'язувальних домени (Kohli et al, 2019). Проте в наших експериментах за обробки коренів проростків пшениці ГАМК хелатор позаклітинного кальцію ЕГТА лише частково усував зростання генерації Гідроген пероксиду і зовсім не впливав на спричинюване ГАМК зростання активностей СОД і каталази (рис. 5). Це дозволяє припускати, що частково ефекти ГАМК можуть реалізовуватися за рахунок незалежних від кальцію механізмів. Проте обробка іншим модулятором кальцієвого гомеостазу — неоміцином, що впливає на надходження Ca^{2+} в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів, більш помітно модифікувала вплив ГАМК на вміст АФО, активність антиоксидантних ферментів і розвиток теплостійкості проростків (рис. 5, 6).

Не виключено, що для індукування ГАМК стрес-протекторних систем, задіяних в адаптації до нагріву, більше значення має надходження кальцію, залежне від утворення $ІФ_3$. Однак питання про наявність у вищих рослин гомологів білків, що зв'язують $ІФ_3$, досі залишається предметом дискусій, хоча прямими методами доведена здатність неоміцину перешкоджати надходженню кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів (Lecourieux et al, 2002). Слід також зауважити, що активність НАДФН-оксидази регулюється не лише кальцієм, а й фосфатидною кислотою (Karpets et al, 2012). Тому не виключено, що зміни активності НАДФН-оксидази під впливом ГАМК можуть опосередковуватися різними сигнальними молекулами і не пригнічуватися повністю окремими кальцієвими антагоністами.

Отже, у нашій роботі вперше показано роль АФО в індукуванні теплостійкості проростків пшениці дією ГАМК і цей феномен узгоджується з даними про їх участь у реалізації протекторного впливу ГАМК за умов сольового стресу, отриманими на прикладі рослин інших видів (Shi et al, 2010; Jin et al, 2019). Водночас отриманий нами експериментальний матеріал вказує і на залучення кальцію як посередника в реалізацію фізіологічних ефектів ГАМК. Проте дані інгібіторного аналізу дозволяють припускати, що окремі регульовані ГАМК ефекти, наприклад, підвищення активності СОД і каталази, можуть не залежати від надходження позаклітинного кальцію в цитозоль, оскільки не пригнічуються ЕГТА.

Безумовно, що для більш певних висновків стосовно залучення кальцію в реалізацію стрес-протекторної дії ГАМК необхідне як безпосереднє визначення змін вмісту кальцію в цитозолі, так і розширення спектра досліджуваних захисних систем, на функціонування яких може впливати ГАМК. В контексті індукування дією ГАМК теплостійкості рослин поряд з активацією антиоксидантної системи важливе значення може мати посилення синтезу певних груп білків теплового шоку (Kozeko, 2019). Наприклад, для рослин *Agrostis stolonifera* недавно за обробки ГАМК показано посилення експресії генів факторів теплового шоку (*HSFA-2c*, *HSFA-2d*, *HSFA-6a*, *HSFB-2b* та *HSFC-2b*) та підвищення вмісту білків HSP70, HSP90-1 та HSP101 (Li et al, 2022). З участю яких саме сигнальних посередників реалізуються такі важливі для адаптації до високих температур реакції за дії ГАМК поки що не відомо. В цілому ж, ГАМК можна розглядати як ще одну сполуку, що бере участь в регуляції редокс-гомеостазу і, ймовірно, інших сигнальних процесів та широкого спектра захисних реакцій, важливих для стійкості рослин до дії абіотичних стресорів.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Робота виконувалась за часткової підтримки проєктів «Розроблення тест-системи для скринінгу стрес-протекторної дії нових фізіологічно активних речовин на зернові злаки», номер держреєстрації 0123U100486 (2023 р. – Ю.Є.К., І.В.Ш., О.І.К.) та «Вивчення молекулярно-біологічних механізмів стій-

кості і адаптації рослин до абіотичних і біотичних стресів», номер держреєстрації 0118U001105 (2018–2023 рр. – А.І.Д., О.П.Д.).

THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AND CALCIUM IONS IN IMPLEMENTING THE STRESS-PROTECTIVE EFFECT OF γ-AMINO BUTYRIC ACID ON WHEAT SEEDLINGS UNDER HEAT STRESS CONDITIONS

Yu.E. Kolupaev, I.V. Shakhov, A.I. Kokorev, A.I. Dyachenko, A.P. Dmitriev

Yuriev Plant Production Institute, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,
Heroiv Kharkova ave., 142, Kharkiv, 61060, Ukraine
Poltava State Agrarian University,
Skovorody str., 1/3, Poltava, 36003, Ukraine
State Biotechnological University,
Alchevskih str., 44, Kharkiv, 61022, Ukraine
Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Akademika Zabolotnogo str., 148, Kyiv, 03143, Ukraine

E-mail: *plant_biology@ukr.net

γ-aminobutyric acid (GABA) is considered a molecule that combines the properties of a stress metabolite and a signaling molecule. At the same time, the importance of its functional interaction with other signaling mediators, in particular, reactive oxygen species (ROS) and calcium ions, for the implementation of stress-protective action on plant cells remains poorly researched. We studied the effect of GABA on the resistance of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L., variety Doskonala) to potentially lethal heat stress and the participation of ROS and calcium in the manifestation of the effects of GABA. Treatment of seedlings with GABA in concentrations of 0.5 and 1 mM caused a significant increase in their survival after damaging heating in a water thermostat (10 min at a temperature of 45 °C). Under the influence of GABA, there was a transient increase in the content of hydrogen peroxide in the roots of seedlings, followed by an increase in the activity of antioxidant enzymes — superoxide dismutase, catalase, and guaiacol peroxidase. The specified effects of GABA were completely eliminated by the preliminary application of the hydrogen peroxide scavenger dimethylthiourea (DMTS) to the root incubation medium and were significantly suppressed in the presence of the NADPH oxidase inhibitor imidazole. At the same time, the treatment of seedlings with the chelator of extracellular calcium EGTA only partially eliminated the increase in the content of hydrogen peroxide and almost did not affect the increase in the activity of antioxidant enzymes in the roots under the influence of GABA. Treatment with neomycin, an inhibitor of calcium uptake from intracellular compartments, caused a partial reduction in the effect of GABA on indicators of the state of the pro-/antioxidant system in wheat roots, but did not eliminate these effects completely. Under the influence of GABA, damage to root cell membranes caused by heat stress was significantly reduced, which was manifested in a decrease in the release of UV-B-absorbing compounds from the cells and a decrease in the content of lipid peroxide oxidation products. At the same time, the stress-protective effect of GABA was completely eliminated by DMTS treatment and changed in the presence of calcium antagonists. A conclusion was made about the important role of ROS generated with the participation of NADPH oxidase in the implementation of the protective effect of GABA on wheat seedlings under conditions of heat stress and the partial dependence of its protective effects on calcium homeostasis.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Al-Quraan NA, Al-Share AT (2016) Characterization of the γ-aminobutyric acid shunt pathway and oxidative damage in *Arabidopsis thaliana pop 2* mutants under various abiotic stresses. Biol Plant 60:132–138. https://doi.org/10.1007/s10535-015-0563-5

Al-Quraan NA (2015) GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen species under UV treatments: insight from *Arabidopsis thaliana* calmodulin mutants. Acta Physiol Plant 37:86. https://doi.org/10.1007/s11738-015-1836-5

Al-Quraan N, AL-Ajlouni Z, Obedat D (2019) The GABA shunt pathway in germinating seeds of wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress. Seed Sci Res 29(4):250–260. https://doi.org/10.1017/S0960258519000230

Ansari MI, Jalil SU, Ansari SA, Hasanuzzaman M (2021) GABA shunt: a key-player in mitigation of ROS during stress. Plant Growth Regul 94:131–149. https://doi.org/10.1007/s10725-021-00710-y

Bhardwaj A, Sita K, Sehgal A et al (2021) Heat priming of lentil (*Lens culinaris* Medik.) seeds and foliar treatment with γ-aminobutyric acid (GABA), confers protection to reproductive function and yield traits under high-temperature stress environments. Int J Mol Sci 22(11):5825. https://doi.org/10.3390/ijms22115825

Bor M, Turkan I (2019) Is there a room for GABA in ROS and RNS signalling? Environ Exp Bot 161:67–73. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.015

Bor M, Seckin B, Ozgur R et al (2009) Comparative effects of drought, salt, heavy metal and heat stresses on gamma-aminobutyric acid levels of sesame (*Sesamum indicum* L.). Acta Physiol Plant 31:655–659. https://doi.org/10.1007/s11738-008-0255-2

Bouché N, Fait A, Bouchez D et al (2003) Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the gamma-aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. Proc Natl Acad Sci USA 100(11):6843–6848. https://doi.org/10.1073/pnas.1037532100

Cheng B, Li Z, Liang L et al (2018) The γ-aminobutyric acid (GABA) Alleviates salt stress damage during seeds germination of white clover associated with Na^+/K^+ transportation, dehydrins accumulation, and stress-related genes expression in white clover. Int J Mol Sci 19(9):2520. https://doi.org/10.3390/ijms19092520

Finka A, Goloubinoff P (2014) The CNGCb and CNGCd genes from *Physcomitrella patens* moss encode for thermosensory calcium channels responding to fluidity changes in the plasma membrane. Cell Stress Chaperones 19(1):83–90. https://doi.org/10.1007/s12192-013-0436-9

Garoosi MK, Sanjarian F, Chaichi M (2023) The role of γ-aminobutyric acid and salicylic acid in heat stress tolerance under salinity conditions in *Origanum vulgare* L. PLOS ONE 18(7):e0288169. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288169

Jin X, Liu T, Xu J et al (2019) Exogenous GABA enhances muskmelon tolerance to salinity-alkalinity stress by regulating redox balance and chlorophyll biosynthesis. BMC Plant Biol 19:48. https://doi.org/10.1186/s12870-019-1660-y

Karpets YuV, Kolupaev YuE, Yastreb TO (2015) Signal mediators at induction of heat resistance of wheat plantlets by short-term heating. Ukr Biochem J 88(6):104–112. https://doi.org/10.15407/ubj87.06.104

Karpets YuV, Kolupaev YuE, Yastreb TO, Dmitriev OP (2012) Possible pathways of heat resistance induction in plant cells by exogenous nitrogen oxide. Cytol Genet 46(6):354–359. https://doi.org/10.3103/S0095452712060059

Kohli SK, Khanna K, Bhardwaj R et al (2019) Assessment of subcellular ROS and NO metabolism in higher plants: Multifunctional signaling molecules. Antioxidants 8(12):641. https://doi.org/10.3390/antiox8120641

Kolupaev YuE, Kokorev AI, Yastreb TO, Horielova EI (2019) Hydrogen peroxide as a signal mediator at inducing heat resistance in wheat seedlings by putrescine. Ukr Biochem J 91(6):103–111. https://doi.org/10.15407/ubj91.06.103

Kolupaev YuE, Horielova EI, Yastreb TO, Ryabchun NI (2020) State of antioxidant system in triticale seedlings at cold hardening of varieties of different frost resistance. Cereal Res Commun 48, 165–171. https://doi.org/10.1007/s42976-020-00022-3

Kolupaev YuE, Shakhov IV, Kokorev AI et al (2023a) Gamma-aminobutyric acid modulates antioxidant and osmoprotective systems in seedlings of *Triticum aestivum* cultivars differing in drought tolerance. Ukr Biochem J 95(5):85–97. https://doi.org/10.15407/ubj95.05.085.

Kolupaev YuE, Yastreb TO, Ryabchun NI et al (2023b) Cellular mechanisms of the formation of plant adaptive responses to high temperatures. Cyt Genet 57(1):55–75. https://doi.org/10.3103/S0095452723010048

Kolupaev YuE, Oboznyi OI (2012) Participation of the active oxygen forms in the induction of ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase under heat hardening of wheat seedlings. Ukrains'kyi Biokhimichnyi Zhurnal 84(6):131–138. (In Russian)

Kozeko LY (2019) The role of HSP90 chaperones in stability and plasticity of ontogenesis of plants under normal and stressful conditions (Arabidopsis thaliana). Cytol Genet 53(2):143–161. doi: https://doi.org/10.3103/S0095452719020063

Lecourieux D, Mazars C, Pauly N et al (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. Plant Cell 14(10):2627–2641. https://doi.org/10.1105/tpc.005579

Lee Y, Lee Y (2008) Roles of phosphoinositides in regulation of stomatal movements. Plant Signal Behav 3(4):211–213. https://doi.org/10.4161/psb.3.4.5557

Li Z, Burgess P, Peng Y, Huang B (2022) Regulation of nutrient accumulation by γ-aminobutyric acid associated with GABA primingenhanced heat tolerance in creeping bentgrass. Grass Research 2:5. https://doi.org/10.48130/GR-2022-0005

Li Z, Zeng W, Cheng B et al (2020) γ-Aminobutyric acid enhances heat tolerance associated with the change of proteomic profiling in creeping bentgrass. Molecules 25(18):4270. https://doi.org/10.3390/molecules25184270

Liu HT, Huang WD, Pan QH et al (2006) Contributions of PIP2-specific-phospholipase C and free salicylic acid to heat acclimationinduced thermotolerance in pea leaves. J Plant Physiol. 163(4):405–416. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.04.027

Nayyar H, Kaur R, Kaur Singh SR (2014) γ-Aminobutyric acid (GABA) imparts partial protection from heat stress injury to rice seedlings by improving leaf turgor and upregulating osmoprotectants and antioxidants. J Plant Growth Regul 33:408–419. https://doi.org/10.1007/s00344-013-9389-6

Ramesh SA, Tyerman SD, Gilliham M, Xu B (2017) γ-Aminobutyric acid (GABA) signalling in plants. Cell Mol Life Sci 74:1577–1603. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2415-7

Roberts E, Frankel S (1950) gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic-acid. J Biol Chem 187(1):55–63.

Sagisaka S (1976) The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*. Plant Physiol 57 (2):308–309. https://doi.org/10.1104/pp.57.2.308

Sears SM, Hewett SJ (2021) Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance. Exp Biol Med 246(9):1069–1083. https://doi.org/10.1177/1535370221989263

Seifikalhor M, Aliniaeifard S, Hassani B et al (2019) Diverse role of γ-aminobutyric acid in dynamic plant cell responses. Plant Cell Rep 38(8):847–867. https://doi.org/10.1007/s00299-019-02396-z

Shi SQ, Shi Z, Jiang ZP et al (2010) Effects of exogenous GABA on gene expression of *Caragana intermedia* roots under NaCl stress: regulatory roles for H_2O_2 and ethylene production. Plant Cell Environ 33(2):149–162. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02065.x

Shkliarevskyi MA, Karpets YuV, Kolupaev YuE et al (2020) Calcium-Dependent Changes in Cellular Redox Homeostasis and Heat Resistance of Wheat Plantlets under Influence of Hemin (Carbon Monoxide Donor). Cytol Genet 54(6):522–530. https://doi.org/10.3103/S0095452720060109

Sita K, Kumar V (2020) Role of gamma amino butyric acid (GABA) against abiotic stress tolerance in legumes: a review. Plant Physiol Rep 25(4):654–663. https://doi.org/10.1007/s40502-020-00553-1

Smirnoff N, Cumbes QJ (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. Phytochem 28(4):1057–1060. https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80182-7

Steward FC (1949) γ-Aminobutyric acid: A constituent of the potato tuber? Science 110:439–440.

Suhel M, Husain T, Pandey A et al (2023) An appraisal of ancient molecule GABA in abiotic stress tolerance in plants, and its crosstalk with other signaling molecules. J Plant Growth Regul 42:614–629. https://doi.org/10.1007/s00344-022-10610-8

Tan M, Hassan MJ, Peng Y et al (2022) Polyamines metabolism interacts with γ-aminobutyric acid, proline and nitrogen metabolisms to affect drought tolerance of creeping bentgrass. Int J Mol Sci 23 (5):2779. https://doi.org/10.3390/ijms23052779

Tang M, Li Z, Luo L et al (2020) Nitric oxide signal, nitrogen metabolism, and water balance affected by γ-aminobutyric acid (GABA) in relation to enhanced tolerance to water stress in creeping bentgrass. Int J Mol Sci 21(20):7460. https://doi.org/10.3390/ijms21207460

Wang W, Liu S, Yan M (2022) Synthesis of γ-aminobutyric acid-modified chitooligosaccharide derivative and enhancing salt resistance of wheat seedlings. Molecules 27(10:3068. https://doi.org/10.3390/molecules27103068

Xing SG, Jun YB, Hau ZW, Liang LY (2007) Higher accumulation of γ-aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. Plant Physiol Biochem 45(8):560–556. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.05.007

Xu B, Sai N, Gilliham M (2021) The emerging role of GABA as a transport regulator and physiological signal. Plant Physiol 187(4):2005–2016. https://doi.org/10.1093/plphys/kiab347

Zeng W, Hassan MJ, Kanga D et al (2021) Photosynthetic maintenance and heat shock protein accumulation relating to γ-aminobutyric acid (GABA)-regulated heat tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). South Afr J Bot 141:405–413. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.05.028

Zhao Q, Ma Y, Huang X et al (2023) GABA Application enhances drought stress tolerance in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). Plants 12(13):2495. https://doi.org/10.3390/plants12132495

Zhou C, Dong W, Jin S et al (2022) γ-aminobutyric acid treatment induced chilling tolerance in postharvest peach fruit by upregulating ascorbic acid and glutathione contents at the molecular level. Front Plant Sci 13:1059979. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1059979

Надійшла в редакцію 01.12.23
Після доопрацювання 15.12.23
Прийнята до друку 18.03.24