

## УЧАСТЬ НІТРОГЕН ОКСИДУ У КЛІТИННИХ МЕХАНІЗМАХ АДАПТАЦІЇ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ДО ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ, ІНДУКОВАНИХ ДІЄЮ $\gamma$ -АМІНОМАСЛЯНОЇ КИСЛОТИ

І.В. ШАХОВ<sup>1,2</sup>, Т.О. ЯСТРЕБ<sup>1</sup>, Т.В. САХНО<sup>3</sup>, Ю.Є. КОЛУПАЄВ<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України, пр-т Героїв Харкова, 142, Харків, 61060, Україна

<sup>2</sup> Державний біотехнологічний університет, вул. Алчевських, 44, Харків, 61022, Україна

<sup>3</sup> Полтавський державний аграрний університет, вул. Сковороди, 1/3, Полтава, 36003, Україна

Автор для кореспонденції – Ю.Є. Колупаєв, e-mail: plant\_biology@ukr.net

$\gamma$ -Аміномасляна кислота (ГАМК) – один з ключових стресових метаболітів, що залучається у функціонування сигнальної мережі рослинних клітин. Проте її функціональні зв'язки з основними сигнальними молекулами, зокрема нітроген оксидом (NO), залишаються малодослідженими. Мета роботи полягала у з'ясуванні участі NO у реалізації стрес-протекторного впливу ГАМК на проростки пшениці (*Triticum aestivum* L., сорт Етана) за умов модельної посухи (дія 13 % ПЕГ 6000). Праймінг зернівок 0,5 мМ розчином ГАМК або 0,1 мМ розчином донора NO нітропрусиду натрію (НПН) підвищував енергію проростання, схожість насіння та вміст води у проростках за стресових умов. Також за обробки ГАМК і НПН пом'якшувався інгібувальний вплив посухи на накопичення біомаси коренів і пагонів. Осмотичний стрес спричиняв підвищення вмісту NO у пагонах, а праймінг ГАМК і НПН підсилював цей ефект. Обробка скавенджером нітроген оксиду метиленовим синім (МС – 0,1 мМ) усувала підвищення вмісту NO, спричинюване як стресом, так і дією ГАМК, а також нівелювала позитивний вплив ГАМК на ростові процеси. За дії ГАМК і НПН зростали загальна активність амілази у зернівках і вміст розчинних вуглеводів у пагонах за стресових умов, а МС усував вплив ГАМК на ці показники. За модельної посухи відбувалося зростання вмісту маркерів окиснювального стресу (супероксидного аніон-радикала, гідроген пероксиду і малонового діальдегіду) у пагонах, а попередня обробка зернівок ГАМК або НПН значно зменшувала ці ефекти. Осмотичний стрес викликав підвищення в пагонах активності каталази і гваяколпероксидази. Попередній праймінг ГАМК, НПН і МС не впливав на характер спричинюваних модельною посухою змін активності цих антиоксидантних ферментів. Водночас активність супероксиддисмутази не змінювалася після впливу модельної посухи, але попередня обробка насіння ГАМК, НПН і МС спричиняла підвищення активності ферменту. Праймінг насіння ГАМК і НПН

викликав зростання у пагонах загального вмісту фенольних сполук і сприяв збереженню пулу антоціанів за стресових умов, а обробка МС усувала такі ефекти. Зроблено висновок, що спричинюване праймінгом ГАМК посилення проростання зернівок та росту проростків за умов модельної посухи значною мірою зумовлено NO-опосередкованим модулюванням метаболізму вуглеводів і вторинних сполук.

**Ключові слова:**  $\gamma$ -аміномасляна кислота, нітроген оксид, окиснювальний стрес, антиоксидантна система, осмоліти, амілаза, стійкість до посухи, *Triticum aestivum*.

**Вступ.** В останні роки як окрему групу клітинних регуляторів функцій рослин розглядають речовини, що добре відомі в фізіології людини і тварин як нейромедіатори – учасники передачі нервового збудження: мелатонін, серотонін, дофамін, ацетилхолін і  $\gamma$ -аміномасляна кислота (ГАМК) (Akula, Mukherjee, 2020). На даний час ГАМК поряд з мелатоніном належить до найбільш активно досліджуваних нейромедіаторів рослин (Caspi et al., 2023; Lv et al., 2023; Wu et al., 2023). Вважається, що ГАМК поєднує функції стресового метаболіту та молекули, яка бере участь у міжклітинному і внутрішньоклітинному сигналінгу у рослин (Bor, Turkan, 2019; Caspi et al., 2023; Yuan et al., 2023). Сигнальні функції ГАМК поки що детально вивчені на прикладі вузького кола фізіологічних процесів, насамперед регуляції стану продихів та прискорення росту пилкових трубок (Bor, Turkan, 2019; Domingos et al., 2019). Водночас ГАМК розглядається як метаболіт, що відіграє важливу роль у багатьох адаптивних реакціях рослин. Зокрема, показано, що як сигнальна молекула, ГАМК бере участь у регуляції стійкості рослин до абіотичних стресів різної природи: екстремальних температур (Zeng et

al., 2021; Zhou et al., 2022), гіпоксії (Yuan et al., 2023), засолення (Ullah et al., 2023) та посухи (Zhao et al., 2023; Jurkonienė et al., 2025).

У відповідь на дію різних стресових чинників вміст ГАМК у рослинних клітинах істотно зростає. Так, за умов посухи підвищення кількості ендогенної ГАМК виявлено у різних видів рослин, зокрема, томатів, сої, квасолі, кунжуту (Li et al., 2021). Також інтенсивно накопичуються відомості про індукування екзогенною ГАМК стійкості рослин до дії стресорів різної природи. Встановлена здатність ГАМК впливати на такі важливі захисні системи рослин як антиоксидантна і осмопротекторна (Kolupaev et al., 2024a; Kozeko et al., 2024). Ймовірно, участь ГАМК в регуляції цих систем зумовлює її здатність істотно підвищувати посухо- і солестійкість рослин (Li et al., 2016; Badr et al., 2024). Наприклад, показано, що під впливом ГАМК у проростках конюшини за умов осмотичного стресу зростає вміст цукрів і осмотичний потенціал (Zhou et al., 2021). Обробка ГАМК підвищувала солестійкість рослин *Agrostis capillaris*, що також пов'язують з посиленням осмотичної регуляції, зумовленим накопиченням цукрів (Li et al., 2020). Останнім часом ГАМК розглядається як важлива молекула не лише для підвищення посухостійкості рослин, а й для посилення здатності насіння до проростання в умовах нестачі вологи (Zhou et al., 2021). Є дані про зв'язок між вмістом ендогенної ГАМК і схожістю насіння (Samarah Nezar et al., 2023). Особливий інтерес для посилення проростання зернівок і росту рослин в умовах посухи на ранніх стадіях розвитку становить праймінг насіння розчинами ГАМК (Sheteiwy et al., 2019; Zhou et al., 2021).

Згідно з сучасними гіпотезами, сигнальні ефекти ГАМК значною мірою реалізуються за рахунок її функціональної взаємодії з іншими сигнальними посередниками, зокрема, кальцієм, активними формами кисню (АФО) і нітроген оксидом (NO). Наприклад, встановлено, що розвиток стійкості рослин *Cucumis melo* до содового засолення, зумовлений дією екзогенної ГАМК, супроводжувався посиленням експресії гена однієї з основних форм НАДФН-оксидази (*RBOHD*) і транзиторним накопиченням гідроген пероксиду (Jin et al., 2019). Недавно нами показано, що індукуван-

ня теплостійкості проростків пшениці екзогенною ГАМК опосередковано кальційзалежним посиленням генерації АФО (Kolupaev et al., 2024b).

Участь нітроген оксиду у реалізації ефектів ГАМК досліджена меншою мірою. Є лише поодинокі дані, отримані методом інгібіторного аналізу, що вказують на залучення NO у формування адаптивних реакцій, індукованих ГАМК. Так, обробка ГАМК *Agrostis stolonifera*, яка підвищувала стійкість до осмотичного стресу, спричиняла посилення утворення NO, залежного від нітратредуктази та ферменту, подібного до NO синтази, а також залежне від NO-гомеостазу зростання активності антиоксидантних ферментів (Tang et al., 2020). Стрес-протекторна дія ГАМК на рослини *Cucumis melo* за содового засолення супроводжувалася підвищенням вмісту нітроген оксиду, а одночасна обробка рослин скавенджером NO 2-(4-карбоксіфеніл)-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-окси-3-оксидом (сРГІО) нівелювала ефекти ГАМК (Xu et al., 2021). Проте питання щодо залучення нітроген оксиду в реалізацію впливу ГАМК на проростання зернівок і ріст рослин на ранніх стадіях розвитку за умов осмотичних стресів залишається не дослідженим. Водночас досить давно на прикладі рослин різних видів встановлена здатність екзогенного NO посилювати проростання зернівок, поліпшувати осморегуляторні процеси і ріст проростків за дії посухи або сольового стресу (Duan et al., 2007; Sepehri, Rouhi, 2016; Yemets et al., 2019).

У зв'язку з викладеним метою роботи стало з'ясування ролі NO у реалізації стрес-протекторного впливу ГАМК на проростки пшениці (*Triticum aestivum* L.) за умов модельної посухи. Для цього досліджували вплив обробки насіння ГАМК, а також скавенджером нітроген оксиду метиленовим синім (МС) та його донором нітропрусидом натрію (НПН) на процес проростання зернівок, ріст проростків, вміст ендогенного нітроген оксиду та функціонування антиоксидантної і осмопротекторної систем за дії непронижного осмотика ПЕГ 6000.

**Матеріали і методи.** Для експериментів використовували насіння м'якої озимої пшениці сорту Етана (заявник – Deutsche Saatveredelung AG, Німеччина), що є одним з найбільш по-

ширених іноземних сортів, вирощуваних в Україні (<https://agroportal.ua/news/rastenienvodstvo/pazvano-naupropulyarnishi-sorti-pshenici-v-ukrajini>).

Зернівки знезаражували 5%-вим розчином NaClO впродовж 15 хв і восьмиразово промивали стерильною дистильованою водою. Зважаючи на те, що гідропраймінг сам по собі підвищує схожість насіння злаків (Kolupaev et al., 2024c), як контроль використовували зернівки, витримані впродовж 3 год у темному термостаті за температури 24 °С у склянках з дистильованою водою (співвідношення об'ємів 1 : 4). Зразки дослідних варіантів витримували впродовж 3 год у 0,5 мМ розчині ГАМК, 0,1 мМ розчині скавенджера NO метиленового синього (МС) (Zhang et al., 2006) або в суміші 0,5 мМ ГАМК та 0,1 мМ МС. В окремому варіанті зернівки обробляли 0,1 мМ розчином донора NO НПН. Режим обробки та оптимальні концентрації досліджуваних сполук були вибрані на основі результатів попередніх експериментів (Shakhov et al., 2024; 2025; Kolupaev et al., 2025a). Після гідропраймінгу (контрольний варіант) та обробки досліджуваними речовинами насіння висушували впродовж 24 год на скляній поверхні у темному термостаті за температури 24 °С та відносної вологості повітря 40 % до вихідної вологості (11–12 %).

Надалі по 80 приблизно однакових зернівок переносили у чашки Петрі на подвійні фільтри, які зволожували 8 мл дистильованої води (контроль) або 8 мл 13 % ПЕГ 6000 (модельна посуха). Насіння пророщували у темному термостаті за 24 °С впродовж 3 діб. Через 2 та 3 доби оцінювали показники енергії проростання та схожості, відповідно. Пророслими вважали зернівки з пагонами, що за довжиною перевищували розмір зернівки або були на його рівні. Також через 3 доби пророщування оцінювали біомасу коренів та пагонів та вміст води у пагонах. Для всіх біохімічних аналізів (крім визначення активності амілази) використовували тільки пагони 3-добових проростків, оскільки корені було неможливо без ушкоджень відмити від залишків осмотика, які могли позначитися на результатах аналізів.

Вміст води в пагонах визначали гравіметричним методом, висушуючи наважки масою

не менше 500 мг у сушильній шафі при температурі 103 °С впродовж 1,5–2 год (до сталої маси).

Вміст нітроген оксиду у пагонах визначали методом, описаним Zhou і співавт. (2005) з деякими модифікаціями. В основі методу перетворення NO, що міститься в рослинному матеріалі, на нітрит і визначення концентрації останнього у реакції Гріса. Наважку свіжозрізаного рослинного матеріалу гомогенізували на льоду в 50 мМ ацетатному буфері (рН 3,6) з додаванням 2 % ацетату цинку. Гомогенат центрифугували на центрифугі MPW 350R («MPW MedInstruments», Польща) за температури 2–4 °С при 8000 г впродовж 15 хв, потім до 10 мл супернатанту додавали 250 мг деревного вугілля. Суміш фільтрували через паперовий фільтр, після чого змішували 2 мл фільтрату з 1 мл 1%-вого реактиву Гріса в 12%-вій оцтовій кислоті. Через 30 хв визначали абсорбцію розчину на спектрофотометрі UV-1280 («Shimadzu», Японія) за довжини хвилі 530 нм. Як стандарт використовували розчини нітриту натрію. Вміст NO виражали нмоль/г сирової маси.

Загальну активність амілази визначали у зернівках через 48 год від початку їх пророщування з використанням крохмалевмісних агарових пластинок та програмного забезпечення ImageJ (Yastreba et al., 2025). Аналіз проводили через 48 год після початку замочування насіння. Зернівки розрізали ланцетом, половини без зародків розміщували зрізом вниз в чашках Петрі на пластини, що склалися з 1 % агару та 0,2 % крохмалю. Зразки інкубували в термостаті при 24 °С впродовж 3 год. Після цього гелі заливали 10 мл розведеного розчину Люголя (0,04 % I<sub>2</sub> у 0,1 % KI), надлишок розчину через 5 хв видаляли автопіпеткою, а зображення фотографували за допомогою горизонтальної камери Samsung SM-N9750 на склі, покритому папером, з нижнім підсвічуванням. Отримані фотографії аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageJ (версія 1.54 g). Кольорові зображення перетворювали на одноканальні напівтонові, щоб видалити мінливість, спричинену кольоровою інформацією, і аналізувати різницю в інтенсивності забарвлення. На попередньо оброблених зображеннях за допомогою інструментів вибору

ImageJ було створено маски освітлених ореолів навколо зернівок, виключаючи області зрізу самих зернівок (Yastreb et al., 2025). Площу пікселів вибраних областей було виміряно за допомогою інструментів ImageJ. Отримані результати переводили у мм<sup>2</sup>. Активність ферменту виражали в умовних одиницях (мм<sup>2</sup>) за годину.

Для визначення частки β-амілази у загальній активності амілази в окремому варіанті аналізу до крахмалевмісного агару додавали 2 мМ ЕДТА, що пригнічує α-амілазу (Zhang et al., 2010).

Сумарний вміст розчинних вуглеводів у пагонах проростків визначали методом Морісароє (Kefu et al., 2003) з модифікаціями. Рослинний матеріал гомогенізували у дистильованій воді, гомогенат кип'ятили на водяній бані впродовж 10 хв. Для осадження білків до гомогенату додавали однакові об'єми 30 % ZnSO<sub>4</sub> та 15 % K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. Проби перемішували, фільтрували через паперові фільтри та розбавляли дистильованою водою у необхідну кількість разів. Потім 1 мл розбавленого екстракту змішували з 3 мл антронного реактиву. Розчин порівняння замість екстракту містив 1 мл дистильованої води. Проби кип'ятили на водяній бані протягом 7 хв, охолоджували та визначали абсорбцію при 610 нм. Як стандарт використовували D-глюкозу.

Вміст проліну визначали методом, описаним Bates і співавт. (1973) із незначними модифікаціями. Наважки пагонів гомогенізували в дистильованій воді, після чого гомогенат відразу кип'ятили впродовж 10 хв на водяній бані. Проби охолоджували, екстракти фільтрували через паперові фільтри. У реакційних пробірках змішували по 1 мл екстракту, льодяної оцтової кислоти та нінгідринного реактиву. Пробірки, закриті ковпачками з фольги, нагрівали на киплячій водяній бані впродовж 1 год. Абсорбцію визначали за довжини хвилі 520 нм. Стандартом слугував L-пролін.

Для визначення загального вмісту фенольних сполук та антоціанів, пагони гомогенізували в 10 мл 80 % етанолу, екстрагували впродовж 20 хв при кімнатній температурі та центрифугували при 8000 g впродовж 15 хв. Для аналізу вмісту фенольних сполук у реак-

ційні пробірки вносили 0,5 мл супернатанту, 8 мл дистильованої води та 0,5 мл реактиву Фоліна, перемішували та через 3 хв додавали 1 мл 10 % карбонату натрію. Через 1 год вимірювали абсорбцію реакційної суміші при 725 нм (Bobo-García et al., 2015). Вміст фенольних сполук виражали в мкмольях галової кислоти на грам сухої речовини.

Перед визначенням вмісту антоціанів супернатант підкислювали HCl до кінцевої концентрації 1 %. Абсорбцію визначали при 530 нм (Nogués, Baker, 2000). Результати виражали в умовних одиницях як показник абсорбції у розрахунку на грам сухої речовини

При визначенні активності антиоксидантних ферментів наважки пагонів гомогенізували на льоду в 0,15 М К, Na-фосфатному буфері (pH 7,6), що містив 0,1 мМ ЕДТА і 1 мМ дитіотрейтолу (Kolupaev et al., 2024b). Гомогенат центрифугували при 8000 g впродовж 10 хв за температури 2–4 °C.

Загальну активність супероксиддисмутази (СОД) визначали при рН реакційної суміші 7,6, використовуючи метод, в основі якого здатність ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніон-радикали, що утворюються внаслідок аеробної взаємодії НАДН та феназинметосульфату. Активність каталази визначали при рН реакційної суміші 7,0 за кількістю гідроген пероксиду, розкладеного за одиницю часу. Активність гваяколпероксидази аналізували, використовуючи як донор гідрогену гваякол, а як субстрат – Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Попередньо за допомогою К, Na-фосфатного буферу рН реакційної суміші доводили до 6,2. Абсорбцію продукту реакції визначали за довжини хвилі 470 нм.

Вміст білка в пробах визначали за Бредфорд (Bradford, 1976), використовуючи як стандарт бичачий сироватковий альбумін.

Генерацію супероксидного аніон-радикала пагонами проростків визначали за методом, в основі якого взаємодія О<sub>2</sub><sup>•-</sup> з нітросинім тетразолієм з утворенням формагану (Karpets et al., 2012). По 12 пагонів поміщали на 1 год в бюкси з 5 мл 0,1 М К, Na-фосфатного буферу (pH 7,6), що містив 0,05 % нітросинього тетразолію, 10 мкМ ЕДТА і 0,1 % тритону X-100. Після закінчення експозиції пагони обережно вилучали з бюксів та вимірювали

світлопоглинання інкубаційного розчину за довжини хвилі 530 нм. Показник генерації  $O_2^{\cdot -}$  виражали в умовних одиницях ( $A_{530} \cdot 1000 / \text{маса сирої речовини пагонів}$ ).

Для визначення вмісту гідроген пероксиду наважки пагонів на льоду гомогенізували в 5%-вому розчині трихлороцтової кислоти (ТХО). Проби центрифугували при 8000 г впродовж 10 хв за температури 2–4 °С і в супернатанті визначали концентрацію  $H_2O_2$  за допомогою феритіоціанатного методу (Sagisaka, 1976).

Для аналізу вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) (переважно малоновий діальдегід – МДА) наважки рослинного матеріалу гомогенізували в розчині 0,25%-вому тіобарбітурової кислоти у 10 % ТХО (дослідна проба) або в розчині лише 10%-вому ТХО (контроль). Суміші кип'ятили в пробірках, закритих ковпачками із фольги, на водяній бані впродовж 30 хв. Після цього охолоджували та центрифугували впродовж 15 хв при 10000 г. Абсорбцію супернатанту вимірювали за довжини хвилі 532 нм (основний сигнал) і 600 нм (неспецифічне світлопоглинання, величину якого віднімали від основного результату  $A_{532}$ ) (Kolupaev et al., 2024d). Вміст МДА розраховували за молярним коефіцієнтом екстинкції  $1,55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  і виражали в нмоль/г сирої речовини.

При визначенні впливу обробки ГАМК, МС та НПН на проростання насіння та біомасу проростків кожна повторність складалася з 80 зернівок або проростків, а в кожному варіанті досвіду було не менше трьох повторень. При проведенні біохімічних аналізів (за винятком визначення активності амілази) кожна наважка складалася не менш ніж з 12 пагонів, аналізи проводили у 3-разовому повторенні. Визначення активності амілази у проводили у 5-разовому повторенні, кожне в окремій чашці Петрі, яка містила всі варіанти досвіду, кожен з них з чотирма зернівками. Для визначення значимості відмінностей між варіантами за досліджуваними показниками використовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) із подальшими множинними порівняннями за методом Тьюкі.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Модельна посуха спричиняла істотне зни-

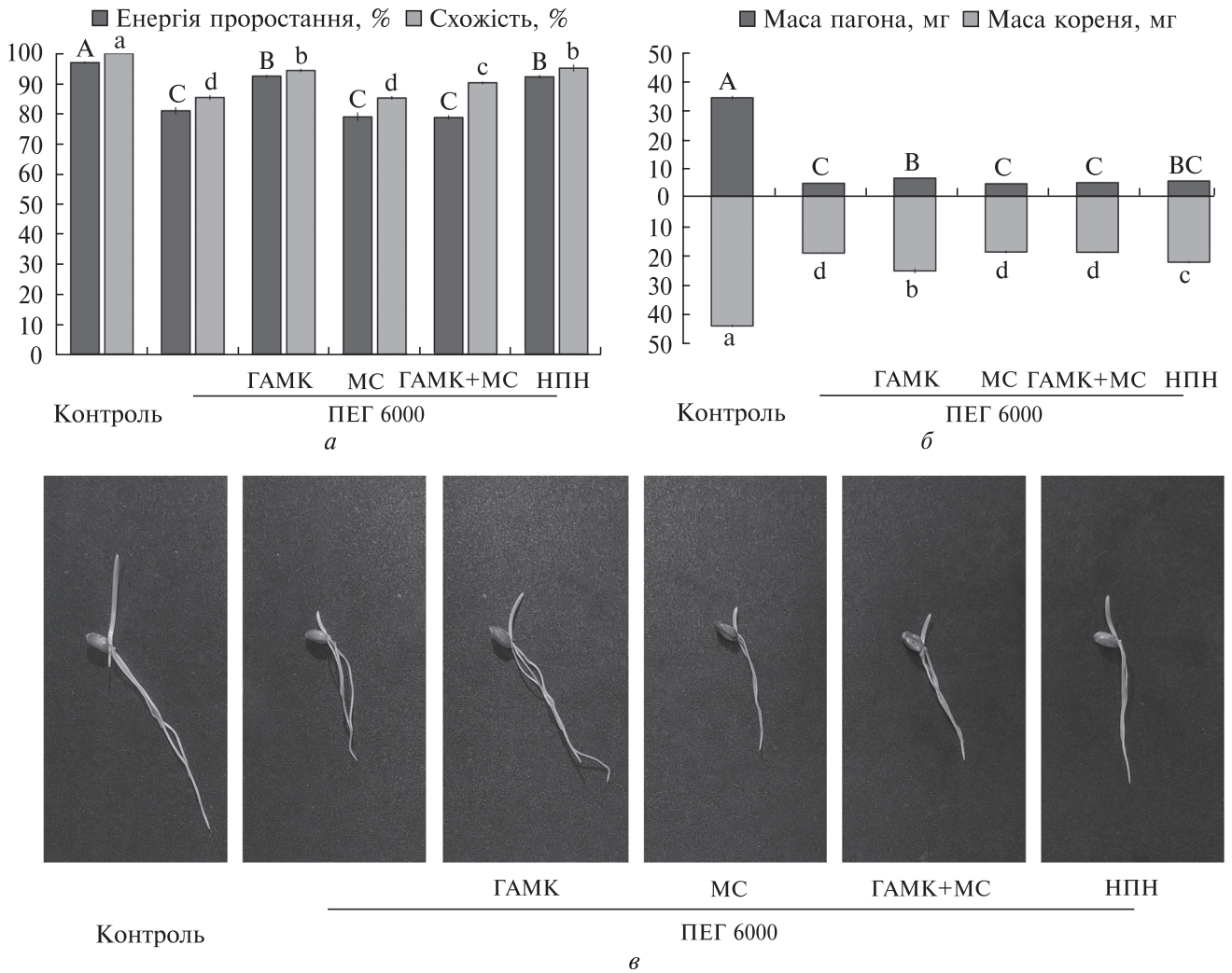
ження енергії проростання і схожості насіння пшениці (рис. 1, *a*). Праймінг зернівок ГАМК помітно підвищував ці показники. Обробка скавенджером NO МС істотно не впливала на процес проростання насіння, однак при поєднанні з ГАМК вона повністю усувала позитивний вплив останньої на енергію проростання і схожість зернівок (рис. 1, *a*). Обробка зернівок донором NO НПН підвищувала показники їх проростання, причому за величиною ефекти НПН були практично такими самими, як за праймінгу зернівок ГАМК.

За пророщування зернівок на середовищі з додаванням 13 % ПЕГ 6000 відзначалося багаторазове зменшення біомаси пагонів порівняно з контролем (рис. 1, *b*, *в*). Праймінг ГАМК вірогідно підвищував біомасу пагонів за стресових умов. Обробка зернівок МС не впливала на величину біомаси пагонів на фоні дії модельної посухи, однак вона повністю усувала позитивний вплив ГАМК на накопичення біомаси за стресових умов. За обробки насіння донором NO НПН дещо пом'якшувалася інгібувальний вплив осмотичного стресу, однак цей ефект не був значимим за  $p \leq 0,05$  (рис. 1, *b*).

Маса коренів проростків за дії модельної посухи зменшувалася у понад два рази (рис. 1). Обробка ГАМК істотно пом'якшувала ефект пригнічення росту коренів. За впливу МС ріст коренів проростків за стресових умов не змінювався, а при комбінований обробці ГАМК і МС позитивний вплив ГАМК на ріст коренів не проявлявся. Під впливом донора нітроген оксиду відзначалося посилення росту коренів на фоні стресу, однак цей ефект був меншим порівняно з дією праймінгу ГАМК (рис. 1, *b*, *в*).

Модельна посуха призводила до істотного (майже на 13 %) зниження вмісту води у пагонах (рис. 2). Попередня обробка зернівок ГАМК зменшувала цей негативний ефект посухи. Водночас за обробки зернівок скавенджером NO МС вміст води у пагонах на фоні посухи не змінювався, проте така обробка дещо зменшувала вплив ГАМК на оводненість тканин. Донор нітроген оксиду НПН так само як ГАМК зменшував негативний вплив осмотичного стресу на вміст води у пагонах (рис. 2).

Отже в цілому праймінг насіння ГАМК сприяв проростанню зернівок пшениці та росту



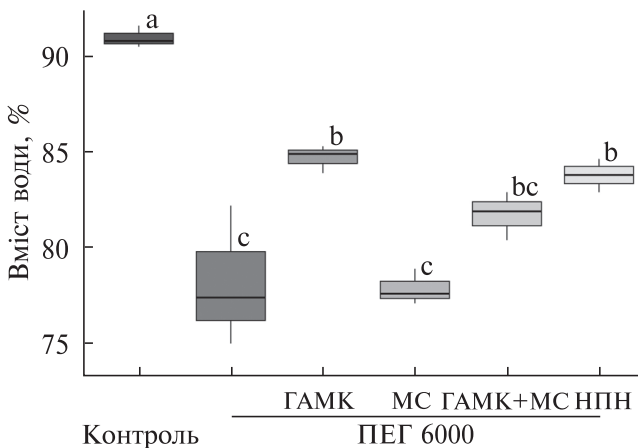
**Рис. 1.** Енергія проростання, схожість зернівок пшениці (а), маса органів проростків (б) і фото їх типових зразків (в) за дії модельної посухи (ПЕГ 6000 – 13 %), ГАМК (0,5 мМ), МС (0,1 мМ) і НПН (0,1 мМ). Однаковими латинськими літерами позначені величини, між якими немає різниці, вірогідної за  $p \leq 0,05$

проростків на фоні модельної посухи, а також збільшував оводненість тканин. Всі ці ефекти ГАМК помітно зменшувалися під впливом скавенджера NO МС, що вказує на залучення нітроген оксиду як посередника у реалізацію стрес-протекторного впливу ГАМК. Примітно, що праймінг зернівок донором NO НПН чинив позитивні ефекти на проростання зернівок, біомасу проростків та вміст води в них, які були схожі з дією ГАМК (рис. 1, 2).

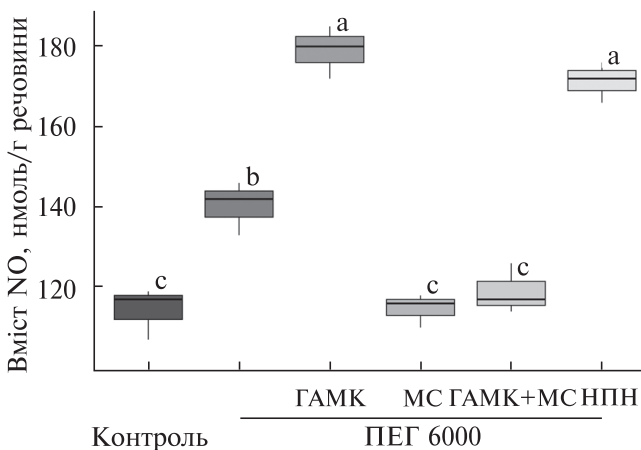
На участь нітроген оксиду в адаптації проростків пшениці до посухи та реалізації впливу ГАМК на посухостійкість вказують і результати прямого визначення вмісту NO в пагонах (рис. 3).

Осмотичний стрес спричиняв значиме за  $p \leq 0,05$  підвищення вмісту NO у пагонах (рис. 3). Однак у варіанті з поєднанням впливу посухи та праймінгу ГАМК таке підвищення було значно більшим, ніж у варіанті з впливом лише осмотичного стресу. У присутності скавенджера NO МС не проявлявся вплив посухи та її поєднання з праймінгом ГАМК на вміст нітроген оксиду (рис. 3). Проте обробка насіння донором NO НПН викликала зростання кількості NO у пагонах.

Зважаючи на важливу роль амілази у гідролізі запасного крохмалю і надходженні розчинних вуглеводів в органи проростків при проростанні насіння, оцінювали її активність



**Рис. 2.** Вміст води у пагонах 72-годинних проростків пшениці за дії модельної посухи (ПЕГ 6000 – 13 %), ГАМК (0,5 мМ), МС (0,1 мМ) і НПН (0,1 мМ). Однаковими латинськими літерами над коробками Тьюкі позначені величини, між якими немає різниці, вірогідної за  $p \leq 0,05$



**Рис. 3.** Вміст нітроген оксиду в пагонах 72-годинних проростків пшениці за дії модельної посухи (ПЕГ 6000 – 13 %), ГАМК (0,5 мМ), МС (0,1 мМ) і НПН (0,1 мМ). Однаковими латинськими літерами над коробками Тьюкі позначені величини, між якими немає різниці, вірогідної за  $p \leq 0,05$

на зрізах зернівок через 48 год від початку їх пророщування (рис. 4).

Посуха практично не впливала на активність амілази у зернівках (рис. 4). За попередньої обробки зернівок ГАМК спостерігалось істотне підвищення активності ферменту. Однак такий ефект ГАМК повністю усувався дією скавенджера NO МС. Проте праймінг зернівок 0,1 мМ донором NO НПН призводив до істотного зростання загальної активності амі-

лази і його кількісний ефект значно перевищував дію ГАМК (рис. 3). Все це вказує на можливу участь NO як посередника у стрес-протекторній дії ГАМК. Слід зазначити, що активність  $\beta$ -амілази, яку ідентифікували у зрізах зернівок пшениці в присутності інгібітору  $\alpha$ -амілази (2 мМ ЕДТА), становила не більше 10–12 % від загальної активності амілази. Зважаючи на це, кількісне вимірювання  $\beta$ -амілази не проводили, вважаючи, що основна частка при вимірюванні загальної активності ферменту у зернівках є активністю  $\alpha$ -амілази.

Підвищення активності амілази у зернівках під впливом ГАМК могло бути принаймні однією з причин підвищення вмісту цукрів у пагонах (рис. 5, a). Посуха спричиняла зниження вмісту цукрів у пагонах порівняно з контролем, проте обробка зернівок ГАМК не тільки усувала цей ефект посухи, а й спричиняла зростання кількості розчинних вуглеводів до величин, вищих від контрольного варіанта. Обробка скавенджером нітроген оксиду МС частково нівелювала вплив ГАМК на вміст цукрів у пагонах проростків. Водночас під впливом донора NO НПН вміст цукрів у пагонах за умов модельної посухи істотно зростав (рис. 5, a).

Поряд з цукрами (Kiriziy et al., 2024) одним з основних осмолітів рослинних клітин, необхідних для адаптації до посухи, вважається пролін (Ghosh et al., 2022). У наших експериментах вміст проліну у пагонах під впливом модельної посухи зростав більш ніж утричі. Однак обробка зернівок ГАМК, МС, їх комбінацією, а також НПН істотно не позначалася на величині вмісту проліну за стресових умов (рис. 5, б).

Крім цукрів і проліну важливими мультифункціональними стресовими метаболітами, що виконують антиоксидантні, осморегуляторні та мембранопротекторні функції, є вторинні метаболіти (Vabenko et al., 2019; Yadav et al., 2021; Kolupaev et al., 2023a).

Під впливом модельної посухи загальний вміст фенольних сполук у пагонах проростків істотно не змінювався (рис. 6, a). Праймінг зернівок ГАМК перед їх пророщуванням за умов посухи спричиняв помітне зростання вмісту фенольних речовин. Обробка насіння МС сама по собі слабо впливала на вміст фенольних сполук, але усувала їх накопичення під впливом ГАМК. Обробка НПН, як дія ГАМК,

істотно підвищувала загальний вміст фенольних сполук у пагонах проростків пшениці.

За умов посухи різко знижувався вміст антоціанів у пагонах проростків (рис. 6, б), що може бути пов'язане з їх інтенсивним окисненням за стресових умов. Попередня обробка зернівок ГАМК стабілізувала вміст антоціанів у пагонах до контрольного рівня. Обробка скавенджером NO МС практично повністю усувала цей ефект ГАМК. За дії донора NO НПН вміст антоціанів за умов посухи помітно підвищувався.

Вплив модельної посухи і досліджуваних сполук на активність ключових антиоксидантних ферментів у пагонах проростків виявився неоднозначним. Так, посуха істотно не впливала на активність СОД (рис. 7, а). Попередня обробка зернівок ГАМК спричиняла підвищення активності СОД за умов посухи. Істотне зростання активності ферменту спостерігалось і у варіанті з обробкою зернівок МС, а також його комбінацією з ГАМК. Вищі від контролю і варіанта з посухою величини активності СОД відзначалися і за обробки зернівок НПН.

Активність КАТ у пагонах проростків зростала у відповідь на дію модельної посухи (рис. 7, б). Однак обробка насіння жодною з досліджуваних сполук не модифікувала ефектів посухи. Схожа картина спостерігалась і з активністю ГПО: вона зростала за впливу посухи, однак обробка ГАМК, МС, їх комбіна-

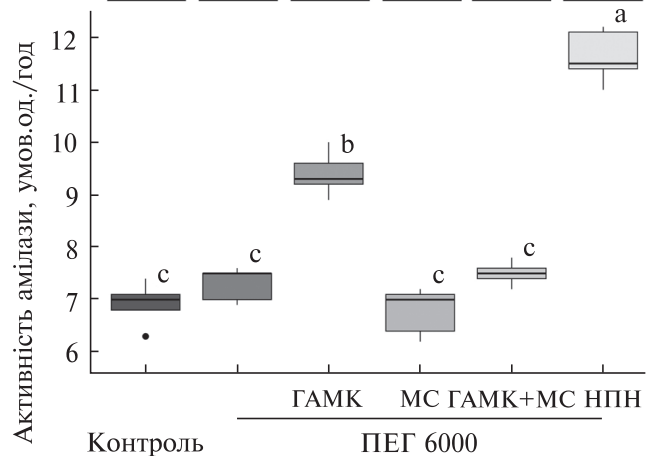
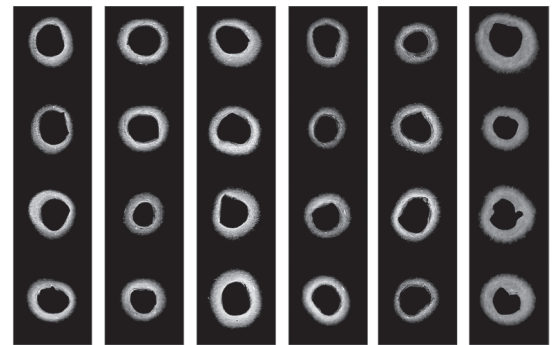


Рис. 4. Загальна активність амілази та типовий приклад її візуалізації за дії модельної посухи (ПЕГ 6000 – 13 %), ГАМК (0,5 мМ), МС (0,1 мМ) і НПН (0,1 мМ). Однаковими латинськими літерами над коробками Тьюкі позначені величини, між якими немає різниці, вірогідної за  $p \leq 0,05$

цією, а також НПН не спричиняла додаткових змін активності ферменту (рис. 7, в).

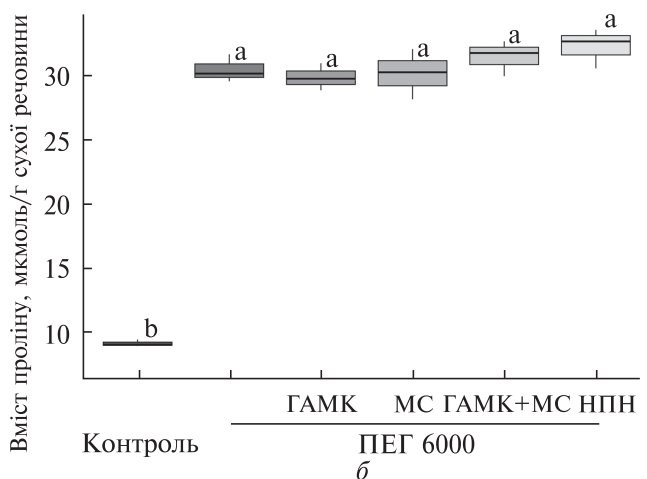
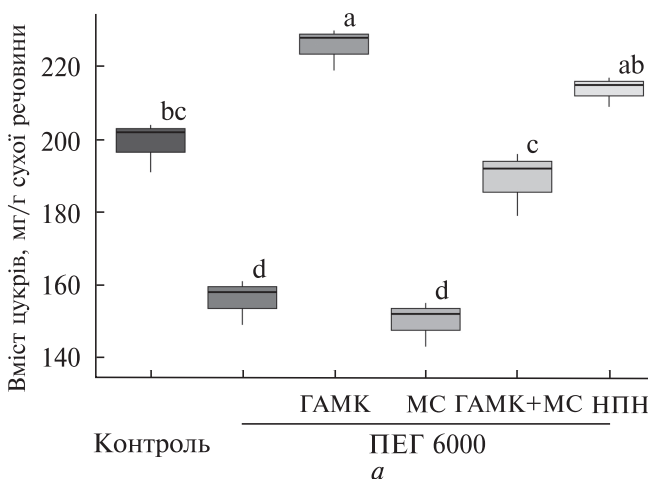
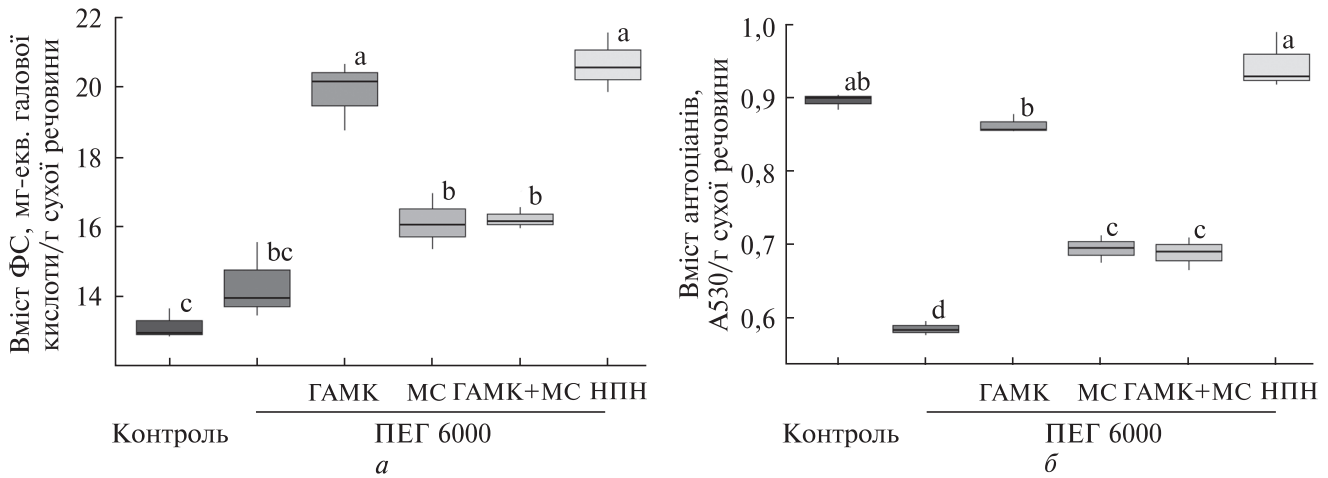


Рис. 5. Вміст цукрів (а) і проліну (б) у пагонах проростків пшениці за дії модельної посухи (ПЕГ 6000 – 13 %), ГАМК (0,5 мМ), МС (0,1 мМ) і НПН (0,1 мМ). Однаковими латинськими літерами над коробками Тьюкі позначені величини, між якими немає різниці, вірогідної за  $p \leq 0,05$



**Рис. 6.** Загальний вміст фенольних сполук (ФС) (а) і кількість антоціанів (б) у пагонах проростків пшениці за дії модельної посухи (ПЕГ 6000 – 13 %), ГАМК (0,5 мМ), МС (0,1 мМ) і НПН (0,1 мМ). Однаковими латинськими літерами над коробками Тьюкі позначені величини, між якими немає різниці, вірогідної за  $p \leq 0,05$

Незважаючи на неоднозначність впливу ГАМК та донора і скавенджера NO на активність досліджуваних антиоксидантних ферментів, за дії ГАМК і НПН відзначалося зменшення показників розвитку окиснювального стресу у пагонах проростків. Так, посуха спричиняла посилення генерації супероксидного аніон-радикала пагонами проростків (рис. 8, а). Обробка ГАМК помітно пом'якшувала вплив посухи на генерацію  $O_2^{\cdot-}$ . Натомість за дії скавенджера NO МС відзначалося посилення утворення супероксидного аніон-радикала і часткове усунення впливу ГАМК на цей процес. Донор NO НПН істотно зменшував генерацію супероксидного аніон-радикала пагонами проростків за умов модельної посухи (рис. 8, а).

Під впливом посухи у пагонах проростків зростав вміст гідроген пероксиду (рис. 8, б). Праймінг ГАМК зменшував прояв цього ефекту окиснювального стресу, а попередня обробка МС, навпаки, підвищувала вміст  $H_2O_2$  і повністю усувала зменшення його кількості, спричинюване дією ГАМК. Праймінг донором NO НПН призводив до істотного зниження вмісту гідроген пероксиду у пагонах за умов посухи.

Вміст кінцевого продукту ПОЛ (МДА), як і інших маркерів окиснювального стресу, істотно зростав під впливом модельної посухи (рис.

8, в). Обробка зернівок ГАМК пом'якшувала цей негативний ефект посухи. Обробка МС, навпаки, підсилювала спричинюване посухою накопичення МДА в пагонах проростків пшениці і значною мірою нівелювала зменшення цього показника за впливу ГАМК. Праймінг зернівок пшениці НПН значно зменшував спричинюване посухою накопичення МДА у пагонах проростків (рис. 8, в).

Отже, отримані результати свідчать, що обробка зернівок пшениці ГАМК істотно посилювала їх проростання за умов осмотичного стресу і підвищувала здатність проростків до накопичення біомаси і підтримання оводненості тканин за дії модельної посухи. За кілька останніх років різними науковими колективами показане підвищення посухо- і солестійкості зернових злаків екзогенною ГАМК (Sheteiwy et al., 2019; Ashraf et al., 2024; Koluраєv et al., 2024d; Al Ghafri et al., 2025; Shakhov et al., 2025). Новим аспектом даної роботи є експериментальне підтвердження участі NO в індукуванні проростання насіння пшениці і формуванні посухостійкості проростків при праймінгу зернівок ГАМК. При цьому роль нітроген оксиду була доведена поєднанням трьох експериментальних підходів: використанням скавенджера NO МС, безпосереднім визначенням вмісту NO у пагонах проростків і відтворенням ряду стрес-протекторних ефек-

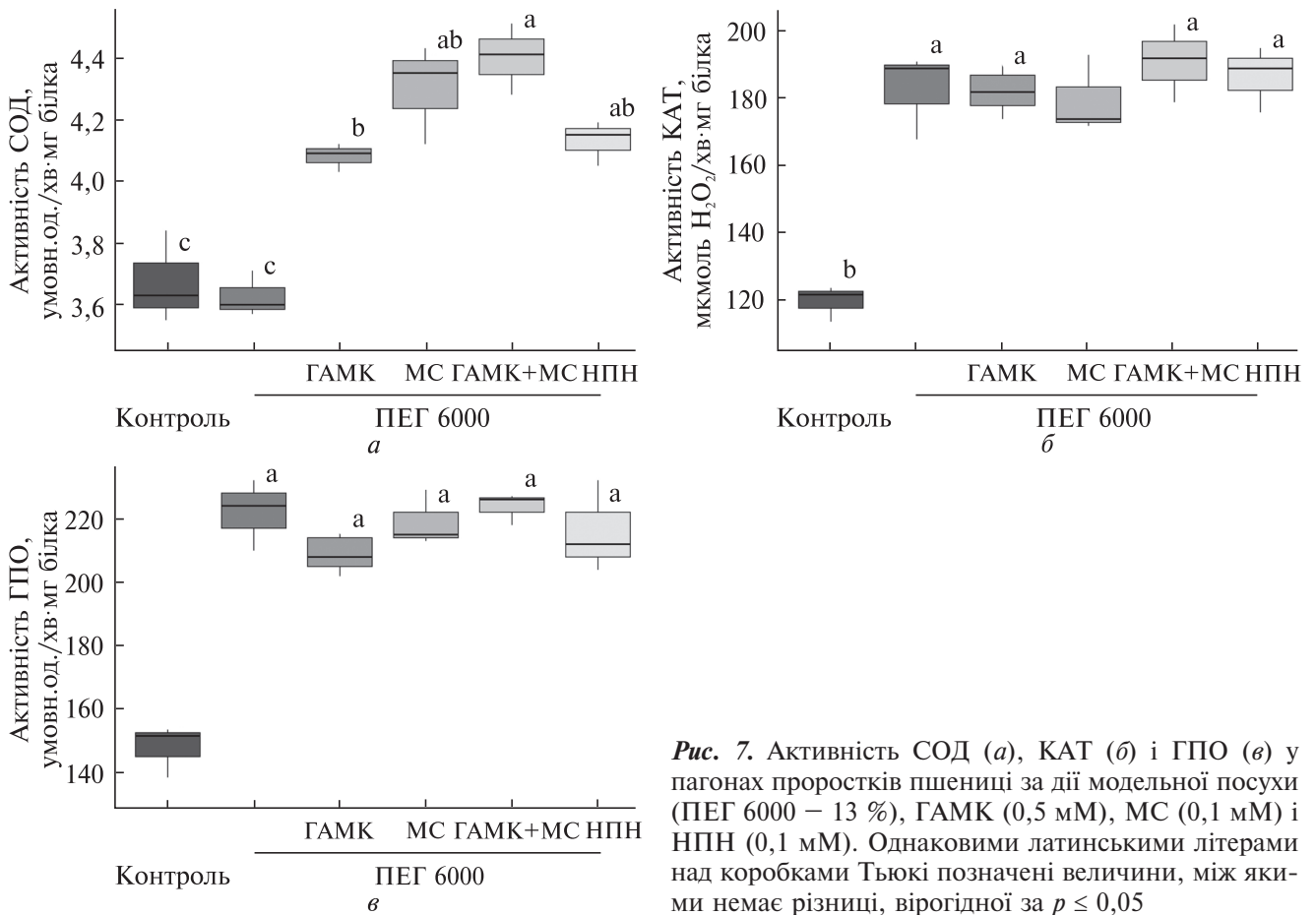


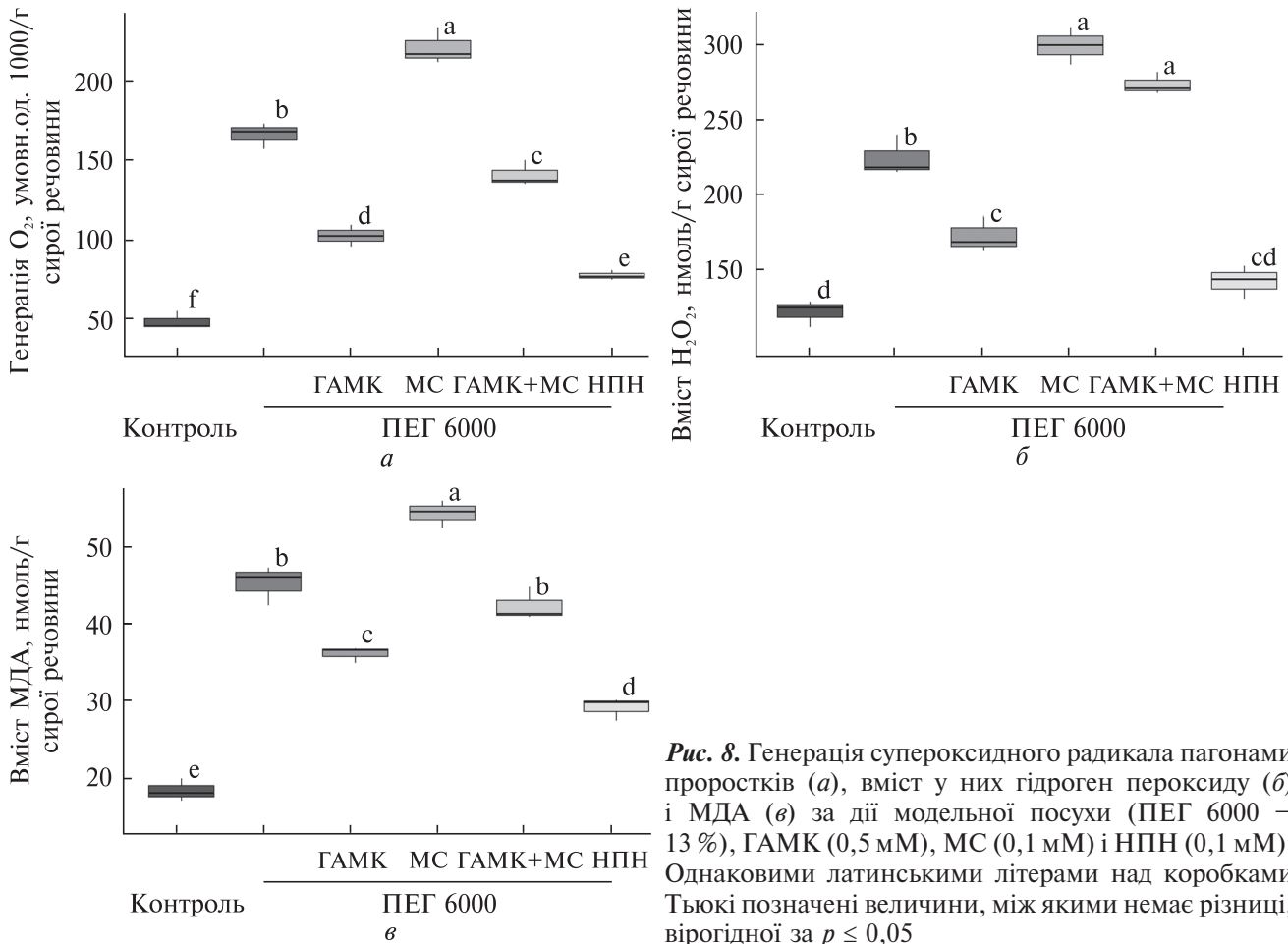
Рис. 7. Активність СОД (а), КАТ (б) і ГПО (в) у пагонах проростків пшениці за дії модельної посухи (ПЕГ 6000 – 13 %), ГАМК (0,5 мМ), МС (0,1 мМ) і НПН (0,1 мМ). Однаковими латинськими літерами над коробками Тьюкі позначені величини, між якими немає різниці, вірогідної за  $p \leq 0,05$

тів ГАМК обробкою насіння пшениці донором NO НПН. Нам відома лише одна робота, виконана на рослинах пшениці, в якій з використанням скавенджера NO РТЮ показана участь нітроген оксиду в індуванні солестійкості дією ГАМК (Khanna et al., 2021). Однак у даній роботі застосовувалась фоліарна обробка ГАМК 30-денних рослин, тобто не досліджувався її вплив на проростання зернівок і стійкість рослин на ранніх фазах розвитку.

У нашому дослідженні на роль нітроген оксиду як сигнального посередника у реалізації стрес-протекторної дії ГАМК вказує практично повне усунення позитивного впливу праймінгу насіння ГАМК на проростання зернівок, ріст проростків за стресових умов, вміст в них води за одночасної обробки скавенджером NO МС (рис. 1, 2). Також виявлено зростання ендogenous вмісту NO у пагонах 3-добових проростків за дії ГАМК і відсутність прояву такого ефекту в присутності МС

(рис. 3). Водночас обробка зернівок НПН призводила до зростання в пагонах вмісту ендogenous NO і відтворювала більшість фізіологічних ефектів, спричинюваних дією ГАМК.

Ймовірно, одним з найбільш ранніх ефектів праймінгу насіння ГАМК є підвищення під його впливом активності амілази у зернівках (рис. 4). Схожі ефекти ГАМК зареєстровані і на прикладі деяких інших видів рослин. Так, під впливом ГАМК показано дозозалежне підвищення активності  $\alpha$ -амілази, посилення експресії її гена та зниження вмісту крохмалю у зернівках ячменю (Sheng et al., 2018). У цій же роботі показаний зв'язок між зростанням ендogenous вмісту ГАМК у зернівках та активністю амілази у них. Також виявлено, що обробка ГАМК насіння білої конюшини (*Trifolium repens*) за умов сольового стресу спричиняла посилення гідролізу крохмалю, зумовлене зростанням активності амілази (Sheteiwy et al., 2019). У наших експериментах вперше показано ін-



**Рис. 8.** Генерация супероксидного радикала пагонами проростків (а), вміст у них гідроген пероксиду (б) і МДА (в) за дії модельної посухи (ПЕГ 6000 – 13%), ГАМК (0,5 мМ), МС (0,1 мМ) і НПН (0,1 мМ). Однаковими латинськими літерами над коробками Тьюкі позначені величини, між якими немає різниці, вірогідної за  $p \leq 0,05$

гібіторним методом участь NO у підвищенні активності амілази за дії на зернівки ГАМК (рис. 4). Відсутність підвищення активності ферменту у варіанті з одночасною обробкою зернівок ГАМК і скавенджером NO МС вказує на роль нітроген оксиду як посередника у реалізації такого ефекту ГАМК. Важливо, що екзогенний NO також спричиняв підвищення активності амілази у зернівках, причому більше за величиною порівняно з дією ГАМК. Механізми NO-опосередкованого підвищення активності амілази за дії ГАМК залишаються неясними. Проте, в літературі є дані про спроможність NO підвищувати активність амілази у зернівках. Зокрема, досить давно було показано підвищення активності амілази у зернівках пшениці під впливом НПН за умов сольового стресу (Zheng et al., 2009). Цей ефект автори розглядають як один з механізмів підвищення солестійкості проростків. Також показано

здатність донора NO НПН підвищувати активність ферменту у зернівках кукурудзи (Patel et al., 2017). Проте конкретні механізми впливу нітроген оксиду на активність амілази залишаються невідомими.

Підвищення активності амілази у зернівках під впливом ГАМК може бути однією з причин зростання вмісту розчинних вуглеводів у пагонах проростків (рис. 5, а). Варто зауважити, що сам по собі вплив модельної посухи спричиняв зниження вмісту цукрів у пагонах за відсутності істотних змін активності амілази. Однією з ймовірних причин такого ефекту може бути посилення витрат розчинних вуглеводів як субстрату для процесів дихання та синтезу інших необхідних для адаптації до зневоднення метаболітів, зокрема, проліну. Ефекти зростання інтенсивності дихання, як і накопичення стресових метаболітів неуглеводної природи за умов зневоднення, описані на прикладі різ-

них видів рослин, у тому числі пшениці (Zagdanska, 1995; Farooq et al., 2024).

Спричинюване обробкою ГАМК підвищення вмісту у пагонах розчинних вуглеводів, як і зростання активності амілази, залежало від NO-статусу рослинних клітин, хоча обробка МС лише частково усувала спричинюване ГАМК зростання вмісту цукрів у пагонах (рис. 5, а). Не виключено, що вміст цукрів під впливом ГАМК регулюється комплексом процесів, серед яких є процеси залежні і не залежні від NO. В цілому ж, напевно можна вважати, що підвищення вмісту розчинних вуглеводів у тканинах є однією з важливих складових впливу ГАМК на стійкість рослин до осмотичних стресів. Подібні ефекти спостерігалися за різних способів обробки ГАМК (надходження через корені або праймінг насіння) за умов модельної посухи (вплив ПЕГ 6000) або/та засолення у проростків тритикале і пшениці (Kolupaev et al., 2024d; Shakhov et al., 2025). Праймінг ГАМК насіння білої конюшини також викликав зростання вмісту цукрів за умов сольового стресу (Cheng et al., 2018; Sheteiyu et al., 2019). Участь NO в спричинюваних ГАМК змінах вмісту цукрів у цих роботах спеціально не досліджувалася. Водночас показано, що за умов сольового стресу праймінг насіння пшениці донором NO НПН спричиняв зниження вмісту крохмалю і підвищення вмісту цукрів (Zheng et al., 2009). У наших експериментах також виявлено підвищення вмісту цукрів у пагонах проростків пшениці за умов осмотичного стресу під впливом праймінгу насіння НПН (рис. 5, а).

Як уже зазначалося, поряд з цукрами одним з важливих осмолітів рослинних клітин вважається пролін (Mansour, Salama, 2020; Dubrovna et al., 2022a; 2022b; Ghosh et al., 2022). Пролін і ГАМК тісно пов'язані між собою метаболічно і функціонально. Обидві сполуки синтезуються з одного субстрату – глутамату (Pál et al., 2018). Відомо, що екзогенна ГАМК здатна підвищувати вміст ендогенної ГАМК за рахунок активації ГАМК-шунту (Li et al., 2021). Водночас збільшення пулу ГАМК і глутамату може спричинити і посилення синтезу проліну (Kolupaev et al., 2025b). Однак дані щодо впливу екзогенної ГАМК на вміст проліну у рослин за стресових умов досить су-

перечливі. Так, показано, що довготривалий (впродовж 18 год) праймінг насіння пшениці 1 мкМ ГАМК спричиняв підвищення вмісту проліну у листках рослин за умов посухи (Al Ghafri et al., 2025). Обробка ГАМК проростків пшениці шляхом її надходження через корені підвищувала за умов осмотичного стресу вміст проліну у чутливого до посухи сорту, проте знижувала його у стійкого (Kolupaev et al., 2023b). Зниження вмісту проліну за обробки насіння ГАМК зареєстровано і у проростках білої конюшини за умов сольового стресу (Cheng et al., 2018). Однак у даній роботі нам не вдалося зареєструвати змін вмісту проліну у пагонах проростків пшениці, що зазнали впливу модельної посухи. Осмотичний стрес сам по собі спричиняв істотне підвищення вмісту проліну у пагонах (рис. 5, б). Водночас обробка ані ГАМК, ані іншими досліджуваними сполуками не викликала істотних модуляцій вмісту проліну. Можна припустити, що, принаймні за таких експериментальних умов накопичення проліну не має критичної залежності від кількості ГАМК і NO у клітинах.

Значно більш помітною на досліджуваній нами моделі виявилася регуляція ГАМК і нітроген оксидом синтезу вторинних метаболітів (рис. 6, а). Спричинюване ГАМК підвищення загального вмісту фенольних сполук не виявлялося в присутності скавенджера NO МС, водночас обробка НПН так само викликала зростання їх кількості за стресових умов. В літературі повідомляється про позитивні зв'язки між ендогенним вмістом ГАМК і кількістю фенольних сполук у проростаючих зернівках пшениці (Kim et al., 2018). Також встановлено, що праймінг зернівок рису ГАМК спричиняв активацію ферментів фенольного метаболізму і накопичення фенольних сполук за умов осмотичного і сольового стресів (Sheteiyu et al., 2019). У цілому на рослинах різної таксономічної приналежності за умов осмотичних стресів зареєстрована здатність ГАМК посилювати синтез вторинних метаболітів. Припускають, що ГАМК серед стресових біорегуляторів відіграє специфічну роль у регуляції вмісту фенольних сполук у рослин (Dabravolski, Isayenkov, 2023). Серед різноманіття вторинних метаболітів для антиоксидантного захисту особливо важливими вважа-

ються поліфенольні сполуки, зокрема, антоціани (Neill, Gould, 2003). Наші дані свідчать, що праймінг зернівок пшениці ГАМК перешкоджає виснаженню пулу антоціанів, спричинюваному дією модельної посухи (рис. 6, б). Проте такий ефект ГАМК усувався дією скавенджера NO MS. З іншого боку, обробка донором NO, як і ГАМК, сприяла збереженню пулу антоціанів за дії осмотичного стресу. Слід зауважити, що при індукуванні проростання старого насіння пшениці і тритикале праймінгом НПН виявлені ефекти підвищення загального вмісту фенольних сполук та антоціанів (Kolupaev et al., 2025a).

Однак дані про участь нітроген оксиду як посередника у регуляції вмісту фенольних сполук під дією ГАМК у злаків нам не відомі. Водночас показано, що у рослин сої спричинюване обробкою ГАМК посилення синтезу загальних фенольних сполук за умов сольового стресу зменшувалося у присутності як інгібітору синтезу NO за окиснювальним шляхом L-NAME (N( $\omega$ )-нітро-L-аргінін метил ефір), так і за дії інгібітору нітратредуктази вольфрамату натрію, що вказує на роль двох основних шляхів синтезу оксиду азоту у прояві стрес-протекторної дії ГАМК (Xie et al., 2021). Отже, ймовірно, залучення ГАМК у регуляцію синтезу вторинних метаболітів у рослин опосередковано нітроген оксидом.

Вплив праймінгу зернівок ГАМК і донором NO на активність антиоксидантних ферментів за умов модельної посухи виявився менш виразним, ніж його дія на синтез стресових метаболітів. Зокрема, за обробки цими сполуками виявлено лише підвищення активності СОД, проте активність КАТ і ГПО підвищувалася під впливом осмотичного стресу, але праймінг ГАМК або НПН не спричиняв жодних істотних додаткових модуляцій активності цих ферментів (рис. 7). Незвичним феноменом видається підвищення активності СОД за стресових умов за обробки скавенджером NO MS. В цілому в літературі накопичений великий обсяг даних про посилення ферментативної антиоксидантної системи рослин під впливом нітроген оксиду (Correa-Aragunde et al., 2013; Aroga et al., 2016; Mukherjee, Corras, 2023). Такі ефекти можуть бути зумовлені як посттрансляційними модифікаціями

ферментативних білків, так і впливом NO на експресію генів цих ферментів. Але описані і поодинокі феномени зростання активності антиоксидантних ферментів за дії скавенджерів нітроген оксиду або інгібіторів його синтезу. Зокрема, стосовно СОД показано, що обробка 2-феніл-4,4,5,5-тетраметилімідазолін-1-окси-3-оксидом (РТІО) рослин квасолі посилювала підвищення активності ферменту, спричинюване токсичною дією миш'яку (Tallukdar, 2013). Ефект підвищення активності СОД в коренях пшениці виявлено за їх обробки як антагоністами нітроген оксиду (РТІО та L-NAME), так і його донором НПН (Karpets et al., 2015). Ці явища можуть бути зумовлені ймовірними, але поки що спеціально не дослідженими, посттрансляційними модифікаціями ферментативних білків (Aroga et al., 2016). Такі модифікації оксидом азоту молекул антиоксидантних ферментів можуть призводити як до підвищення, так і до зниження активності, залежно від експериментальних умов, зокрема, локальної концентрації NO. Водночас пряма модуляція активності антиоксидантних ферментів нітроген оксидом може призводити до змін редокс-гомеостазу і відповідно до формування сигналів, що викликають зрушення в експресії генів антиоксидантних ферментів (Mukherjee, Corras, 2023; Kolupaev et al., 2023c). Таким чином, цілком ймовірно, що за певних експериментальних умов може спостерігатися активація антиоксидантних ферментів як екзогенним NO, так і його скавенджером, а також відсутність помітних змін активності цих ферментів. Для з'ясування механізмів таких явищ необхідні спеціальні дослідження на інших моделях, що включають використання методів визначення посттрансляційної модифікації цільових білків.

В цілому ж, отримані результати свідчать, що праймінг зернівок пшениці ГАМК значно зменшував розвиток окиснювального стресу, спричинюваного дією модельної посухи (рис. 8). При цьому зменшення генерації АФО і зниження інтенсивності ПОЛ під впливом ГАМК усувалося дією скавенджера NO MS, а отже, ймовірно, було NO-опосередкованим. На це вказує також істотне зниження усіх досліджуваних показників окиснювального стресу за обробки насіння донором нітроген оксиду НПН

(рис. 8). Такі результати цілком узгоджуються з чисельними даними щодо зменшення проявів окиснювального стресу у рослин за умов посухи під впливом екзогенної ГАМК (Yong et al., 2017; Tang et al., 2020; Zhao et al., 2023) та донорів нітроген оксиду (Tian, Lei, 2006; Majeed et al., 2018).

Насамкінець варто зауважити, що в літературі дотепер відсутні докази участі NO у захисних реакціях рослин, спричинюваних дією ГАМК, які були б отримані молекулярно-генетичними методами (Kolupaev et al., 2024a). Щоправда, останнім часом отримані дані метаболомного аналізу, які вказують на те, що NO та ГАМК, спричинюючи стрес-протекторні ефекти, можуть активувати як спільні, так і різні метаболічні шляхи (Kabała, Janicka, 2024). При цьому залишається абсолютно недослідженою ймовірна взаємодія між нітроген оксидом та іншими ключовими сигнальними посередниками, в першу АФО та іонами кальцію, при формуванні під впливом ГАМК NO-опосередкованих адаптивних реакцій рослин.

Отже, у нашій роботі вперше показано, що індукування праймінгом ГАМК проростання насіння і росту проростків пшениці за умов осмотичного стресу опосередковане нітроген оксидом. Основними складовими такого ефекту ГАМК є зміни в метаболізмі вуглеводів і синтезі вторинних метаболітів, а саме – зростання під її впливом активності амілази у зернівках і накопичення цукрів у пагонах проростків, підвищення загального вмісту фенольних сполук і стабілізація в стресових умовах вмісту антоціанів, які відрізняються особливо високою антиоксидантною активністю. Спричинювані ГАМК метаболічні зміни зумовили зменшення прояву окиснювального стресу (генерації АФО і накопичення продуктів ПОЛ) у проростках пшениці за умов посухи. Усі перелічені ефекти ГАМК не проявлялися в присутності скавенджера NO MS. Водночас за дії ГАМК відбувалося зростання ендогенного вмісту NO у пагонах, а екзогенна обробка насіння донором нітроген оксиду НПН призводила до фізіологічних ефектів, схожих на спричинювані дією ГАМК.

**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 підтримки проєкту 14.00.02.06.П «Розробка методів праймінгу насіння зернових злаків дією донорів газотрансмітерів та сполук з гормональною активністю», номер держреєстрації 0124U000126.

#### VOLVEMENT OF NITRIC OXIDE IN $\gamma$ -AMINOBUTYRIC ACID-INDUCED CELLULAR MECHANISMS OF WHEAT SEEDLING ADAPTATION TO WATER DEFICIT

I.V. Shakhov, T.O. Yastreb,  
T.V. Sakhno, Yu.E. Kolupaev

Yuriev Plant Production Institute, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,  
Heroiv Kharkova ave., 142, Kharkiv, 61060, Ukraine  
State Biotechnological University,  
Alchevskih str., 44, Kharkiv, 61022, Ukraine  
Poltava State Agrarian University,  
Skovorody str., 1/3, Poltava, 36003 Ukraine  
E-mail: \*plant\_biology@ukr.net

$\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) is one of the key stress metabolites involved in the functioning of the plant cell signaling network. However, its functional relationships with main signaling molecules, particularly nitric oxide (NO), are not well understood. This study aimed to determine NO's involvement in GABA's stress-protective effect on wheat seedlings (*Triticum aestivum* L., Etana cultivar) under model drought conditions (13 % PEG 6000). Priming grains with a 0.5 mM GABA solution or a 0.1 mM solution of the NO donor sodium nitroprusside (SNP) increased germination energy, seed germination, and water content in seedlings under stressful conditions. Additionally, GABA and SNP treatment mitigated the inhibitory effect of drought on the accumulation of root and shoot biomass. Osmotic stress increased NO content in shoots, and priming with GABA and SNP enhanced this effect. Treatment with the nitric oxide scavenger methylene blue (MB, 0.1 mM) eliminated the increase in NO content caused by stress or GABA action. MB also negated the positive effects of GABA on growth processes. Under the action of GABA and SNP, total amylase activity in grains and soluble carbohydrate content in shoots increased under stressful conditions; MB eliminated GABA's effect on these parameters. Under the model drought, the content of oxidative stress markers (superoxide anion radical, hydrogen peroxide, and malondialdehyde) increased in shoots, but pretreatment grains with GABA or SNP significantly reduced these effects. Osmotic stress caused an increase in activity of catalase and guaiacol

peroxidase in shoots. Preliminary priming with GABA, SNP, and MB did not affect the nature of the changes in activity of these antioxidant enzymes caused by model drought. Meanwhile, superoxide dismutase activity remained unchanged following exposure to the model drought; however, pretreatment seeds with GABA, SNP, and MB increased the enzyme activity. Priming seeds with GABA and SNP increased the total content of phenolic compounds in shoots and preserved the anthocyanin pool under stressful conditions, while MB treatment eliminated these effects. It was concluded that the enhancement of grain germination and seedling growth induced by GABA priming under model drought conditions is largely due to NO-mediated modulation of carbohydrate and secondary compound metabolism.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Akula, R., and Mukherjee, S., New insights on neurotransmitters signaling mechanisms in plants, *Plant Signal. Behav.*, 2020, vol. 15, no. 6, pp. 1737450. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1737450>
- Al Ghafri, S.H., Al-Busaidi, W.M., and Farooq, M., Enhancing drought tolerance in bread wheat through GABA seed priming and optimized storage temperatures, *J. Plant Growth Regul.*, 2025. <https://doi.org/10.1007/s00344-025-11634-6>
- Arora, D., Jain, P., Singh, N., et al., Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants, *Free Radical Res.*, 2016, vol. 50, pp. 291–303. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1118473>
- Ashraf, U., Anjum, S.A., Naseer, S., et al., Gamma amino butyric acid (GABA) application modulated the morpho-physiological and yield traits of fragrant rice under well-watered and drought conditions, *BMC Plant Biol.*, 2024, vol. 24, pp. 569. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05272-5>
- Babenko, L.M., Smirnov, O.E., Romanenko, K.O., et al., Phenolic compounds in plants: Biogenesis and functions, *Ukr. Biochem. J.*, 2019, vol. 91, no. 3, pp. 5–18. <https://doi.org/10.15407/ubj91.03.005>
- Badr, A., Basuoni, M.M., Ibrahim, M., et al., Ameliorative impacts of gamma-aminobutyric acid (GABA) on seedling growth, physiological biomarkers, and gene expression in eight wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under salt stress, *BMC Plant Biol.*, 2024, vol. 24, pp. 605. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05264-5>
- Bates, L.S., Walden, R.P., Tear, G.D., Rapid determination of free proline for water stress studies, *Plant Soil*, 1973, vol. 39, pp. 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui C., et al., Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods, *J. Sci. Food Agric.*, 2015, vol. 95, no. 1, pp. 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Bor, M., and Turkan, I., Is there a room for GABA in ROS and RNS signalling? *Environ. Exp. Bot.*, 2019, vol. 161, pp. 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.015>
- Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Caspi, Y., Pantazopoulou, C.K., Prompers, J.J., et al., Why did glutamate, GABA, and melatonin become intercellular signalling molecules in plants?, *eLife*, 2023, vol. 12, pp. e83361. <https://doi.org/10.7554/eLife.83361>
- Cheng, B., Li, Z., Liang, L., Cao, Y., et al., The  $\gamma$ -aminobutyric Acid (GABA) alleviates salt stress damage during seeds germination of white clover associated with  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  transportation, dehydrins accumulation, and stress-related genes expression in white clover, *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, vol. 19, no. 9, pp. 2520. <https://doi.org/10.3390/ijms19092520>
- Correa-Aragunde, N., Foresi, N., Delledonne, M., and Lamattina, L., Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in Arabidopsis, *J. Exp. Bot.*, 2013, vol. 64, no. 11, pp. 3339–3349. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert172>
- Dabravolski, S.A., and Isayenkov, S.V., The role of the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in plant salt stress tolerance, *Horticulturae*, 2023, vol. 9, pp. 230. <https://doi.org/10.3390/horticulturae902023>
- Domingos, P., Dias, P.N., Tavares, B., et al., Molecular and electrophysiological characterization of anion transport in *Arabidopsis thaliana* pollen reveals regulatory roles for pH,  $\text{Ca}^{2+}$  and GABA, *New Phytol.*, 2019; vol. 223, no. 3, pp. 1353–1371. <https://doi.org/10.1111/nph.15863>
- Duan, P., Ding, F., Wang, F., and Wang, B.S., Priming of seeds with nitric oxide donor sodium nitroprusside (SNP) alleviates the inhibition on wheat seed germination by salt stress, *J. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 2007, vol. 33, pp. 244–250
- Dubrovna, O.V., Mykhalska, S.I., Komisarenko, A.G., Using of proline metabolism genes in plant genetic engineering, *Cytol. Genet.*, 2022a, vol. 56, pp. 361–378. <https://doi.org/10.3103/S009545272204003X>
- Dubrovna, O.V., Priadkina, G.O., Mykhalska, S.I., and Komisarenko, A.G., Drought-tolerance of transgenic

- winter wheat with partial suppression of the proline dehydrogenase gene, *Reg. Mech. Biosyst.*, 2022b, vol. 13, pp. 385–392. <https://doi.org/10.15421/022251>
- Farooq, M., Wahid, A., Zahra, N., et al., Recent advances in plant drought tolerance. *J. Plant Growth Reg.*, 2024, vol. 43, pp. 3337–3369. <https://doi.org/10.1007/s00344-024-11351-6>
- Ghosh, U.K., Islam, M.N., Siddiqui, M.N., et al., Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms, *Plant Biol.*, 2022, vol. 24, pp. 227–239. <https://doi.org/10.1111/plb.13363>
- Jin, X., Liu, T., Xu, J., et al., Exogenous GABA enhances muskmelon tolerance to salinity-alkalinity stress by regulating redox balance and chlorophyll biosynthesis, *BMC Plant Biol.*, 2019, vol. 19, pp. 48. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1660-y>
- Jurkonienė, S., Gavelienė, V., Mockevičiūtė, R., et al., GABA and proline application induce drought resistance in oilseed rape, *Plants*, 2025, vol. 14, no. 6, p. 860. <https://doi.org/10.3390/plants14060860>
- Kabała, K., and Janicka, M., Relationship between the GABA pathway and signaling of other regulatory molecules, *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, vol. 25, no. 19, pp. 10749. <https://doi.org/10.3390/ijms251910749>
- Karpets, Y.V., Kolupaev, Y.E., Yastreb, T.O., and Dmitriev, O.P., Possible pathways of heat resistance induction in plant cells by exogenous nitrogen oxide, *Cytol. Genet.*, 2012, vol. 46, no. 6, pp. 354–359. <https://doi.org/10.3103/S0095452712060059>
- Karpets, Y.V., Kolupaev, Y.E., Yastreb, T.O., and Oboznyi, A.I., Effects of NO-status modification, heat hardening, and hydrogen peroxide on the activity of antioxidant enzymes in wheat seedlings, *Russ. J. Plant Physiol.*, 2015, vol. 62, no. 3, pp. 292–298. <https://doi.org/10.1134/S1021443715030097>
- Kefu, Z., Hai, F., San, Z., and Jie, S., Study on the salt and drought tolerance of *Suaeda salsa* and *Kalanchoe clavigerontiana* under iso-osmotic salt and water stress, *Plant Sci.*, 2003, vol. 165, no. 4, pp. 837–844. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00282-6)
- Khanna, R.R., Jahan, B., Iqbal, N., et al., GABA reverses salt-inhibited photosynthetic and growth responses through its influence on NO-mediated nitrogen-sulfur assimilation and antioxidant system in wheat, *J. Biotechnol.*, 2021, vol. 325, pp. 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.11.015>
- Kim, M.J., Kwak, H.S., and Kim, S.S., Effects of Germination on protein,  $\gamma$ -aminobutyric acid, phenolic acids, and antioxidant capacity in wheat, *Molecules*, 2018, vol. 23, no. 9, pp. 2244. <https://doi.org/10.3390/molecules23092244>
- Kiriziy, D., Kedruk, A., and Stasik, O., Effects of drought, high temperature and their combinations on the photosynthetic apparatus and plant productivity, in *Regulation of Adaptive Responses in Plants*. Yastreb, T.O., Kolupaev, Y.E., Yemets, A.I., Blume, Y.B., Eds. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2024, pp. 1–32.
- Kolupaev, Y.E., Yastreb, T.O., Ryabchun, N.I., et al., Redox homeostasis of cereals during acclimation to drought, *Theor. Exp. Plant Physiol.*, 2023a, vol. 35, no. 2, pp. 133–168. <https://doi.org/10.1007/s40626-023-00271-7>
- Kolupaev, Y.E., Shakhov, I.V., Kokorev, A.I., et al., Gamma-aminobutyric acid modulates antioxidant and osmoprotective systems in seedlings of *Triticum aestivum* cultivars differing in drought tolerance, *Ukr. Biochem. J.*, 2023b, vol. 95, no. 5, pp. 85–97. <https://doi.org/10.15407/ubj95.05.085>
- Kolupaev, Y.E., Yemets, A.I., Yastreb, T.O., and Blume, Y.B., The role of nitric oxide and hydrogen sulfide in regulation of redox homeostasis at extreme temperatures in plants, *Front. Plant Sci.*, 2023c, vol. 14, pp. 1128439. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1128439>
- Kolupaev, Y.E., Kokorev, O.I., Shevchenko, M.V., et al., Participation of  $\gamma$ -aminobutyric acid in cell signaling processes and plant adaptation to abiotic stressors, *Studia Biologica*, 2024a, vol. 18, no. 1, pp. 125–154. <https://doi.org/10.30970/sbi.1801.752>
- Kolupaev, Y.E., Shakhov, I.V., Kokorev, A.I., et al., The role of reactive oxygen species and calcium ions in implementing the stress-protective effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid on wheat seedlings under heat stress conditions, *Cytol. Genet.*, 2024b, vol. 58, no. 2, pp. 81–91. <https://doi.org/10.3103/S0095452724020063>
- Kolupaev, Y.E., Taraban, D.A., Kokorev, A.I., et al., Effect of melatonin and hydropriming on germination of aged triticale and rye seeds, *Botanica*, 2024c, vol. 30, no. 1, pp. 1–13. <https://doi.org/10.35513/Botlit.2024.1.1>
- Kolupaev, Y.E., Shakhov, I.V., Kokorev, A.I., et al., Gamma-aminobutyric acid induction of triticale protective systems under drought, salt stress or a combination of the two, *Turk. J. Bot.*, 2024d, vol. 48, no. 5, pp. 235–248. <https://doi.org/10.55730/1300-008X.2812>
- Kolupaev, Y.E., Kokorev A.I., Kobyzeva, L.N., et al., Priming with no donor sodium nitroprusside to activate germination and reduce oxidative damage in aged wheat and triticale seeds, *Agric. Forest.*, 2025a, vol. 71, no. 1, pp. 07–26. <https://doi.org/10.17707/Agri-cultForest.71.1.01>
- Kolupaev, Y.E., Relina, L.I., Oboznyi, A.I., et al., Stress metabolites in wheat: role in adaptation to drought, *Ukr. Biochem. J.*, 2025b, vol. 97, no. 3, pp. 13–41. <https://doi.org/10.15407/ubj97.03.013>
- Kozeko, L., Jurkonienė, S., and Jankovska-Bortkevič, E.,

- GABA as a regulator of plant growth and stress tolerance, in *Regulation of Adaptive Responses in Plants*, Yastreba, T.O., Kolupaev, Yu.E., Yemets, A.I., Blume, Ya.B., Eds, New York: Nova Science Publishers, Inc., 2024, pp. 259–284. <https://doi.org/10.52305/TXQB2084>
- Li, M.F., Guo, S.J., Yang, X.H., et al., Exogenous gamma-aminobutyric acid increases salt tolerance of wheat by improving photosynthesis and enhancing activities of antioxidant enzymes, *Biol. Plant.*, 2016, vol. 60, no. 1, pp. 123–131. <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0559-1>
- Li, Z., Cheng, B., Zeng, W., et al., Functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid in regulating ionic, water, and metabolic homeostasis in creeping bentgrass under salt stress, *J. Proteome Res.*, 2020, vol. 19, no. 2, pp. 769–780. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00627>
- Li, L., Dou, N., Zhang, H., and Wu, C., The versatile GABA in plants, *Plant Signal. Behav.*, 2021, vol. 16, no. 3, pp. 1862565. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1862565>
- Lv, Y., Zhao, Y., He, Y., et al., Synergistic effects of gamma-aminobutyric acid and melatonin on seed germination and cadmium tolerance in tomato, *Plant Signal. Behav.*, 2023, vol. 18, no. 1, pp. 2216001. <https://doi.org/10.1080/15592324.2023.2216001>
- Majeed, S., Nawaz, F., Naeem, M., and Ashraf, M.Y., Effect of exogenous nitric oxide on sulfur and nitrate assimilation pathway enzymes in maize (*Zea mays* L.) under drought stress, *Acta Physiol. Plant.*, 2018, vol. 40, no. 12, pp. 206. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-018-2780-y>
- Mansour, M.M.F., and Salama, K.H.A., Proline and abiotic stresses: responses and adaptation, in *Plant ecophysiology and adaptation under climate change: mechanisms and perspectives. II: mechanisms of adaptation and stress amelioration*. Hasanuzzaman M., Ed, Singapore: Springer Nature, 2020, pp. 357–397. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-2172-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2172-0_12)
- Mukherjee, S., and Corpas, F.J.,  $H_2O_2$ , NO, and  $H_2S$  networks during root development and signalling under physiological and challenging environments: Beneficial or toxic?, *Plant Cell Environ.*, 2023, vol. 46, no. 3, pp. 688–717. <https://doi.org/10.1111/pce.14531>
- Neill, S.O., and Gould, K.S., Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants?, *Funct. Plant Biol.*, 2003, vol. 30, no. 8, pp. 865–873. <https://doi.org/10.1071/fp03118>
- Nogués, S. and Baker, N.R., Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *J. Exp. Bot.*, 2000, vol. 51, no. 348, pp. 1309–1317. <https://doi.org/10.1093/jxb/51.348.1309>
- Pál, M., Tajti, J., Szalai, G., et al., Interaction of polyamines, abscisic acid and proline under osmotic stress in the leaves of wheat plants, *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, pp. 128–139. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31297-6>
- Patel, P., Kadur Narayanaswamy, G., Kataria, S., and Baghel, L., Involvement of nitric oxide in enhanced germination and seedling growth of magnetoprimed maize seeds, *Plant Signal. Behav.*, 2017; vol. 12, no. 12, p. e1293217. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1293217>
- Sagisaka, S., The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*, *Plant Physiol.*, 1976, vol. 57, pp. 308–309. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.308>
- Samarah Nezar, H., Al-Quraan, N.A., and Al-Wraikat, B.S., Ultrasonic treatment to enhance seed germination and vigour of wheat (*Triticum durum*) in association with  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) shunt pathway, *Funct. Plant Biol.*, 2023, vol. 50, pp. 277–293. <https://doi.org/10.1071/FP22211>
- Sepehri, A., and Rouhi, H.R., Enhancement of seed vigor performance in aged groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seeds by sodium nitroprusside under drought stress, *Philippine Agricult. Sci.*, 2016, vol. 99, no. 4, pp. 339–347
- Shakhov, I.V., Kokorev, A.I., Yastreba, T.O., et al., Increasing germination and antioxidant activity of aged wheat and triticale grains by priming with gamma-aminobutyric acid, *Ukr. Bot. J.*, 2024, vol. 81, no. 4, pp. 290–304. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj81.04.290>
- Shakhov, I.V., Relina, L.I., Pyshchalenko, M.A., and Kolupaev, Y.E., Activation of wheat seed germination under drought and salt stresses by  $\gamma$ -aminobutyric acid priming: Relationship with changes in ROS generation and osmolyte content, *Not. Sci. Biol.*, 2025, vol. 17, no. 2, pp. 12366. <https://doi.org/10.55779/nsb17212366>
- Sheng, Y., Xiao, H., Guo, C., et al., Effects of exogenous gamma-aminobutyric acid on  $\alpha$ -amylase activity in the aleurone of barley seeds, *Plant Physiol. Biochem.* 2018, vol. 127, pp. 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.02.030>
- Sheteiwy, M.S., Shao, H., Qi, W., Hamoud, Y.A., Shaghaleh, H., Khan, N.U., Yang, R., and Tang, B., GABA-alleviated oxidative injury induced by salinity, osmotic stress and their combination by regulating cellular and molecular signals in rice, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 22, pp. 5709. <https://doi.org/10.3390/ijms20225709>
- Talukdar, D., Arsenic-induced oxidative stress in the common bean legume, *Phaseolus vulgaris* L. seedlings and its amelioration by exogenous nitric oxide, *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 2013, vol. 19, no. 1, pp. 69–79. <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0140-8>
- Tang, M., Li, Z., Luo, L., et al., Nitric oxide signal, nitrogen metabolism, and water balance affected by

- $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in relation to enhanced tolerance to water stress in creeping bentgrass, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 20, p. 7460. <https://doi.org/10.3390/ijms21207460>
- Tian, X., and Lei, Y., Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings, *Biol. Plant*, 2006, vol. 50, no. 4, pp. 775–778. <http://dx.doi.org/10.1007/s10535-006-0129-7>
- Ullah, A., Ali, I., Noor, J., et al., Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) mitigated salinity-induced impairments in mungbean plants by regulating their nitrogen metabolism and antioxidant potential, *Front. Plant Sci.*, 2023, vol. 13, pp. 1081188. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1081188>
- Wu, C., Hao, W., Yan, L., et al., Postharvest melatonin treatment enhanced antioxidant activity and promoted GABA biosynthesis in yellow-flesh peach, *Food Chem.*, 2023, vol. 419, pp. 136088. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136088>
- Xie, C., Wang, P., Sun, M., et al., Nitric oxide mediates  $\gamma$ -aminobutyric acid signaling to regulate phenolic compounds biosynthesis in soybean sprouts under NaCl stress, *Food Biosci.*, 2021, vol. 44, pp. 101356. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101356>
- Xu, J., Liu, T., Qu, F., et al., Nitric oxide mediates  $\gamma$ -aminobutyric acid-enhanced muskmelon tolerance to salinity-alkalinity stress conditions, *Sci. Horticult.*, 2021, vol. 286, pp. 110229. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110229>
- Yadav, B., Jogawat, A., Rahman, M.S., and Narayan, O.P., Secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: A review, *Gene Rep.*, 2021, vol. 23, pp. 101040. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101040>
- Yastreba, T.O., Shkliarevskiy, M.A., and Kolupaev, Yu.E., Quantitative determination of amylase activity in germinating cereal grains using agar plates and ImageJ software, *Botanica*, 2025, vol. 31, no. 2, pp. 54–63. <https://doi.org/10.35513/Botlit.2025.2.1>
- Yemets, A.I., Karpets, Y.V., Kolupaev, Y.E., and Blume, Y.B., Emerging technologies for enhancing ROS/RNS homeostasis, in *Reactive oxygen, nitrogen and sulfur species in plants: Production, metabolism, signaling and defense mechanisms*, Hasanuzzaman, M., Fotopoulos, V., Nahar, K., Fujita, M., Eds, John Wiley & Sons Ltd, 2019, vol. 2, pp. 873–922. <https://doi.org/10.1002/9781119468677.ch39>
- Yong, B., Xie, H., Li, Z., et al., Exogenous application of GABA improves polyamines PEG-induced drought tolerance positively associated with GABA-shunt, and proline metabolism in white clover, *Front. Physiol.*, 2017, vol. 8, p. 1107. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01107>
- Yuan, D., Wu, X., Gong, B., et al., GABA metabolism, transport and their roles and mechanisms in the regulation of abiotic stress (hypoxia, salt, drought) resistance in plants, *Metabolites*, 2023, vol. 13, pp. 347. <https://doi.org/10.3390/metabo13030347>
- Zagdanska, B., Respiratory energy demand for protein turnover and ion transport in wheat leaves upon water deficit, *Physiol. Plant.*, 1995, vol. 95, pp. 428–436. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb00859.x>
- Zeng, W., Hassan, M.J., Kanga, D., et al., Photosynthetic maintenance and heat shock protein accumulation relating to  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-regulated heat tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*), *South Afr. J. Bot.*, 2021, vol. 141, pp. 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.05.028>
- Zhang, Y., Wang, L., Liu, Y., et al., Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter in the tonoplast, *Planta*, 2006, vol. 224, no. 3, pp. 545–555. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0242-z>
- Zhang, H., Dou, W., Jiang, C.X., et al., Hydrogen sulfide stimulates  $\beta$ -amylase activity during early stages of wheat grain germination, *Plant Signal. Behav.*, 2010, vol. 5, no. 8, pp. 1031–1033. <https://doi.org/10.4161/psb.5.8.12297>
- Zhao, Q., Ma, Y., Huang, X., et al., GABA Application enhances drought stress tolerance in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.), *Plants*, 2023, vol. 12, pp. 2495. <https://doi.org/10.3390/plants12132495>
- Zheng, C., Jiang, D., Liu, F., et al., Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity, *Environ. Exp. Bot.*, 2009, vol. 67, no. 1, pp. 222–227. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.05.002>
- Zhou, M., Hassan, M.J., Peng, Y., et al.,  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) priming improves seed germination and seedling stress tolerance associated with enhanced antioxidant metabolism, DREB expression, and dehydrin accumulation in white clover under water stress, *Front. Plant Sci.*, 2021, vol. 12, p. 776939. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.776939>
- Zhou, C., Dong, W., Jin, S., et al.,  $\gamma$ -aminobutyric acid treatment induced chilling tolerance in postharvest peach fruit by upregulating ascorbic acid and glutathione contents at the molecular level, *Front. Plant Sci.*, 2022, vol. 13, pp. 1059979. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1059979>
- Zhou, B., Guo, Z., Xing, J., and Huang, B., Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*, *J. Exp. Bot.*, 2005, vol. 56, pp. 3223–3228. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri319>

Надійшла в редакцію 07.07.2025  
Після доопрацювання 03.08.2025  
Прийнята до друку 18.11.2025