

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**ШАХОВ ІВАН ВАЛЕРІЙОВИЧ**

УДК 581.1:577.13

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**МЕХАНІЗМИ СТРЕС-ПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ  $\gamma$ -АМІНОМАСЛЯНОЇ  
КИСЛОТИ НА ЗЕРНОВІ ЗЛАКИ**

091 Біологія

09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело  
\_\_\_\_\_ І.В. Шахов

Науковий керівник: Колупаєв Юрій Євгенович, доктор біологічних наук,  
професор

Харків – 2026

## АНОТАЦІЯ

**Шахов І.В. Механізми стрес-протекторної дії  $\gamma$ -аміномасляної кислоти на зернові злаки.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» – Державний біотехнологічний університет, Харків, 2026

**Актуальність, мета і завдання дослідження.** Впровадження покращених кліматично оптимізованих агротехнологій, які сприяють розкриттю адаптаційного потенціалу існуючих сортів та гібридів культурних рослин, є однією із стратегій вирішення проблеми глобальної продовольчої безпеки. Важливою складовою такого підходу є застосування фізіологічно активних речовин (ФАР) нового покоління з одночасним удосконаленням способів впливу цих сполук на рослини та насіння. Сучасні дослідження засвідчують, що обробка рослин такими сполуками дає можливість регулювати транскриптом та клітинний метаболізм, дозволяючи отримувати цілеспрямовані фізіологічні відповіді, необхідні для адаптації рослин до несприятливих факторів середовища.

Останніми роками здійснюється активне дослідження стрес-протекторної дії так званих «рослинних нейротрансмітерів» (мелатоніну, серотоніну, біогенних амінів та  $\gamma$ -аміномасляної кислоти – ГАМК), котрі, як стало відомо, є важливими сигнально-регуляторними молекулами рослин. ГАМК, як і деякі інші рослинні нейротрансмітери, накопичується у рослинах за несприятливих умов у значних кількостях і функціонально поєднує властивості стресового метаболіту і біорегулятора. Однак уявлення про механізми стрес-протекторної дії ГАМК поки що мають переважно емпіричний характер. Зокрема, дуже фрагментарними є відомості про функціональні зв'язки ГАМК з ключовими клітинними сигнальними посередниками – іонами кальцію, активними формами кисню (АФО) та нітроген оксидом (NO). Дотепер не складено навіть схематичної картини, яка

б пояснювала широкий спектр стрес-протекторних ефектів ГАМК, серед яких вплив на водний режим рослин, енергетичний баланс, функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем. Недостатньо досліджені видові і сортові особливості впливу ГАМК на захисні реакції рослин, не встановлені концентраційні діапазони фізіологічної активності та оптимальні способи її застосування як стрес-протекторного агента.

**Основна мета** дисертаційної роботи полягала у встановленні участі ключових клітинних сигнальних посередників – АФО, іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та нітроген оксиду – у реалізації впливу ГАМК на стійкість зернових злаків до дії абіотичних стресорів і процеси проростання їх зернівок та у виявленні метаболічних процесів, чутливих до дії екзогенної ГАМК. Для досягнення мети вирішувалися такі завдання: (1) дослідити вплив ГАМК на інтегральні показники стійкості пшениці і тритикале до дії високої температури, осмотичного і сольового стресів на ранніх фазах розвитку; (2) встановити роль активних форм кисню (АФО) та іонів кальцію у розвитку індукованої ГАМК теплостійкості проростків пшениці; (3) оцінити вплив екзогенної ГАМК на функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем етіюльованих проростків пшениці і тритикале за умов модельної посухи і сольового стресу; (4) порівняти вплив праймінгу зернівок і фоліарної обробки рослин пшениці ГАМК на функціонування протекторних систем за умов ґрунтової посухи; (5) дослідити вплив праймінгу насіння пшениці ГАМК на його схожість за несприятливих умов та встановити роль нітроген оксиду як посередника в процесах, необхідних для проростання зернівок і адаптації проростків; (6) встановити здатність ГАМК коригувати редокс-гомеостаз і поліпшувати схожість старого насіння зернових злаків.

**Об'єкти і методи.** Експериментальними об'єктами були рослини та насіння пшениці м'якої (*Triticum aestivum*) і тритикале ( $\times$  *Triticosecale*) сортів, що відрізняються за стійкістю і стратегією адаптації до основних абіотичних стресових факторів. Для оцінки впливу ГАМК на пшеницю різних сортів за дії осмотичного стресу зернівки пшениці пророщували

впродовж 2 діб в термостаті без світла за температури 24 °С в чашках Петрі, після чого проростки піддавали впливу модельної посухи (15% ПЕГ 6000). ГАМК додавали у середовище інкубації проростків для отримання робочих розчинів у концентраціях діапазону від 0,025 до 2,5 мМ. Після дводенного впливу на рослини розчинів ПЕГ 6000 та/або ГАМК проводили біохімічні аналізи та визначення біомаси пагонів і коренів рослин. В експериментах з оцінки впливу ГАМК на ріст проростків тритикале за умов осмотичного, сольового та комбінованого стресу насіння пророщували у чашках Петрі при 24 °С без світла протягом 2 діб. Надалі рослини переносили в чашки Петрі, що містили 15% ПЕГ 6000 або 100 мМ NaCl або комбінацію обох речовин. Праймінг насіння ГАМК здійснювали шляхом занурення зернівок у її розчини на 3 години, контроль – 3-годинна інкубація на дистильованій воді (гідропраймінг). Так само обробляли насіння при оцінці впливу ГАМК на проростання зернівок за умов осмотичного та сольового стресів.

При дослідженні впливу ГАМК на стійкість проростків пшениці до потенційно летального теплового стресу зразки прогрівали протягом 10 хв за температури 45 °С, після чого через 3 доби оцінювали їх виживаність.

У дослідженнях ролі АФО, іонів кальцію та нітроген оксиду у реалізації стрес-протекторних ефектів ГАМК використовували скавенджер АФО диметилтіосечовину, інгібітор НАДФН-оксидази імідазол, скавенджер нітроген оксиду метиленовий синій, хелатор позакілтінного кальцію ЕГТА та інгібітор надходження кальцію в цитозоль через внутрішньоклітинні кальцієві канали неоміцин.

В експериментах з порівняння впливу праймінгу насіння ГАМК і фоліарної обробки зернівки пшениці висівали в ґрунт. Попередньо частину насіння праймували у розчинах ГАМК концентрацій діапазону 0,1–2,5 мМ, іншу частину висівали без попереднього праймування, крім того, експеримент включав варіанти з гідропраймінгом. Протягом перших 7 діб проростання насіння і ріст проростків відбувалися при оптимальному зволоженні. Після цього рослини варіантів з фоліарною обробкою ГАМК

обприскували її розчинами в концентраціях діапазону 0,1–2,5 мМ, рослини відповідних контрольних варіантів обприскували водою. Надалі у варіантах з посухою поступово знижували вологість ґрунту до 30% від повної вологоємності. На 12-й день від моменту висіву рослини використовували для визначення фізіологічних і біохімічних показників.

В експериментах визначали ростові характеристики та виживаність рослин, загальний і відносний вміст води в органах проростків, вміст фотосинтетичних пігментів, активність антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази – СОД, каталази і гваяколпероксидази), вміст осмолітів (проліну і розчинних вуглеводів), загальний вміст фенольних сполук і антоціанів, показники, що характеризують інтенсивність окиснювального стресу (генерація супероксидного аніон-радикала, вміст гідроген пероксиду та продукту пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) малонового діальдегіду – МДА). При дослідженні впливу ГАМК на проростання зернівок поряд з показниками схожості, енергії проростання визначали активність амілази у зернівках.

**Основні результати.** Екзогенна ГАМК чинила позитивний вплив на інтегральні показники, що характеризують стійкість зернових злаків до основних абіотичних стресорів – високої температури, посухи і засолення. Зокрема, встановлено істотне підвищення виживаності проростків пшениці після потенційно летального теплового стресу за обробки 0,5 і 1 мМ розчинами ГАМК. Обробка проростків пшениці 0,5 мМ ГАМК також істотно зменшувала інгібування накопичення біомаси органів за умов осмотичного стресу, створюваного 15% ПЕГ 6000. При цьому обробка ГАМК сприяла підвищенню відносного вмісту води у тканинах за умов осмотичного стресу. Більш помітний стрес-протекторний вплив ГАМК виявлено на чутливому до посухи сорті пшениці.

Встановлено стрес-протекторний вплив ГАМК на проростки тритикале за умов модельної посухи, сольового стресу та комбінованої дії цих чинників, що виявлявся у зменшенні інгібування росту коренів і пагонів.

Також обробка ГАМК зменшувала ефект втрати води органами проростків за вказаних стресів та їх комбінації. Вперше показано роль ГАМК в регуляції редокс-гомеостазу і накопичення осмолітів у етіольованих проростків тритикале за дії осмотичних стресів. ГАМК помітно зменшувала генерацію АФО та накопичення продукту ПОЛ МДА за стресових умов. Протекторна дія ГАМК виявлялася у підвищенні активності антиоксидантних ферментів, посиленні накопичення проліну, стабілізації пулу розчинних вуглеводів та помітному збільшенні вмісту фенольних сполук та антоціанів у пагонах проростків тритикале.

Індуковане ГАМК підвищення теплостійкості проростків пшениці, ймовірно, відбувається із залученням АФО та іонів кальцію як ключових сигнальних посередників. На це, зокрема, вказує транзиторне підвищення вмісту гідроген пероксиду у коренях проростків із наступним зростанням активності антиоксидантних ферментів — СОД, каталази і гваяколпероксидази. Вказані ефекти ГАМК повністю усувалися попереднім внесенням у середовище інкубації коренів скавенджера гідроген пероксиду диметилтіосечовини та значною мірою пригнічувалися в присутності інгібітора НАДФН-оксидази імідазолу. Антагоністи кальцію (ЕГТА і неоміцин) модулювали ефекти індукованого ГАМК підвищення вмісту гідроген пероксиду і активності антиоксидантних ферментів.

Обробка ГАМК проростків стійкого і чутливого сортів пшениці запобігала спричинюваному модельною посухою зниженню активності СОД, а також зменшенню вмісту цукрів і антоціанів. У той же час ГАМК сприяла підвищенню активності гваяколпероксидази, кількості проліну та загального вмісту фенольних сполук у чутливого до посухи сорту і слабо впливала на ці показники у стійкого сорту. Таким чином, зафіксовано диференційований прояв стрес-протекторної дії ГАМК за умов модельної посухи, залежний від адаптивних стратегій сортів.

Праймінг зернівок, а також фоліарна обробка ГАМК рослин пшениці, які надалі зазнавали впливу посухи у віці 7–12 днів, значно пом'якшували

рістінгібувальну дію посухи, сприяли підвищенню відносного вмісту води та збереженню пулу фотосинтетичних пігментів в листках. При цьому екзогенна ГАМК запобігала спричинюваному посухою розвитку окиснювального стресу, стабілізуючи активність антиоксидантних ферментів – СОД, каталази і гваяколпероксидази. Також обробка ГАМК викликала підвищення вмісту осмолітів – цукрів і розчинних білків у листках, знижуючи при цьому стрес-індуковане накопичення проліну. Праймінг насіння чинив більш помітний позитивний вплив на ріст рослин пшениці та стан їх стрес-протекторних систем порівняно з фоліарною обробкою.

Вперше встановлено, 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. Перелічені захисні ефекти ГАМК не проявлялися в присутності скавенджера NO метиленового синього. Водночас попередня обробка зернівок ГАМК спричиняла зростання вмісту ендogenous NO у пагонах проростків, що вказує на його участь у реалізації ефектів ГАМК.

Праймінг старих зернівок пшениці і тритикале ГАМК істотно посилював енергію проростання, схожість насіння та ріст проростків. Однією з причин підвищення схожості насіння досліджуваних злаків під впливом ГАМК може бути пом'якшення окиснювального стресу, що розвивається при проростанні старіючого насіння. На це вказує зменшення генерації супероксидного аніон-радикала та вмісту гідроген пероксиду і МДА у проростках. Ймовірно, цей ефект зумовлений менш інтенсивним стохастичним утворенням АФО за обробки ГАМК та посиленням під її впливом функціонування окремих складових антиоксидантної системи,

зокрема, підвищенням активності каталази у обох видів злаків, зростанням загального вмісту фенольних речовин у пшениці і антоціанів у тритикале.

Таким чином, встановлено, що стрес-протекторна дія ГАМК пов'язана з її впливом на сигнальні процеси, до яких залучаються АФО, іони кальцію і нітроген оксид, і, як наслідок, активацією основних клітинних захисних систем – антиоксидантної та осмопротекторної. Особливо помітно стрес-протекторні ефекти ГАМК виявлялися за праймінгу насіння її розчинами. При цьому ГАМК сприяла проростанню насіння і росту рослин за стресових умов, а також поліпшувала схожість старого насіння культурних злаків.

Отримані результати включені у видані Інститутом рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України за співавторства здобувача науково-методичні рекомендації з оцінки стрес-протекторного впливу ФАР на зернові злаки та використання праймінгу насіння новими групами біорегуляторів для підвищення його посівних характеристик та стресостійкості рослин.

**Ключові слова:** Пшениця м'яка – *Triticum aestivum*, тритикале – × *Triticosecale*, γ-аміномасляна кислота; сигнальні посередники, активні форми кисню, кальцій, нітроген оксид, антиоксидантна система, амілаза, осмоліти, стійкість до стресорів, посуха, високі температури, сольовий стрес.

## SUMMARY

**Shakhov I.V. Mechanisms of Stress-Protective Action of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid on Cereal Crops** – Qualification scientific work on the rights of manuscript.

Dissertation for Degree of Philosophy Doctor in specialty 091 “Biology” – State Biotechnological University, Kharkiv, 2026

**Actuality, purpose and tasks of investigation.** The implementation of improved, climate-optimized agrotechnologies that enhance the adaptive potential of existing varieties and hybrids of cultivated plants is one of the strategies to address the problem of global food security. An important component of this approach is the use of next-generation physiologically active substances (PAS) in combination with the refinement of methods for applying these compounds to plants and seeds. Modern studies demonstrate that treatment of plants with such compounds allows regulation of the transcriptome and cellular metabolome, enabling targeted physiological responses necessary for plant adaptation to adverse environmental factors.

In recent years, active research has been conducted on the stress-protective action of so-called “plant neurotransmitters” (melatonin, serotonin, biogenic amines, and  $\gamma$ -aminobutyric acid – GABA), which have been recognized as important signaling and regulatory molecules in plants. GABA, like some other plant neurotransmitters, accumulates in plants under adverse conditions in significant amounts and functionally combines the properties of a stress metabolite and a bioregulator. However, the understanding of the mechanisms underlying GABA’s stress-protective action remains largely empirical. In particular, information on the functional relationships of GABA with key cellular signaling mediators – calcium ions, reactive oxygen species (ROS), and nitric oxide (NO) – is still very fragmentary. To date, even a schematic representation explaining the broad spectrum of GABA’s stress-protective effects, including its influence on plant water status, energy balance, and the functioning of antioxidant and osmoprotective systems, has not been developed. Species- and variety-specific responses of plants to GABA, the concentration ranges for its physiological

activity, and the optimal methods of application as a stress-protective agent remain insufficiently studied.

The main purpose of the dissertation was to establish the involvement of key cellular signaling mediators – reactive oxygen species (ROS), Ca<sup>2+</sup> ions, and nitric oxide (NO) – in mediating the effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) on the stress tolerance of cereal crops to abiotic stressors and on the germination processes of their seeds, as well as to identify metabolic processes sensitive to exogenous GABA.

To achieve this purpose, the following tasks were addressed: (1) To investigate the effects of GABA on the integral indicators of wheat and triticale tolerance to high temperature, osmotic, and salt stresses during early developmental stages; (2) To determine the role of reactive oxygen species (ROS) and calcium ions in the development of GABA-induced thermotolerance in wheat seedlings; (3) To evaluate the effects of exogenous GABA on the functioning of antioxidant and osmoprotective systems in etiolated wheat and triticale seedlings under model drought and salt stress conditions; (4) To compare the effects of seed priming and foliar GABA application on the protective systems of wheat plants under soil drought conditions; (5) To investigate the influence of GABA seed priming on wheat germination under adverse conditions and to determine the role of nitric oxide as a mediator in processes essential for seed germination and seedling adaptation; (6) To establish the ability of GABA to modulate redox homeostasis and improve the germination of aged cereal seeds.

**Objects and methods.** The experimental objects were plants and seeds of soft wheat (*Triticum aestivum*) and triticale ( $\times$  *Triticosecale*) varieties differing in their tolerance and adaptation strategies to major abiotic stress factors. To evaluate the effects of GABA on wheat of different varieties under osmotic stress, wheat seeds were germinated for 2 days in a thermostat in the dark at 24°C in Petri dishes, after which the seedlings were subjected to model drought conditions (15% PEG 6000). GABA was added to the incubation medium to obtain working solutions at concentrations ranging from 0.025 to 2.5 mM. After the two-day

exposure of the seedlings to PEG 6000 and/or GABA solutions, biochemical analyses and measurements of shoot and root biomass were conducted.

In experiments assessing the effects of GABA on the growth of triticale seedlings under osmotic, salt, and combined stresses, seeds were germinated in Petri dishes at 24°C in the dark for 2 days. Subsequently, the plants were transferred to Petri dishes containing 15% PEG 6000, 100 mM NaCl, or a combination of both compounds. Seed priming with GABA was performed by immersing the seeds in GABA solutions for 3 hours, while the control was incubated in distilled water for 3 hours (hydropriming). The same treatment was applied when assessing the effects of GABA on seed germination under osmotic and salt stress conditions.

In the study of GABA effects on wheat seedling tolerance to potentially lethal heat stress, samples were exposed to 45°C for 10 minutes, after which their survival was assessed 3 days later.

In experiments investigating the roles of ROS, calcium ions, and nitric oxide in mediating the stress-protective effects of GABA, the following agents were used: the ROS scavenger dimethylthiourea, the NADPH-oxidase inhibitor imidazole, the nitric oxide scavenger methylene blue, the extracellular calcium chelator EGTA, and the inhibitor of calcium influx into the cytosol through intracellular calcium channels, neomycin.

In experiments comparing the effects of GABA seed priming and foliar treatment, wheat seeds were sown in soil. A portion of the seeds was primed in GABA solutions at concentrations ranging from 0.1 to 2.5 mM, while another portion was sown without prior priming; hydropriming variants were also included as controls. During the first 7 days, seed germination and seedling growth occurred under optimal soil moisture. Subsequently, in the foliar treatment variants, seedlings were sprayed with GABA solutions at concentrations ranging from 0.1 to 2.5 mM, while the corresponding control plants were sprayed with water. In the drought variants, soil moisture was gradually reduced to 30% of field capacity. On

the 12th day after sowing, plants were used for the determination of physiological and biochemical parameters.

In the experiments, plant growth characteristics and survival were determined, as well as the total and relative water content in seedling organs, the content of photosynthetic pigments, the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase – SOD, catalase, and guaiacol peroxidase), the content of osmolytes (proline and soluble sugars), the total content of phenolic compounds and anthocyanins, and indicators characterizing the intensity of oxidative stress (superoxide anion radical generation, hydrogen peroxide content, and lipid peroxidation product malondialdehyde – MDA).

In studies on the effects of GABA on seed germination, in addition to germination and germination energy, amylase activity in the seeds was also determined.

**Main results.** Exogenous GABA had a positive effect on the integral indicators characterizing the tolerance of cereal crops to major abiotic stressors, including high temperature, drought, and salinity. In particular, a significant increase in the survival of wheat seedlings after potentially lethal heat stress was observed following treatment with 0.5 and 1 mM GABA solutions. Treatment of wheat seedlings with 0.5 mM GABA also significantly reduced the inhibition of organ biomass accumulation under osmotic stress induced by 15% PEG 6000. At the same time, GABA treatment promoted an increase in the relative water content in tissues under osmotic stress. A more pronounced stress-protective effect of GABA was observed in the drought-sensitive wheat variety.

A stress-protective effect of GABA was also established in triticale seedlings under model drought, salt stress, and their combined action, which was manifested as a reduction in root and shoot growth inhibition. GABA treatment additionally decreased water loss in seedling organs under these stress conditions and their combination. For the first time, the role of GABA in regulating redox homeostasis and osmolyte accumulation in etiolated triticale seedlings under osmotic stress was demonstrated. GABA markedly reduced ROS generation and

the accumulation of the lipid peroxidation product malondialdehyde (MDA) under stress conditions. Its protective action was manifested in increased antioxidant enzyme activity, enhanced proline accumulation, stabilization of the soluble sugar pool, and a significant increase in the content of phenolic compounds and anthocyanins in triticale seedling shoots.

GABA-induced enhancement of thermotolerance in wheat seedlings likely involves ROS and calcium ions as key signaling mediators. This is evidenced, in particular, by a transient increase in hydrogen peroxide content in seedling roots, followed by an increase in the activity of antioxidant enzymes – SOD, catalase, and guaiacol peroxidase. These GABA effects were completely abolished by prior application of the hydrogen peroxide scavenger dimethylthiourea to the root incubation medium and were largely suppressed in the presence of the NADPH-oxidase inhibitor imidazole. Calcium antagonists (EGTA and neomycin) modulated the effects of GABA-induced increases in hydrogen peroxide content and antioxidant enzyme activity.

Treatment of seedlings of drought-tolerant and drought-sensitive wheat varieties with GABA prevented the reduction in SOD activity, as well as the decrease in sugar and anthocyanin content caused by model drought. At the same time, GABA increased guaiacol peroxidase activity, proline content, and total phenolic compounds in the drought-sensitive variety, while having a minor effect on these parameters in the tolerant variety. Thus, a differential manifestation of the stress-protective action of GABA under model drought conditions was observed, depending on the adaptive strategies of the varieties.

Seed priming, as well as foliar application of GABA to wheat plants subsequently exposed to drought at 7–12 days of age, significantly alleviated the growth-inhibitory effects of drought, promoted an increase in relative water content, and preserved the pool of photosynthetic pigments in leaves. Exogenous GABA prevented the development of drought-induced oxidative stress by stabilizing the activity of antioxidant enzymes – SOD, catalase, and guaiacol peroxidase. GABA treatment also increased the content of osmolytes – sugars and

soluble proteins – in leaves while reducing stress-induced proline accumulation. Seed priming had a more pronounced positive effect on wheat seedling growth and the state of their stress-protective systems compared to foliar application.

For the first time, it was established that GABA priming of seed germination and seedling growth under osmotic stress is mediated by nitric oxide. The main components of this GABA effect include changes in carbohydrate metabolism and secondary metabolite synthesis, specifically: increased amylase activity in seeds and sugar accumulation in seedling shoots, increased total phenolic content, and stabilization of anthocyanin content under stress conditions. These protective effects of GABA were not observed in the presence of the NO scavenger methylene blue. At the same time, prior GABA treatment of seeds increased endogenous NO content in seedling shoots, indicating its involvement in the realization of GABA effects.

Priming of aged wheat and triticale seeds with GABA significantly enhanced germination energy, seed germination, and seedling growth. One of the reasons for the improved seed germination of the studied cereals under GABA treatment may be the alleviation of oxidative stress that develops during germination of aged seeds. This is indicated by a decrease in superoxide anion radical generation, as well as hydrogen peroxide and MDA content in the seedlings. This effect is likely due to a lower intensity of stochastic ROS formation under GABA treatment and the enhancement of specific components of the antioxidant system, particularly increased catalase activity in both cereal species, elevated total phenolic content in wheat, and increased anthocyanin content in triticale.

Thus, it was established that the stress-protective action of GABA is associated with its influence on signaling processes involving ROS, calcium ions, and nitric oxide, and, consequently, with the activation of major cellular protective systems – antioxidant and osmoprotective. The stress-protective effects of GABA were especially pronounced during seed priming with its solutions. Under these

conditions, GABA promoted seed germination and seedling growth under stress, as well as improved the germination of aged cereal seeds.

The obtained results were included in methodological recommendations issued by the Yuriev Plant Production Institute of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine on the assessment of the stress-protective effects of physiologically active substances on cereal crops and the use of seed priming with new groups of bioregulators to enhance seed performance and plant stress tolerance.

**Keywords:** Soft wheat – *Triticum aestivum*, triticale – × *Triticosecale*,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA); signaling mediators, reactive oxygen species (ROS), calcium, nitric oxide, antioxidant system, amylase, osmolytes, stress tolerance, drought, high temperature, salt stress.

**ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ****Статті у наукових виданнях, що індексовані у наукометричній базі даних Scopus:**

1. Kolupaev Yu.E., **Shakhov I.V.**, Kokorev A.I., Kryvoruchko L., Yastreb T.O. Gamma-aminobutyric acid modulates antioxidant and osmoprotective systems in seedlings of *Triticum aestivum* cultivars differing in drought tolerance // *Ukrainian Biochemical Journal.*, 2023. 95 №5. P. 85-97. <https://doi.org/10.15407/ubj95.05.085>
2. Kolupaev Yu.E., **Shakhov I.V.**, Kokorev A.I., Dyachenko A.I., Dmitriev A.P. 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 // *Cytology and Genetics.* 2024. 58, №2. P. 81-91. <https://doi.org/10.3103/S0095452724020063>
3. **Shakhov I.V.**, Kokorev A.I., Yasterb T.O., Dmitriev A.P., Kolupaev Yu.E. Increasing germination and antioxidant activity of aged wheat and triticale grains by priming with gamma-aminobutyric acid // *Ukrainian Botanical Journal.* 2024. 81, №4. P. 290-304. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj81.04.290>
4. Kolupaev Yu.E., **Shakhov I.V.**, Kokorev A.I., Relina L.I., Dyachenko A.I., Dmitriev A.P. Gamma-aminobutyric acid induction of triticale protective systems under drought, salt stress or a combination of the two // *Turkish Journal of Botany.* 2024. 48, №5. P. 235-248. <https://doi.org/10.55730/1300-008X.2812>
5. **Shakhov I.V.**, Relina L.I., Pyshchalenko M.A., Kolupaev Yu.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 // *Notulae Scientia Biologicae.* 2025. 17, №2. 12366. <https://doi.org/10.55779/nsb17212366>
6. **Shakhov I.V.**, Yastreb T.O., Sakhno T.V., Kolupaev Yu.E. Involvement of Nitric Oxide in  $\gamma$ -Aminobutyric Acid-Induced Cellular Mechanisms of Wheat Seedling Adaptation to Water Deficit// *Cytology and Genetics.* 2025. 59, №6. P. 580-595. <https://doi.org/10.3103/S0095452725060106>

### Статті у наукових фахових виданнях України:

7. Колупаєв Ю.Є., **Шахов І.В.**, Кокорев О.І., Праймування насіння донорами газотрансмітерів і сполуками з гормональною активністю: ростові та стрес-протекторні ефекти // *Фізіологія рослин та генетика*. 2023. 55, №2. С. 119-141. <https://doi.org/10.15407/frg2023.02.119>

### Матеріали конференцій:

8. Колупаєв Ю.Є., **Шахов І.В.**, Кокорев О.І., Дмитрієв О.П. Стрес-протекторний вплив гамма-аміномасляної кислоти на проростки пшениці за умов гіпертермії: роль активних форм кисню і антиоксидантної системи // *Актуальні проблеми генетики, біотехнології та біохімії рослин: тези доповідей Міжнародної наукової конференції, присвяченої 140 річчю з дня народження академіка Андрія Сапегіна (1883–1946), ботаніка, цитолога, генетика, селекціонера (19 жовтня 2023 р. / СГІ–НЦНС. – м. Одеса, Україна): Одеса, 2023. С. 65-66.*

9. Kolupaev Yu.E., **Shakhov I.V.**, Yastreb T.O., Kokorev A.I., Dmitriev A.P. Priming with gamma-aminobutyric acid alleviates oxidative stress during germination of aged wheat and triticale seeds // *10th International Meeting on Recent Advances in Plant Biotechnology (5-25 June, 2024 Kyiv, Ukraine)*. Kyiv, 2024. P. 28.

10. **Шахов І.В.**, Кокорев О.І., Колупаєв Ю.Є. Активація дією гамма-аміномасляної кислоти антиоксидантної системи та накопичення первинних і вторинних метаболітів у проростків тритикале за умов сольового стресу // *Матеріали XV З'їзду Українського ботанічного товариства (Івано-Франківськ, 30 вересня — 4 жовтня 2024)*. — Одеса : Видавничий дім «Гельветика», 2024. С. 49.

11. Колупаєв Ю.Є., **Шахов І.В.**, Ястреб Т.О., Тарабан Д.А., Маренич М.М. NO-залежне індукування  $\gamma$ -аміномасляною кислотою проростання зернівок пшениці за умов осмотичного стресу // Біотехнологія, генетика та біохімія сільськогосподарських рослин: тези доповідей Всеукраїнської наукової конференції (30 вересня 2025 р. / СГІ– НЦНС. – м. Одеса, Україна): Одеса, 2025. С. 56-57.

12. **Шахов І.В.**, Ястреб Т.О., Тарабан Д.А., Обозний О.І., Колупаєв Ю.Є. Порівняння впливу праймінгу насіння і фоліарної обробки рослин пшениці  $\gamma$ -аміномасляною кислотою на функціонування стрес-протекторних систем за умов ґрунтової посухи // Біотехнологія, генетика та біохімія сільськогосподарських рослин: тези доповідей Всеукраїнської наукової конференції (30 вересня 2025 р. / СГІ– НЦНС. – м. Одеса, Україна): Одеса, 2025. С. 85-86.

13. **Шахов І.В.** Праймінг насіння  $\gamma$ -аміномасляною кислотою індукує розвиток солестійкості пшениці на ранніх фазах онтогенезу // Теоретичні засади інноваційного розвитку рослинництва: тези Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції, присвяченій 120-ій річниці від дня народження професора, члена-кореспондента АН УРСР Іллі Михайловича Полякова (20 жовтня 2025 р., м. Харків) / НААН, Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва. Харків, 2025. С. 152-156.

#### **Науково-методичні рекомендації:**

14. Оцінка стрес-протекторного впливу фізіологічно активних речовин на зернові злаки: Науково-методичні рекомендації / Укладачі: Колупаєв Ю.Є., Рябчун Н.І., Ястреб Т.О., Кокорев О.І., **Шахов І.В.** - Харків, 2023. - 52 с. <https://yuriev.com.ua/assets/files/posibniki/otsinka%20stres-protektorno%20vplyvu-vpr-2023.pdf.pdf>

15. Підвищення схожості насіння зернових злаків праймінгом фізіологічно активними речовинами: Науково-методичні рекомендації / Укладачі: Колупаєв Ю.Є., Ястреб Т.О., Кокорев О.І., Рябчун Н.І., **Шахов І.В.** – Харків, 2024. – 53 с. <https://yuriev.com.ua/assets/files/posibniki/pidvyshchennia-skhozhosti-vpr-2024.pdf.pdf>

16. Індукування стійкості зернових злаків до абіотичних стресорів праймінгом насіння фізіологічно активними речовинами: Науково-методичні рекомендації / Укладачі: Колупаєв Ю.Є., **Шахов І.В.**, Ястреб Т.О., Обозний О.І., Рябчун Н.І., Тарабан Д.А. – Харків, 2025. – 57 с. <https://yuriev.com.ua/assets/files/navchalni-posibnyky/nmr-2025-fiziologiya.pdf>

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ</b>	<b>23</b>
<b>ВСТУП</b>	<b>24</b>
<b>РОЗДІЛ 1. СИГНАЛЬНІ ПОСРЕДНИКИ ТА СТРЕСОВІ МЕТАБОЛІТИ: РОЛЬ В АДАПТАЦІЇ РОСЛИН ДО НЕСПРИЯТЛИВИХ АБІОТИЧНИХ ЧИННИКІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)</b>	<b>32</b>
1.1 Активні форми кисню	35
1.1.1 Клітинні компартменти та ферментативні системи, що генерують АФО	35
1.1.2 Механізми рецепції та трансдукції сигналів АФО	40
1.1.3 Роль АФО в активації деяких стрес-протекторних систем рослин	42
1.2 Нітроген оксид	43
1.2.1 Синтез нітроген оксиду у рослин	44
1.2.2 Посттрансляційні модифікації білків оксидом азоту та їх роль у процесах функціональної взаємодії NO та АФО	46
1.2.3 Участь нітроген оксиду у формуванні адаптивних реакцій рослин	48
1.3. Гамма-аміномасляна кислота: стрес-протекторні ефекти і функціональні зв'язки з ключовими сигнальними посередниками	50
1.3.1 Синтез ГАМК у рослин	50
1.3.2 Феноменологія стрес-протекторного впливу ГАМК на рослини	53
1.3.3 Функціональні зв'язки ГАМК з активними формами кисню	55
1.3.4 Функціональні зв'язки ГАМК та NO	57
Висновки до розділу 1	60
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	<b>62</b>
2.1. Експериментальні об'єкти та їх коротка характеристика	62
2.2. Дизайн експериментів та визначення фізіологічних показників	63
2.3. Біохімічні аналізи	69
2.3.1. Визначення вмісту нітроген оксиду, супероксидного аніон-радикала, гідроген пероксиду і малонового діальдегіду	69
2.3.2. Аналіз активності антиоксидантних ферментів	70
2.3.3. Визначення активності амілази у зернівках	71

	21
2.3.4. Визначення вмісту низькомолекулярних сполук зі стрес-протекторними властивостями	72
2.4. Повторність експериментів і статистична обробка результатів	73
<b>РОЗДІЛ 3. ФЕНОМЕНОЛОГІЯ ВПЛИВУ ГАМК НА СТІЙКІСТЬ ПШЕНИЦІ І ТРИТИКАЛЕ ДО АБІОТИЧНИХ СТРЕСОРІВ</b>	<b>75</b>
3.1. Вплив ГАМК на стійкість проростків пшениці до потенційно летального теплового стресу	75
3.2. Індукування дією ГАМК стійкості пшениці до модельної посухи	76
3.3. Вплив ГАМК на ріст проростків тритикале за умов осмотичного, сольового в комбінованого стресів	79
Висновки до розділу 3	83
<b>РОЗДІЛ 4. РОЛЬ СИГНАЛЬНИХ ПОСЕРЕДНИКІВ І СТРЕС-ПРОТЕКТОРНИХ СИСТЕМ У РОЗВИТКУ ІНДУКОВАНОЇ ГАМК СТІЙКОСТІ ПШЕНИЦІ І ТРИТИКАЛЕ ДО ТЕПЛООВОГО, ОСМОТИЧНОГО ТА СОЛЬОВОГО СТРЕСІВ</b>	<b>84</b>
4.1. Участь сигнальних посередників в індуванні теплостійкості проростків пшениці ГАМК	84
4.2. Вплив ГАМК на функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем етіолованих проростків пшениці і тритикале за умов модельної посухи і сольового стресу	94
4.2.1. Стан стрес-протекторних систем у проростків пшениці різних сортів за дії ГАМК і модельної посухи	94
4.2.2. Функціонування стрес-протекторних систем проростків тритикале за дії ГАМК, осмотичного і сольового стресів та їх комбінації	102
4.3. Порівняльне дослідження впливу праймінгу зернівок і фоліарної обробки рослин пшениці ГАМК на функціонування протекторних систем за умов ґрунтової посухи	111
Висновки до розділу 4	128
<b>РОЗДІЛ 5. МЕХАНЗМИ ДІЇ ГАМК НА ПРОРОСТАННЯ ЗЕРНІВОК ПШЕНИЦІ І ТРИТИКАЛЕ ЗА НОРМАЛЬНИХ І СТРЕСОВИХ УМОВ</b>	<b>130</b>
5.1. Вплив праймінгу ГАМК на стан антиоксидантної та осмопротекторної систем при проростанні зернівок пшениці за умов осмотичного і сольового стресів	130

5.2. Роль нітроген оксиду як сигнального посередника в індукуванні $\gamma$ -аміномасляною кислотою проростання зернівок пшениці за умов водного дефіциту	140
5.3. Індукування проростання зернівок пшениці і тритикале зі зниженою схожістю праймінгом ГАМК	151
Висновки до розділу 5	160
<b>ВИСНОВКИ</b>	<b>162</b>
<b>СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ</b>	<b>166</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- АФО – активні форми кисигену
- ВВВ – відносний вміст води
- ГАМК –  $\gamma$ -аміномасляна кислота
- ГПО – гваяколпероксидаза
- ДМТС – диметилтіосечовина
- ЕГТА – етиленглікольтетраоцтова кислота
- ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота
- МДА – малоновий діальдегід
- МС – метиленовий синій
- НПН – нітропрусид натрію
- ПЕГ – поліетиленгліколь
- ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів
- ПТМ – посттрансляційна модифікація білків
- СОД – супероксиддисмутаза
- ТБК – тіобарбітурова кислота
- ТХО – трихлороцтова кислота
- ФАР – фізіологічно активні речовини
- ФС – фенольні сполуки

## ВСТУП

**Актуальність дисертаційної роботи.** Згідно з прогнозами Продовольчої та сільськогосподарської організації Об'єднаних Націй (ФАО), до 2050 року населення Землі досягне 9,0 млрд. осіб, що створить необхідність збільшити виробництво продовольства на 60% (Razzaq et al., 2021). Однак це завдання суттєво ускладнює погіршення умов довкілля (Bashir et al., 2025). Прискорення індустріалізації та урбанізації у поєднанні з наслідками глобальної зміни клімату створило безліч викликів для функціонування агроєкосистем (Li et al., 2024). За останні три десятиліття стихійні лиха, пов'язані з кліматом, завдали світовій економіці збитків приблизно на 3,8 трильйона доларів США, причому на посухи припадає майже дві третини збитків сільському господарству (Syed & Mishra, 2025). Іншим чинником, що часто впливає на рослини в тих самих регіонах, що й посуха, є засолення ґрунтів, якому піддається не менше 20% від загальної площі зрошуваних земель (Ul Mushtaq et al., 2021). При цьому щорічно 1,5 млн га зрошуваних земель у світі стають непридатними для вирощування сільськогосподарських культур через критично високий вміст солей.

Одночасно із посухою та засоленням ґрунтів посилюється вплив на продовольчі рослини екстремально високих температур. Очікується, що зміна клімату призведе до підвищення температури, зміни характеру опадів та збільшення частоти екстремальних погодних явищ. До кінця поточного століття середня глобальна температура може виявитися на 1,8–4,0 °C вищою, ніж 2000 року (Razzaq et al., 2021). Таким чином, вплив стресів, пов'язаних з кліматичними змінами, на рослини стає одним з глобальних викликів для продовольчої безпеки. Вже нині щорічні світові втрати врожайності основних сільськогосподарських культур, пов'язані з дією абіотичних стресів, оцінюються у 51–82% (Pagano et al., 2023; Teshome et al., 2020).

Для пом'якшення наслідків впливу на рослини абіотичних стресів пропонуються дві основні стратегії. Перша передбачає створення стійких сортів методами традиційної та молекулярної селекції, генної інженерії та/або підходів редагування геному (Hossain et al., 2021). Проте в останні роки дослідники все частіше констатують, що селекційно-генетичні методи за своєю природою настільки тривалі і трудомісткі, що не дають можливості швидко адаптувати рослинництво до стрімких змін клімату (Syed & Mishra, 2025). Друга стратегія базується на застосуванні покращених кліматично оптимізованих сільськогосподарських технологій, які сприяють розкриттю адаптаційного потенціалу вже існуючих сортів та гібридів. Однією з найважливіших складових такого підходу є застосування фізіологічно активних речовин нового покоління з одночасним удосконаленням способів впливу цих сполук на вегетуючі рослини та насіння (Syed & Mishra, 2025). Дослідження останніх років показують, що обробка рослин такими сполуками дає можливість в часі і просторі регулювати клітинні транскриптом та метаболізм, дозволяючи отримувати цілеспрямовані відповіді, необхідні для адаптації рослин до несприятливих факторів середовища (Bashir et al., 2025).

Активне накопичення нових знань про механізми трансдукції стресових сигналів у генетичний апарат рослин, з'ясування механізмів регуляції адаптивних реакцій рослин відкриває можливості для цілеспрямованого практичного застосування нових груп фізіологічно активних сполук – індукторів стійкості (Ashraf et al., 2019; Sako et al., 2019). Спектр цих речовин постійно розширюється. Нині крім класичних фітогормонів та їх аналогів значне місце у ньому посідають сполуки, що виконують сигнальні функції, а також мультифункціональні метаболіти, які виявляють дуже широкий спектр фізіологічної активності, що зумовлено їх залученням в систему сигнальної та гормональної регуляції, а також прямою стрес-протекторною дією (Salam et al., 2023). В останні роки в центрі уваги дослідників опинилися так звані «рослинні нейротрансмітери» — сполуки,

що виконують роль медіаторів передачі нервового збудження у тварин (мелатонін, серотонін, біогенні аміни,  $\gamma$ -аміномасляна кислота (ГАМК) та ін.) (Akula & Mukherjee, 2020; Mishra & Sarkar, 2023; Raza et al., 2025).

ГАМК є ключовим метаболітом, що бере участь у стресових реакціях у різних біологічних системах, включаючи прокаріоти, одноклітинні еукаріоти та вищі рослини (Suhel et al., 2023). Ця сполука виконує численні фізіологічні ролі в рослинах (X. Li et al., 2021), зокрема, бере участь у центральному карбоновому метаболізмі, засвоєнні нітрогену та функціонує як регуляторна молекула під час стресу та адаптації (Kolupaev et al., 2024a). Її вміст у рослинах за стресових умов зазвичай підвищується (Jalil et al., 2025).

Однак відомості про механізми стрес-протекторної дії ГАМК поки що мають здебільшого емпіричний характер. Незважаючи на виявлення ймовірних рецепторів ГАМК в рослинних клітинах, наявність окремих даних стосовно її можливих зав'язків з ключовими сигнальними посередниками, а також відомостей про захисні реакції, які активуються внаслідок обробки рослин екзогенною ГАМК, дотепер не складено навіть схематичної картини, яка б пояснювала широкий спектр стрес-протекторних ефектів ГАМК (Kolupaev et al., 2024a). Зокрема, на момент початку наших досліджень були відсутні дані про залучення активних форм кисню (АФО) та іонів кальцію в реалізацію стрес-протекторного впливу ГАМК на рослини за умов температурних стресів. Так само недослідженим залишалося питання щодо участі нітроген оксиду в реалізації впливу ГАМК на ростові процеси за умов осмотичних стресів.

На прикладі поодиноких видів рослин (*Cucurbita pepo* subsp. *Pepo*) показано позитивний вплив ГАМК на зберігання насіння за умов його прискореного старіння (Tavakkol Afshari & Seyyedi, 2020). Разом з тим, вплив ГАМК на проростання старіючих зернівок злаків взагалі не вивчався, а можливість індукування стійкості культурних злаків шляхом праймування насіння розчинами ГАМК досліджена недостатньо.

**Мета і завдання досліджень.** Основна мета роботи полягала у встановленні участі ключових клітинних сигнальних посередників – АФО, іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та нітроген оксиду – у реалізації впливу ГАМК на стійкість зернових злаків до дії абіотичних стресорів і процеси проростання їх зернівок та у виявленні метаболічних процесів, чутливих до дії екзогенної ГАМК, що необхідно для теоретичного обґрунтування застосування ГАМК як стрес-протектора у рослинницьких агробіотехнологіях.

Робота включала такі завдання:

- Дослідити вплив ГАМК на інтегральні показники стійкості пшениці і тритикале до дії високої температури, осмотичного і сольового стресів на ранніх фазах розвитку;
- Встановити роль АФО та іонів кальцію у розвитку індукованої ГАМК теплостійкості проростків пшениці;
- Оцінити вплив екзогенної ГАМК на функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем етіюльованих проростків пшениці і тритикале за умов модельної посухи і сольового стресу;
- Порівняти вплив праймінгу зернівок і фоліарної обробки рослин пшениці ГАМК на функціонування протекторних систем за умов ґрунтової посухи;
- Дослідити вплив праймінгу насіння пшениці ГАМК на його схожість за несприятливих умов та встановити роль нітроген оксиду як посередника в процесах, необхідних для проростання зернівок і адаптації проростків;
- Встановити здатність ГАМК коригувати редокс-гомеостаз і поліпшувати схожість старого насіння зернових злаків.

**Об'єкт дослідження:** сигнальні посередники, метаболічні процеси і стрес-протекторні реакції рослин, перебіг яких чутливий до дії ГАМК.

**Предмет дослідження:** характеристики проростання зернівок, росту і стійкості рослин до абіотичних стресорів, динаміка генерації сигнальних

посередників, зміни у функціонуванні антиоксидантної системи, синтезі стресових метаболітів.

**Методи досліджень:** фізіологічні (дослідження впливу ГАМК на стійкість етіологованих проростків і зелених рослин до абіотичних стресорів, процеси проростання насіння, інгібіторний аналіз дії ГАМК з використанням скавенджерів АФО та NO, антагоністів кальцію і т. ін.); біохімічні (визначення інтенсивності генерації АФО, нітроген оксиду, активності амілази та антиоксидантних ферментів, вмісту первинних і вторинних стресових метаболітів); математико-статистичні (дисперсійний аналіз (ANOVA) із подальшими множинними порівняннями за методом Тьюкі; кореляційний аналіз, аналіз головних компонент (PCA)).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше показано роль АФО, що генеруються за участю НАДФН-оксидази, в індукуванні теплостійкості проростків пшениці дією ГАМК та із застосуванням інгібіторного аналізу отримано дані про залучення іонів кальцію, що надходять в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів, в регуляцію утворення АФО і активності антиоксидантних ферментів.

Вперше доведено, 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. Вказані ефекти ГАМК не проявлялися в присутності скавенджера NO метиленового синього. Водночас за дії ГАМК відбувалося зростання ендogenous вмісту NO у пагонах, а екзогенна обробка насіння донором нітроген оксиду нітропрусидом натрію (НПН) призводила до фізіологічних ефектів, схожих на спричинювані дією ГАМК.

Уперше досліджені видові особливості реакції на дію екзогенної ГАМК проростків тритикале – міжродового гібрида жита і пшениці, що відрізняється від пшениці більш активним накопиченням вторинних метаболітів. Показана можливість підвищення посухо- та солестійкості проростків тритикале їх обробкою ГАМК, що виявлялася у значному пом'якшенні рістінгібувальної дії цих двох стресорів та особливо їх комбінації. При цьому ГАМК помітно підвищувала обводненість тканин і зменшувала прояви окиснювального стресу. Протекторна дія ГАМК виявлялася у підвищенні активності антиоксидантних ферментів у фізіологічно нормальних та стресових умовах, посиленні накопичення проліну, стабілізації пулу розчинних вуглеводів та істотному зростанні вмісту фенольних сполук і антоціанів.

Уперше показано позитивний вплив праймінгу ГАМК на проростання насіння пшениці і тритикале зі зниженими посівними якістьми, який зумовлений пом'якшенням окиснювального стресу, особливо інтенсивного при проростанні старого насіння.

**Наукове значення виконаного дослідження із зазначенням можливих наукових галузей та розділів програм навчальних курсів, де можуть бути застосовані отримані результати.** Результати дисертаційної роботи доцільно використовувати у закладах вищої освіти для підготовки здобувачів спеціальностей 091 «Біологія», 201 «Агрономія», у навчальному курсі «Фізіологія і біохімія рослин» та спеціальних курсів, пов'язаних зі стійкістю рослин. Результати роботи включені у вибіркочну освітню компоненту «Фізіологічні основи стійкості рослин до абіотичних стресів» в освітньо-науковій програмі «Агрономія» зі спеціальності 201 «Агрономія» в Інституті рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України.

**Практичне значення отриманих результатів.** Продемонстрована можливість підвищення шляхом праймінгу насіння зернових злаків (пшениці, тритикале) розчинами ГАМК стійкості до осмотичних стресів. Такий ефект спостерігається як під час проростання насіння за умов осмотичного або

сольового стресів, так і за впливу посухи на зелені рослини. Вперше проведено порівняння впливу фоліарної обробки та праймінгу насіння ГАМК на посухостійкість рослин у фазі двох листків і встановлено більш помітні позитивні ефекти праймінгу на ростові характеристики, водний режим рослин, вміст фотосинтетичних пігментів та функціонування стрес-протекторних систем. Ці результати роботи можуть мати безпосереднє застосування в агробіотехнологіях.

Також доведено можливість використання праймінгу ГАМК як способу підвищення схожості насіння зернових злаків з низькими посівними якостями, зумовленими старінням, що може бути застосовано у роботі з генетичними ресурсами рослин. Отримані результати включені у науково-методичні рекомендації «Оцінка стрес-протекторного впливу фізіологічно активних речовин на зернові злаки» (2023 р.), «Підвищення схожості насіння зернових злаків праймінгом фізіологічно активними речовинами» (2024 р.) та «Індукування стійкості зернових злаків до абіотичних стресорів праймінгом насіння фізіологічно активними речовинами (2025 р.), виданими Інститутом рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України за співавторства здобувача.

Результати роботи можуть використовуватися у наукових установах НАН України і НААН України та закладах вищої освіти, які проводять фундаментальні і прикладні дослідження у галузі стресу і адаптації рослин. Крім того, отримані результати можуть бути включені у навчальні програми закладів вищої освіти для підготовки фахівців у галузі біології, біотехнології, агрономії та екології.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційне дослідження виконувалося в рамках проєктів 14.00.02.05Пк «Розроблення тест-системи для скринінгу стрес-протекторної дії нових фізіологічно активних речовин на зернові злаки» (№ держреєстрації 0123U100486) і 14.00.02.06П «Розробка методів праймінгу насіння зернових злаків дією донорів газотрансмітерів та сполук з гормональною активністю» (№ держреєстрації 0124U000126), згідно з Договором про наукову співпрацю

між Державним біотехнологічним університетом та Інститутом рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України, а також теми НДР кафедри землеробства та гербології Державного біотехнологічного університету «Регуляція адаптивних реакцій рослин з участю активних форм кисню і азоту та нейромедіаторів» (№ держреєстрації 0123U100582).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертант самостійно здійснив пошук та опрацювання джерел наукової літератури, освоїв відповідні методи досліджень та провів всі необхідні експерименти. Отримані результати інтерпретовані, узагальнені і підготовлені до публікації за участі наукового керівника. Частина експериментів проведена спільно зі співробітниками Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України к.б.н. Т.О. Ястреб та д-ром філософії О.І. Кокоревим. Частка особистої участі здобувача становить понад 70%.

**Апробація результатів дисертаційної роботи.** Основні результати дисертаційних досліджень були представлені на Міжнародній науковій конференції, присвяченій 140 річчю з дня народження академіка Андрія Сапегіна (м. Одеса, жовтень 2023 р.); 10th International Meeting on Recent Advances in Plant Biotechnology (м. Київ, червень, 2024 р.); XV З'їзді Українського ботанічного товариства (м. Івано-Франківськ, 30 вересня — 4 жовтня 2024); Всеукраїнській науковій конференції «Біотехнологія, генетика та біохімія сільськогосподарських рослин» (м. Одеса, вересень 2025 р.); Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції молодих вчених, присвяченій 120-ій річниці від дня народження І.М. Полякова «Теоретичні засади інноваційного розвитку рослинництва» тези (м. Харків, жовтень 2025 р.).

**Структура і обсяг роботи.** Дисертація складається зі вступу, п'яти розділів (огляд літератури, опис об'єктів і методів досліджень та три експериментальні розділи), узагальнення, висновків та списку використаних джерел. Робота викладена на 198 сторінках, містить 53 рисунки. Список цитованої літератури налічує 237 джерел.

## **РОЗДІЛ 1. СИГНАЛЬНІ ПОСРЕДНИКИ ТА СТРЕСОВІ МЕТАБОЛІТИ: РОЛЬ В АДАПТАЦІЇ РОСЛИН ДО НЕСПРИЯТЛИВИХ АБІОТИЧНИХ ЧИННИКІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)**

Абіотичний стрес – це несприятливий вплив будь-якого абіотичного фактора на рослину в певному середовищі, що призводить до низки реакцій організму, що супроводжуються змінами експресії генів та клітинного метаболізму, котрі у свою чергу спричиняють зміни морфології, росту та розвитку (Zhang et al., 2023). За сучасними уявленнями молекулярні механізми реакції рослин на абіотичні стреси включають у себе зміни різних процесів, що мають певну ієрархію. Формування відповіді рослини на зміни в середовищі включає сприйняття, передачу сигналів, зміни транскриптому, трансляцію та модифікацію білків (Praveen et al., 2023).

Сприйняття рослиною багатьох абіотичних стресів пов'язане із зміною стану клітинних мембран. Пошуки будь-яких специфічних рецепторів (сенсорів) абіотичних стресів поки що не можна назвати успішними, оскільки мішенями дії таких факторів (наприклад, екстремальних температур чи посухи) стають одночасно багато молекул, молекулярні комплекси та клітинні структури. Більше того, сама дія абіотичного стресора є не певною специфічною «молекулою», як це, наприклад, має місце при сприйнятті рослинними клітинами патогенних елісіторів, а по суті фізичним фактором (Dong et al., 2022).

У ролі сенсорів, що сприймають абіотичні стресові впливи, можуть бути в першу чергу різні сенсорні кінази, іонні (передусім кальцієві) канали, окислювальні комплекси, що містять електрон-транспортні компоненти (наприклад, внутрішні мембран хлоропластів і мітохондрій), а також елементи цитоскелету (Chinnusamy et al., 2007; Chae et al., 2009; Tor et al., 2009). Найбільш ймовірними білками-сенсорами стресових впливів вважають білки кальцієвих каналів, оскільки зміна концентрації кальцію в цитозолі є

швидкою клітинною реакцією на дію стресорів (Dong et al., 2022). Як одна з мішеней дії осмотичного стресу розглядаються іонні канали OSCA. Зниження тургорного тиску клітин, спричинене водним дефіцитом, зменшує бічний натяг у ліпідному бішарі, що призводить до відкривання іонних каналів OSCA і забезпечує доступ кальцію в клітини (Zhang et al., 2022).

Незважаючи на слабку вивченість самих сенсорів, що сприймають дію абіотичних стресорів, дуже інтенсивно розширюються знання про посередників, які забезпечують трансдукцію стресових сигналів до генетичного апарату. Найбільш дослідженим і багатофункціональним клітинним месенджером нині вважається кальцій. При стресах різної природи відбувається підвищення концентрації цитозольного кальцію за рахунок вивільнення іонів  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинних компартментів або їх надходження з позаклітинного простору. Ці зміни сприймаються як сигнали і передаються різними білками, що зв'язують кальцій, такими, як, наприклад, кальмодулін (CD) або CD-залежні протеїнкінази (CDPK), що необхідно для запуску різних наступних реакцій на стрес (Manasa et al., 2022; Zhang et al., 2023). Однак сигнальні ефекти кальцію не обмежуються його прямою взаємодією з білками. Вони супроводжуються активацією практично всієї сигнальної мережі рослинних клітин. З іонами кальцію функціонально дуже тісно пов'язані активні форми кисню (АФО) (Kolupaev et al., 2015). Досить згадати найбільш досліджені приклади взаємодії кальцію із цими сигнальними посередниками. Так, відомо, що кальцій прямо та опосередковано активує НАДФН-оксидазу – один із основних ферментів АФК-сигналіngu (Baxter et al., 2014). З іншого боку, потенційно залежні кальцієві канали можуть активуватися під дією АФО (Mori, Schroeder, 2004).

Поряд з АФО та кальцієм важливими внутрішньоклітинними посередниками у рослинних та тваринних клітинах є газотрансмітери (ГТ). Цим терміном об'єднують невеликі газоподібні молекули, що синтезуються живими організмами та виконують сигнальні функції. Основними ГТ у рослин вважаються нітроген оксид (NO), гідроген сульфід ( $H^2S$ ) та карбон

монооксид (CO) (Kolupaev et al., 2019a; 2022; Yao et al., 2019). Особливостями цих молекул є: здатність проходити через клітинні мембрани, можливість функціонувати незалежно від конкретних рецепторів, генерація за допомогою ферментів, наявність специфічних клітинних компонентів-мішеней (насамперед білків, які зазнають посттрансляційної модифікації за допомогою ГТ), а також тісний зв'язок з іншими сигнальними посередниками (Karle et al., 2021).

З іншого боку, вирішальну роль у відповідях рослин на стрес відіграє метаболізм, який охоплює повний набір метаболітів (Khalid et al., 2025; Salam et al., 2023). При цьому зміна вмісту в рослинах багатьох метаболітів є не лише кінцевим результатом сприйняття стресового сигналу та змін експресії генів, а й фактором, що суттєво впливає на функціонування сигнальної мережі (Kolupaev et al., 2025a; 2025c). В останні роки у фокусі уваги дослідників перебуває набір мультифункціональних стресових метаболітів, які можуть виступати як антиоксиданти, осмопротектори, мембранопротектори, шаперони, стабілізатори внутрішньоклітинного рН, хелатори важких металів і т. д. (Singh et al., 2019; Goharrizi et al., 2021). Однак особливий інтерес становить здатність деяких стресових метаболітів брати участь у функціонуванні клітинних сигнальних мереж та функціонально взаємодіяти з сигнальними посередниками та фітогормонами (Pal et al., 2015; de Sousa Araújo et al., 2019; Kolupaev et al., 2022c). Саме у такому контексті останніми роками розглядаються протекторні функції таких відомих метаболітів, як поліаміни, пролін, гліцин-бетаїн і ГАМК, які пов'язані між собою у метаболічних циклах (Pal et al., 2018; Basit et al., 2025). Важливою особливістю цих сполук є тісні функціональні зв'язки з АФО і нітроген оксидом (Nidhi et al., 2025). ГАМК серед стресових метаболітів рослин посідає особливе місце, оскільки є не тільки учасником метаболізму і сполукою з прямою стрес-протекторною дією (зокрема, антиоксидантною, мембрано- та осмопротекторною), а й входить до числа так званих «рослинних нейротрансмітерів».

Ссавці та рослини синтезують чимало подібних хімічних сполук, які опосередковують клітинні функції та передають ці сигнали для виживання та спілкування. Існують гіпотези, згідно з якими в ході еволюції природа сигнальних молекул зберіглася в усіх живих царствах (Akula, Mukherjee, 2020). Нейротрансмітери, такі як ацетилхолін, біогенні аміни, індоламіни і ГАМК, виявлені не тільки у ссавців, але й в усіх живих організмів, включаючи рослини (Dehghanian et al., 2024; Malakar et al., 2024; al., 2025). Нині накопичуються дані про залучення нейротрансмітерів до системи передачі сигналів у клітинах рослин та про їх функціональну взаємодію з ключовими сигнальними молекулами. Зокрема, віднедавна почалися дослідження функціональних зв'язків між ГАМК як рослинним нейротрансмітером і АФО, оксидом азоту та іонами кальцію як сигнальними посередниками при формуванні адаптивних реакцій (Suhel et al., 2023; Koluраev et al., 2024a). Іншою причиною уваги до ГАМК є отримані в останні роки дані, що вказують на високу ефективність екзогенної ГАМК як стрес-протектора рослин (Hasan et al., 2021). Водночас ці дані мають переважно феноменологічний характер. Отже, для з'ясування місця ГАМК в сигнально-регуляторній мережі рослинних клітин, від функціонування якої залежить формування адаптивних реакцій і стійкість рослин як така, необхідні як спеціальні експериментальні дослідження, так і аналіз та узагальнення наявних на даний час відомостей.

## **1.1 Активні форми кисню**

### **1.1.1 Клітинні компартменти та ферментативні системи, що генерують АФО**

До АФО належать частково відновлений або активований молекулярний кисень або оксигеновмісні продукти реакцій, що мають вищу реакційну здатність, ніж атмосферний  $O_2$  (Hasanuzzaman et al., 2020a). Серед них виділяють вільнорадикальні частинки – супероксидний аніон-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), гідроксильний ( $\cdot OH$ ) та гідропероксильний ( $HO_2^{\cdot}$ ) радикали, а також

нейтральні молекули, такі як гідроген пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), синглетний кисень ( $^1\text{O}_2$ ) та ін. (Gill, Tuteja, 2010). Більшість АФО характеризується коротким часом існування від наносекунд для радикальних форм до десятків секунд або декількох хвилин для гідроген пероксиду (Колупаев, Карпец, 2019).

У кисневому середовищі клітинні процеси, що характеризуються високими темпами перенесення електронів або енергії, неминуче призводять до утворення АФО шляхом витоку електронів або енергії до молекулярного кисню. Крім того, в процесі еволюції у живих організмів сформувалося безліч ферментативних реакцій, що призводять до утворення АФО як первинного або побічного продукту (Waszczak et al., 2018). Протягом останніх кількох десятиліть концепція окиснювального стресу, в рамках якої АФО розглядалися як шкідливі речовини, що невідбирково окиснюють різні молекули та структури, змінилася на концепцію сигналінгу АФО (Hasanuzzaman et al., 2020b). Вважається, що підвищення темпів утворення АФО спричиняє зрушення у компартментальному клітинному редокс-балансі у бік більш окисненого стану, які можуть бути сприйняті різними компартментально-специфічними системами для регуляції експресії генів (Waszczak et al., 2018).

Процес фотосинтезу – одне з основних джерел утворення АФО у клітинах зелених рослин. Супероксидний аніон-радикал є головним первинним продуктом відновлення молекулярного кисню у хлоропластах за функціонування фотосистеми I (Foyer, Shigeoka, 2011) (рис. 1.1). Утворення супероксидного радикала в хлоропластах у реакції Мелера відбувається в результаті одноелектронного відновлення  $\text{O}_2$  за рахунок ферредоксину. Супероксидні аніон-радикали за допомогою супероксиддисмутази (СОД) або спонтанно перетворюються на кисень та гідроген пероксид. Надалі тилакоїдна аскорбатпероксидаза, а також пероксиредоксини (Prxrs) та ферменти, подібні до глутатіонпероксидази, можуть відновлювати  $\text{H}_2\text{O}_2$  до води (Waszczak et al., 2018). Фотосистема II розглядається як основне джерело синглетного кисню (рис. 1.1). Його утворення відбувається

внаслідок фотосенсибілізації. Фотосенсибілізатором виступає хлорофіл Р680, який, поглинаючи фотон, переходить у збуджений стан, і потім викликає перехід триплетного кисню високореактивний синглетний, при цьому сам хлорофіл повертається у вихідний стан.

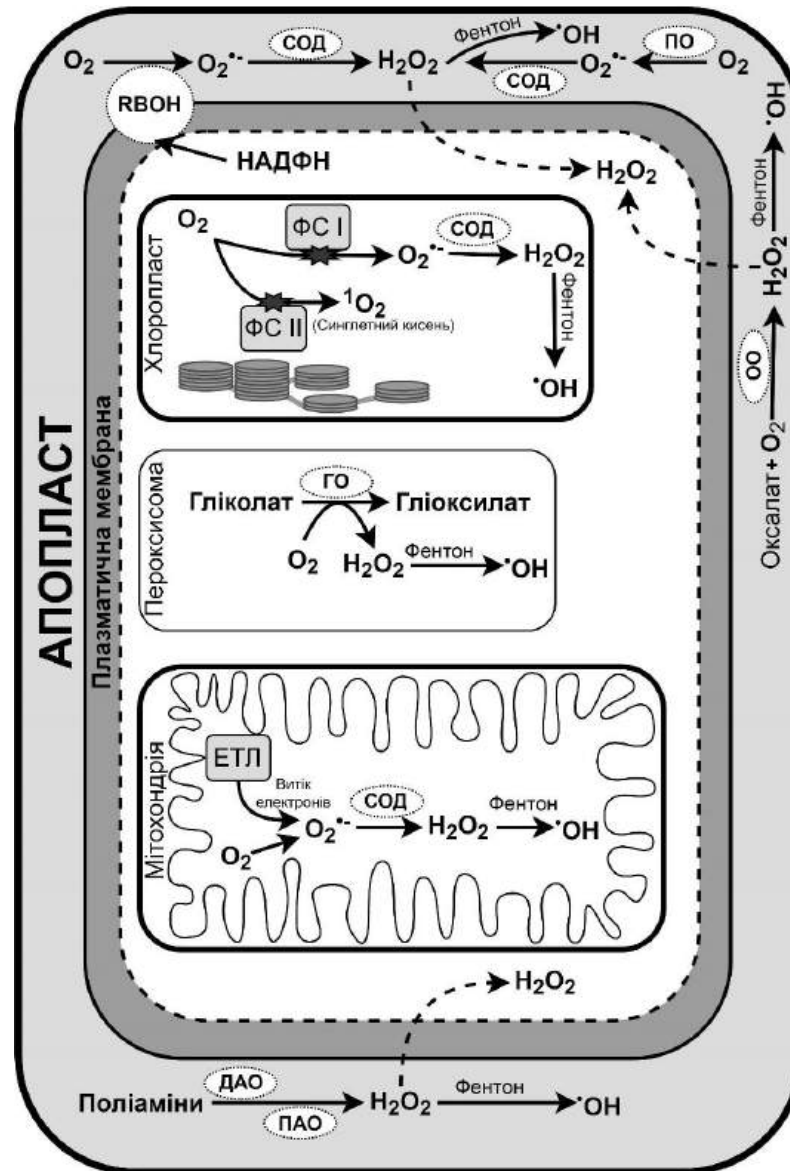


Рис. 1.1. Шляхи утворення АФО в компартментах рослинних клітин. RВОН – NADPH-оксидаза; СОД – супероксиддисмутаза; ПО – пероксидаза; ФС – фотосистема; ГО – гліколатоксидаза; ЕТЛ – електрон-транспортний ланцюг; ДАО – діаміноксидаза; ПАО – поліаміноксидаза; ОО – оксалатоксидаза. Інші пояснення в тексті.

Пероксисоми поряд з хлоропластами також є компартментами, що генерують велику кількість АФО у рослинних клітинах (Waszczak et al., 2018) (рис. 1). За звичайної концентрації  $\text{CO}_2$  в атмосфері значна частина каталітичних циклів рибулозобісфосфаткарбоксилази призводить до оксигенації, а не карбоксилювання рибулозо-1,5-бісфосфату. 2-Фосфогліколат, що утворюється, метаболізується до гліколату і транспортується в пероксисоми, де окиснюється до гліоксилату за допомогою гліколатоксидази з одночасним утворенням гідроген пероксиду. У фотосинтетично активних тканинах утворення АФО у пероксисомах тісно пов'язане з фотосинтезом (Foyer, Noctor, 2016). Однак оскільки пероксисоми мають потужну систему знешкодження пероксиду водню, активація фотодихального шляху не обов'язково призводить до збільшення концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

У незелених органах рослин, особливо у коренях, основними місцями генерації АФК є мітохондрії (рис. 1.1). Мітохондріальний електрон-транспортний ланцюг (ЕТЛ) містить електрони з достатньою вільною енергією. При цьому 0,2–2% електронів, що передаються, взаємодіють з  $\text{O}_2$  з утворенням АФО. Найбільший внесок у генерацію АФО роблять комплекси I, II і III мітохондрій. При абіотичних стресах посилюється витік електронів з цих комплексів з утворенням супероксидного аніон-радикала, який перетворюється на  $\text{H}_2\text{O}_2$  супероксиддисмутазами (Mn-SOD та Cu-Zn-SOD) (Hasanuzzaman et al., 2020a; 2020b).

Крім перелічених органел у рослинних клітинах дуже важливими компартментами утворення АФО є також плазматична мембрана та клітинні стінки, де локалізовані НАДФН-оксидаза, пероксидази та деякі інші ферменти, причетні до утворення пулу саме сигнальних АФО (рис. 1.1).

Одним із основних ферментів, що генерують АФО, задіяних у сигнальній мережі рослинних клітин, є НАДФН-оксидаза, яка представлена щонайменше кількома молекулярними формами. НАДФН-оксидази, локалізовані в плазматичній мембрані клітин рослин, є гомологами

респіраторних оксидаз (RBOH) клітин людини і тварин. Вони опосередковують передусім утворення апопластних АФО у рослинах. Загалом їх роль у контролі реакцій розвитку та стресових реакцій вивчена досить добре (Suzuki et al., 2011; Sierla et al., 2016; Waszczak et al., 2018). НАДФН-оксидази є еволюційно консервативними і присутні у всіх царствах.

За останні два десятиліття встановлено шляхи прямого та опосередкованого (через активацію протеїнкінази) впливу кальцію на активність НАДФН-оксидази рослин. Зокрема, на зв'язок між активацією активності НАДФН-оксидази шляхом фосфорилування зі змінами кальцієвого гомеостазу вказують кілька фактів. Згідно з однією з моделей, кальцій активує  $\text{Ca}^{2+}$ -залежну протеїнкіназу, яка фосфорилує N-кінцеву ділянку мембранозв'язаної субодиниці (RBOH) НАДФН-оксидази та спричиняє її конформаційні зміни, що сприяють зв'язуванню з нею цитозольного компонента – Pop-білка (ГТФази). В результаті відбувається утворення активного димеру, що призводить до посилення генерації АФО (Wong et al., 2007). Пізніше на прикладі однієї з форм мембранозв'язаної субодиниці НАДФН-оксидази рису (OsRBOHВ) було показано наявність у N-термінальній ділянці EF-рук, що свідчить про формування димеру за участю кальцію (Oda et al., 2010). Таким чином, підвищення активності НАДФН-оксидази за участю кальцію, мабуть, пов'язане не тільки з активацією ним протеїнкінази, але й з прямою взаємодією іонів  $\text{Ca}^{2+}$  з каталітичною субодиницею.

Ще один механізм регуляції активності НАДФН-оксидази полягає у зв'язуванні з каталітичною субодиницею фосфатидної кислоти (Marino et al., 2012), яка є продуктом перетворення мембранних ліпідів за участю фосфоліпази D. Зокрема, показано, що мутація за залишком аргініну в N-термінальній ділянці субодиниць AtRBOHD і AtRBOHF призводить до втрати їхньої здатності зв'язувати фосфатидну кислоту та активуватися під її впливом (Zhang et al., 2009).

Помітний внесок в утворення АФО поверхнею рослинних клітин можуть мати неспецифічні пероксидази. Відомо, що гемові пероксидази класу III складають близько половини оксидоредуктаз клітинних стінок (Колупаєв, Карпец, 2019). Поряд з антиоксидантною активністю пероксидази можуть проявляти і оксидазну активність з передачею електронів від відновників (наприклад, НАДН) на кисень та утворенням АФО.

Роль апопластних пероксидаз як продуцентів АФО була спочатку показана інгібіторними методами, а пізніше шляхом створення мутантних ліній арабідопсису, що дозволило встановити наявність двох пероксидаз PRX33 та PRX34, які є ключовими ферментами, що сприяють утворенню апопластних АФО, зокрема за умов біотичних стресів (Waszczak et al., 2018).

До ферментів, що можуть генерувати відносно помітну кількість гідроген пероксиду, належать також поліаміноксидази. Мідевісна діамінооксидаза (ДАО) і флавіновмісна поліамінооксидаза (ПАО) поряд з пероксидазами є потужними джерелами утворення АФО в апопласті (Kolupaev et al., 2022b). Також відомо, що ці ферменти генерують АФО у пероксисомах (Fraudentali et al., 2021). ДАО і ПАО окиснюють поліаміни за вторинними аміногрупами з одночасним утворенням  $H_2O_2$ .

Збільшення активності ДАО та ПАО під впливом поліамінів, у тому числі екзогенних, є, ймовірно, ключовим механізмом посилення генерації АФО рослинними клітинами у їхній присутності. При цьому АФО розглядаються як важливі посередники у реалізації фізіологічних (стрес-протекторних) ефектів поліамінів (Kolupaev et al., 2022c).

### **1.1.2 Механізми рецепції та трансдукції сигналів АФО**

У зв'язку з високою реакційною здатністю та коротким часом життя АФО, передача їх сигналів здійснюється в основному за допомогою окиснювальних посттрансляційних модифікацій білків (окси-ПТМ) (Wang et al., 2024). Ця унікальна особливість дозволяє АФО впливати на широкий спектр білків і забезпечує динамічну та просторово-часову регуляцію шляхів передачі сигналів у відповідь на дію стресорів, що відрізняє їх від класичних

регуляторних молекул, таких як фітогормони (Mittler et al., 2022; Wang et al., 2024).

Тіольні групи (-SH) залишків цистеїну в білках схильні до впливу АФО, в першу чергу, гідроген пероксиду. Перший продукт окиснення тіолів під впливом  $H_2O_2$  являє собою сульфенову кислоту (-SOH), яка може бути відновлена до тіолу. Бічні ланцюги білків, що містять сульфенову кислоту, завдяки своїй високій реакційній здатності, можуть ковалентно зв'язуватися з низькомолекулярними тіолами, такими як відновлений глутатіон (GSH) (Mir et al., 2024).

Подальше окиснення сульфенової кислоти пероксидом водню призводить до утворення більш складних продуктів окиснення - сульфінової (-SO<sub>2</sub>H) і сульфонової (-SO<sub>3</sub>H) кислот. Ці процеси вважаються незворотними (Wang et al., 2024).

Незважаючи на те, що механізм окси-ПТМ досить простий і зрозумілий, досі мало інформації про конкретні білки, що модифікуються гідроген пероксидом, і ролі цих білків у трансдукції сигналів та формуванні реакцій у відповідь на стресові фактори.

Важливу групу сенсорів АФО, які забезпечують передачу їх сигналів, складають рецепторні кінази. Так, наприклад, локалізована в плазматичній мембрані рецептороподібна протеїнкіназа з багатими лейцином повторами GUARD CELL HYDROGEN PEROXIDE-RESISTANT 1 (GHR1) відіграє критичну роль у передачі сигналів АФО в апопласті, сприймаючи АФО, що утворюються за участю НАДФН-оксидази (Wang та ін., 2024). Цей білок задіяний у регуляції руху проростків.

Іншу групу білків, регульованих АФО, становить ряд транскрипційних факторів та регуляторів транскрипції. До таких відносять мембранно-зв'язані транскрипційні фактори NAC, GARC, ENO2 та MBF1c (Kim et al., 2020; Liu et al., 2022b; Zhang et al., 2023; Wang et al., 2024).

Серед стресових білків, синтез яких регулюється за допомогою окси-ПТМ регуляторних білків, білки теплового шоку. Показано, що підвищення

вмісту ендogenous гідроген пероксиду в клітинах листків арабідопсису, спричинене тепловим стресом або екзогенною обробкою  $H_2O_2$ , призводило до переміщення фактора теплового шоку HSFA8 з цитозолу в ядро (Giesguth et al., 2015). Під впливом АФО, що утворюються в хлоропластах, схожої модифікації зазнають фактори теплового шоку HSFA1a. Зрештою, ці ефекти призводять до посилення експресії генів білків теплового шоку, що необхідно для розвитку теплостійкості (Giesguth et al., 2015; Wang et al., 2024).

### **1.1.3 Роль АФО в активації деяких стрес-протекторних систем рослин**

Добре відомо, що однією з найважливіших стрес-протекторних систем, задіяних у реакції рослин на абіотичні стресори, є антиоксидантна система. Логічною є залежність функціонування цієї системи від сигналінгу за участю АФО. Сигнальна роль АФО у регуляції антиоксидантної системи рослин досліджується вже понад два десятиліття (Kolupaev, Karpets, 2013). Так, наприклад, на рослинах кукурудзи, підданих осмотичному стресу, показаний зв'язок між генерацією АФО, опосередкованою НАДФН-оксидазою плазматичної мембрани, і підвищенням активності кількох антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, аскорбатпероксидази і глутатіонредуктази), а також вмісту низькомолекулярних антиоксидантів (аскорбату та відновленого глутатіону) (Jiang, Zhang, 2002). Попередня обробка трьома різними інгібіторами НАДФН-оксидази (дифеніленіодинієм, імідазолом і піридином) знижувала спричинювані модельною посухою генерацію супероксидного аніон-радикала в листках та накопичення низькомолекулярних антиоксидантів. Цей приклад можна вважати одним з перших, що показує роль АФО, генерованих за участю НАДФН-оксидази, як сигнальних посередників в активації антиоксидантної системи (Jiang, Zhang, 2002).

У ряді досліджень також показано, що АФО виступають у ролі посередників при активації антиоксидантної системи рослин різними

екзогенними сигнальними молекулами, фітогормонами та стресовими метаболітами (Jiang, Zhang, 2002; Kolupaev et al., 2014; 2017; 2024a). На це вказує усунення активації антиоксидантної системи та розвитку стійкості до стрес-факторів антиоксидантами чи інгібіторами ферментів, що генерують АФО.

Очевидно, АФО як сигнальні посередники беруть участь у посиленні такої стрес-протекторної реакції, як накопичення осмолітів під впливом самих стрес-факторів. Наприклад, показано, що передобробка проростків проса скавенжером гідроген пероксиду (диметилтіосечовиною) або інгібітором НАДФН-оксидази (імідазолом) усувала ефект накопичення проліну, спричинений сольовим стресом (Вайнер и др., 2013). Пізніше інгібіторним методом, а також з використанням мутантів арабідопсису, в яких відсутня експресія генів ключових молекулярних форм НАДФН-оксидази (*AtRbohD* або *AtRbohF*), була показана роль пероксиду водню в регуляції експресії гена піролін-5-карбоксилітсинтази за умов осмотичного і сольового стресів (Ben Rejeb et al., 2015). Отже, нині вважається, що АФО є сигнальними посередниками, необхідними для індукування синтезу проліну (Alvarez et al., 2022).

## 1.2 Нітроген оксид

1987 року Palmer і співавтори (1987) повідомили, що у тварин ендотеліальний релаксуючий фактор насправді є газом NO, підкресливши, що невелика газоподібна молекула може бути важливим сигнальним посередником. У рослин нітроген оксид як сигнальну молекулу цілеспрямовано почали досліджувати наприкінці 90-х років минулого століття у контексті процесів, що відбуваються у відповідь на зараження патогенами (Durner et al., 1998; Delledonne et al., 1998).

У даний час відомо, що нітроген оксид бере участь у регуляції ключових фізіологічних процесів у рослин, таких як проростання насіння, цвітіння та старіння, а також активує процеси формування стійкості до

біотичних та абіотичних стресорів, в ході яких відбувається інтенсивна перебудова клітинного метаболізму (AL-Nakeem, Khan, 2025). Нітроген оксид модулює експресію генів, пов'язаних з окиснювальним стресом, гормональним сигналінгом та імунною системою. Невід'ємною частиною цих реакцій є локалізація шляхів біосинтезу та зв'язування NO у різних клітинних компартментах, що дозволяє рослинам ефективно організовувати шляхи передачі сигналів. Нітроген оксид регулює метаболізм рослин, а метаболічні шляхи, у свою чергу, взаємно регулюють накопичення NO та реалізацію його ефектів (Gupta et al., 2022). Таким чином, ці різноманітні клітинні процеси нерозривно пов'язані між собою. S-нітрозування та ще ряд різновидів посттрансляційних модифікацій (ПТМ) білків у даний час вважаються основними механізмами реалізації сигнальної дії нітроген оксиду.

### 1.2.1 Синтез нітроген оксиду у рослин

У рослин існують два основні шляхи синтезу NO: окиснювальний, пов'язаний з окисненням молекул, що містять аміногрупи, та відновний, заснований на відновленні нітритів до NO.

Якщо у тварин і людини синтез нітроген оксиду з L-аргініну за допомогою NO-синтази добре вивчений на молекулярно-генетичному рівні, то у вищих рослин природа ферментативних систем, що забезпечують окиснювальний шлях, досі не встановлена (Farnese et al., 2016; Khan et al., 2023). Біоінформатичне дослідження геномів 1300 видів вищих рослин не виявило жодного гомолога NOS (Jeandroz et al., 2016). Однак цей фермент охарактеризовано у мікроводоростей *Ostreococcus tauri* (Gupta et al., 2022). Відсутність доказів наявності NOS у вищих рослин пояснюють втратою цього ферменту наземними рослинами під час еволюції.

Тим не менш, показано, що в пероксисомах та хлоропластах зелених водоростей та судинних рослин може відбуватися ферментативне окиснення L-аргініну з утворенням цитруліну та NO (Hancock, Neill, 2019). Цю ферментативну активність часто називають NOS-подібною, оскільки вона, як

і у випадку з ферментом тварин, залежить від присутності аргініну, НАДФН, а також флавінмононуклеотиду і флавінаденіндинуклеотиду і білків – кальмодуліну та тетрагідробіоптерину (Farnese et al., 2016). У зв'язку з цим є припущення стосовно існування поліпептидів з редокс-активними доменами, які можуть об'єднуватися в комплекс, що каталізує реакції аргінін-залежного утворення NO у вищих рослин (Kolbert et al., 2019). Не виключено, що окиснювальний шлях синтезу NO у рослин може бути пов'язаний з перетворенням не тільки аргініну, а й гідроксиламіну та поліамінів за участю Cu-аміноксидази (діаміноксидази) та поліаміноксидаз (Saha et al., 2015). Припущення про внесок поліаміноксидаз у синтез нітроген оксиду базується в основному на результатах інгібіторного аналізу. Наприклад, у сої стимульоване екзогенними поліамінами утворення NO усувалося дією інгібітора діаміноксидази аміногуанідину (Yang et al., 2014).

З іншого боку, відновний шлях є чітко описаним і доведеним шляхом синтезу оксиду азоту у рослин. Одним із ключових ферментів синтезу NO вважається нітратредуктаза, яка є багатофункціональним цитоплазматичним ферментом, що бере участь в асиміляції та метаболізмі азоту. Він відповідає за першу лімітуючу стадію асиміляції нітратів, каталізуючи відновлення нітратів до нітритів з використанням НАДН або НАДФН як донора електронів. Активний ферментативний гомодимерний комплекс потребує присутності молібдоптерину, гему та ФАД як кофакторів (Astier et al., 2018).

Отримано докази участі нітратредуктази в адаптації рослин до конкретних стрес-факторів. Наприклад, виявлено, що акліматизація томатів до холоду супроводжувалася індукцією нітратредуктази та посиленням залежного від цього ферменту утворення NO. Репресія гена нітратредуктази пригнічувала активацію однієї зі специфічних MAP-кіназ – МРК1/2, що у свою чергу перешкоджало формуванню холодостійкості томатів у ході акліматизації. З іншого боку, авторами отримано дані про залежне від активності нітратредуктази посилення експресії одного з генів

транскрипційних факторів CBF, які контролюють комплекс реакцій на холод (Lv et al., 2017).

### 1.2.2 Посттрансляційні модифікації білків оксидом азоту та їх роль у процесах функціональної взаємодії NO та АФО

Найбільш поширеним і важливим способом ПТМ білків нітроген оксидом азоту є вибіркоче S-нітрозування залишків цистеїнових білків (рис. 1.2). В результаті S-нітрозування змінюється функціональна активність багатьох сотень білків і, відповідно, від цієї ПТМ залежить перебіг багатьох клітинних процесів у рослинах, у тому числі активація стрес-протекторних систем (Mukherjee, Corpas, 2023). Вважається, що S-нітрозування концептуально схоже на фосфорилування, яке є найбільш вивченим способом модифікації функціональної активності білків (Gupta et al., 2018). Однак, S-нітрозування білків відбувається без участі ферментів (Arora et al., 2016). Унікальні властивості атома сульфуру у складі сульфгідрильних груп цистеїну є ключовими для забезпечення сигнальних ефектів, пов'язаних із S-нітрозуванням (Umbreen et al., 2018). При цьому така ПТМ є вибірковою та залежить від амінокислотної послідовності та конформації цільового білка. У дослідженнях *in vitro* встановлені різноманітні механізми утворення SNO. NO у формі вільного радикала (NO•) може втрачати або приєднувати електрони, утворюючи окиснений катіон нітронію (NO<sup>+</sup>) або відновлений нітроксильний аніон (NO<sup>-</sup>).

Тіольні групи є спільною мішенню для дії як NO, так і АФО (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Органічні гідропероксиди та пероксинітрил окиснюють тіоли цистеїну (R-SH) з утворенням сульфенових кислот та сульфенамідів (R-SNR'), або сульфінамідів (R-SON-R'), та сульфонамідів (R-SO<sub>2</sub>N-R') (Klomsiri et al., 2011).

На рослинах різних видів в умовах дії стресорів різної природи виявлено S-нітрозування багатьох десятків білків (Mishra et al., 2021). Наприклад, у нітрозопротеомному дослідженні рослин томату в умовах стресу, спричинюваного підлужуванням середовища, виявлено 334 S-

нітрозованих білки. Серед них білки, що беруть участь у регуляції кальцієвого гомеостазу, вмісту NO та АФО, а також у передачі сигналів етилену та MAP-кіназному каскаді (Gong, Shi, 2019).

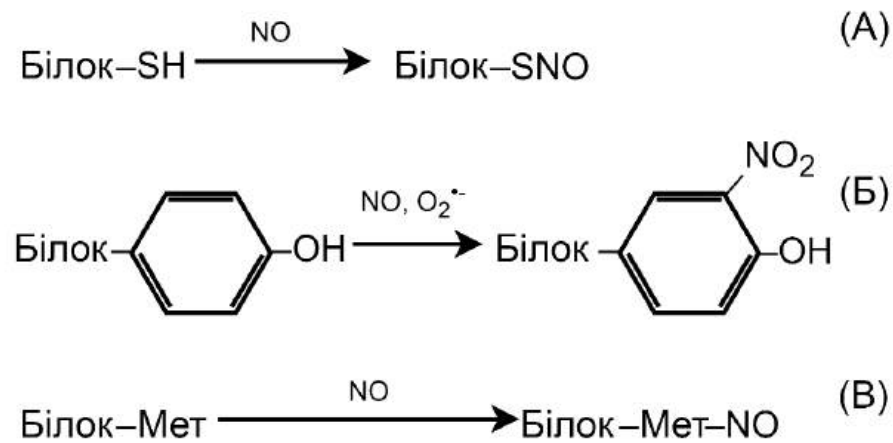


Рис. 1.2. Посттрансляційні модифікації білків нітроген оксидом. (А) нітрузування за тіольними групами; (Б) нітрування тирозинових залишків; (В) нітрозилування металовмісних груп.

Поряд з S-нітрузуванням, що вважається найважливішою ПТМ, нітроген оксид вступає у реакцію нітрування з тирозиновими залишками у складі білків (рис. 1.2). Така реакція є селективним процесом, що полягає в додаванні нітрогрупи (-NO<sub>2</sub>) до одного з двох еквівалентних *орто*-карбонів в ароматичному кільці залишків тирозину, що призводить до утворення 3-нітротирозину (Valderrama et al., 2019). Вважається, що цей процес може бути незворотним.

Ще однією (менш вивченою) ПТМ, спричинюваною дією NO, є нітрозилування металів. NO здатний взаємодіяти з перехідними металами, такими як Fe або Cu, присутніми в металопротеїнах, включаючи фітогемоглобін, каталазу або цитохромоксидазу (Mishra et al., 2021) (рис. 1.2). Формування метало-нітрозильних комплексів спричиняє оборотні конформаційні зміни білків та змінює їх структуру та/або функціональну активність, проте фізіологічна роль таких процесів залишається маловивченою (Arora et al., 2016).

### 1.2.3 Участь нітроген оксиду у формуванні адаптивних реакцій рослин

Для захисту від окиснювальних пошкоджень та підтримання редокс-гомеостазу особливе значення має складна модуляція антиоксидантних ферментів дією NO. Ряд таких даних отримано у контексті дослідження стійкості рослин до абіотичних стресів. Наприклад, у *Brassica juncea* Fe-SOD була ідентифікована як мішень для S-нітрозування в умовах холодового стресу (Sehrawat et al., 2013). Така ПТМ спричиняла підвищення активності ферменту. Загалом у рослин цього виду виявлено ефект диференційованого S-нітрозування 10 білків, серед яких, крім СОД, також дегідроаскорбатредуктаза та глутатіон-S-трансфераза (Sehrawit, Deswal., 2014). Повідомляється також про модуляцію активності каталази та неспецифічних пероксидаз за рахунок їх ПТМ NO в умовах холодового стресу та зв'язку цих ефектів із стійкістю рослин до низьких температур (Sougrakram et al., 2018). Вплив NO на активність каталази залежить від способу ПТМ: S-нітрозування викликає підвищення активності ферменту (Bai et al., 2011), тоді як взаємодія NO з гемом інгібує фермент (Clark et al., 2000; Arora et al., 2016).

Одним із найбільш вивчених ферментативних білків, активність яких регулюється посттрансляційними модифікаціями нітроген оксидом, є цитозольна аскорбатпероксидаза (сАРХ) (Correa-Aragunde et al., 2015). Так, встановлено, що S-нітрозування Cys32 стимулює активність сАРХ (Yang et al., 2015). У той же час оборотне зв'язування NO з гемом пригнічує сАРХ (Clark et al., 2000). Ще однією потенційною редокс-модифікацією сАРХ є нітрування залишків тирозину, що спричиняє незворотне інгібування активності ферменту (Begara-Morales al., 2013).

Таким чином, залежно від способу ПТМ нітроген оксид може викликати як активацію, так і інгібування антиоксидантних ферментів. Різноманітність механізмів впливу нітроген оксиду на активність антиоксидантних ферментів, очевидно, є і причиною неоднозначних

результатів при дослідженні впливу донорів NO на ці показники. Загалом у літературі представлений великий пул результатів, що свідчить переважно про посилення ферментативної антиоксидантної системи рослин під впливом донорів NO, у тому числі у результаті підвищення ендogenous вмісту NO.

Нітроген оксид як сигнальний посередник також бере участь у регуляції синтезу важливих поліфункціональних стресових метаболітів – цукрів, проліну, гліцинбетаїну, поліамінів та ін. Наприклад, встановлено, що холодоіндукована експресія гена  $\Delta^1$ -піролін-5-карбоксилатсинтази та накопичення проліну у арабідопсису відбуваються за участю NO (Zhao et al., 2009). Ці ефекти слабо виявлялися у мутантів *nia1nia2* і пригнічувалися скавенджером NO РТЮ. Показано, що обробка рослин *Vigna angularis* донором NO посилювала синтез цукрів, проліну та гліцинбетаїну в порівнянні з контрольними рослинами, а також рослинами, що перебували в умовах сольового стресу, що призводило до підвищення їх стійкості до засолення (Ahanger et al., 2020).

Обробка проростків баклажана NO також призводила до збільшення вмісту проліну та гліцинбетаїну, тим самим підвищуючи відносний вміст води та покращуючи показники функціонування антиоксидантної системи в умовах токсичної дії нікелю (Soliman et al., 2019). NO — опосередковане пом'якшення токсичності Ni було підтверджено з використанням скавенджера NO РТЮ, який майже повністю усував вплив донора нітроген оксиду на досліджувані показники.

Загалом, аналіз наявних даних літератури свідчить про важливу роль нітроген оксиду та його функціональної взаємодії з гідроген пероксидом у регуляції антиоксидантної системи та процесів накопичення ключових стресових метаболітів.

### **1.3. Гамма-аміномасляна кислота: стрес-протекторні ефекти і функціональні зв'язки з ключовими сигнальними посередниками**

ГАМК – непротейногенна амінокислота, яка виявлена у багатьох прокариотичних та еукаріотичних організмів, у тому числі у великих кількостях у вищих рослин (Suhel et al., 2023a). Досить давно встановлено, що в мозку ссавців ГАМК функціонує як основний гальмівний нейротрансмітер, активація якого призводить до гіперполяризації мембран у центральній нервовій системі та ослаблення збудження нейронів (Sears et al., 2021). У бульбах картоплі ГАМК було знайдено понад 70 років тому (Steward et al., 1949). Однак як важлива фізіологічно активна речовина рослин, вона активно вивчається лише останніми роками (Suhel et al., 2023a). За останні півтора десятиліття на рослинах різних таксономічних груп досліджено стрес-протекторні ефекти ГАМК за дії основних несприятливих абіотичних чинників – екстремальних температур (Zhou et al., 2022; Bhardwaj et al., 2021; Zeng et al., 2021) і посухи (Farooq et al., 2017; Zhou et al., 2021; Zhao et al., 2023). Проте поки що уявлення про механізми стрес-протекторної дії ГАМК багато в чому залишаються емпіричними.

#### **1.3.1 Синтез ГАМК у рослин**

Ендогенний вміст ГАМК у рослин варіює у досить широких межах, зазвичай він становить десятки мкмоль/г маси сирової речовини (Xu et al., 2021a), що суттєво вище порівняно із вмістом типових стресових фітогормонів та більшості сигнальних посередників. У відповідь на дію різних стресових факторів виявлено збільшення ендогенного вмісту ГАМК у рослинних клітинах (Li et al., 2021; Kabała, Janicka, 2024).

Основним шляхом синтезу ГАМК є так званий ГАМК-шунт (Kabała, Janicka, 2024). Цей шлях синтезу та метаболізму ГАМК є гілкою циклу трикарбонових кислот (ЦТК). Процес складається з трьох основних реакцій, які каталізуються цитозольним ферментом глутаматдекарбоксилазою (GAD) та двома мітохондріальними ГАМК-трансаміназою (ГАМК-Т) та дегідрогеназою янтарного напівальдегіду (SSADH). Водночас транспорт

синтезованої з глутамату ГАМК з цитозолу до мітохондрій відбувається за участю ГАМК-пермеази (ГАМК-permease, ГАМК-P) (Seifikalhor et al., 2019). Перша реакція, власне, і є синтезом ГАМК із глутамату шляхом його декарбоксілювання GAD (рис. 1.3). GAD може існувати у формі димеру або гексамеру. У фізіологічно нормальних умовах GAD присутній переважно у формі димера, виявляючи низьку активність. Однак зниження рН або приєднання комплексу кальцію з кальмодуліном ( $\text{Ca}^{2+}$ -CaM) до карбоксильного кінця призводить до переходу димеру в гексамер, тим самим підвищуючи активність ферменту (Kabała, Janicka, 2024). Янтарний напівальдегід, що утворюється за участю ГАМК-трансамінази, надалі під впливом залежної від НАД<sup>+</sup> сукцинат-напівальдегід-дегідрогенази перетворюється на сукцинат з одночасним продукуванням відновника НАДН (Sita, Kumar, 2020; Ansari et al., 2021). Сукцинат може потрапляти в цикл трикарбонових кислот і через  $\alpha$ -кетоглутарат перетворюватися на глутамат (рис. 1.3).

Шунт ГАМК вважається основним шляхом синтезу ГАМК та підтримання її оптимальної концентрації в тканинах рослин (Sita, Kumar, 2020; Kabała, Janicka, 2024). Однак є й альтернативні шляхи утворення ГАМК. У разі впливу стресорів накопичення ГАМК може бути пов'язане з катаболізмом поліамінів. Так, у пероксисомах можливий синтез ГАМК з путресцину після його окиснення діаміноксидазою (Suhel et al., 2023). Ця реакція є основною реакцією катаболізму путресцину. У ній утворюються гідроген пероксид, аміак і 4-амінобутаналь (4-амінобутиралдегід) (рис. 1.3). Відомо також, що 4-амінобутаналь може утворюватися зі спермідину під впливом поліаміноксидази, у зв'язку з чим вважається можливим і синтез ГАМК із спермідину (Kolupaev et al., 2024a). 4-амінобутаналь піддається циклізації з утворенням  $\Delta^1$ -піроліну, що перетворюється на ГАМК під впливом піроліндегідрогенази (Ansari et al., 2021). Крім того, 4-амінобутаналь може перетворюватися безпосередньо на ГАМК за рахунок активності 4-амінобутиральдегідрогенази. Таким чином, зміни вмісту

ендогенних поліамінів, особливо путесцину, а також активація діаміноксидази, поліаміноксидази, 4-амінобутиральдегідрогенази та піроліндегідрогенази можуть впливати на накопичення ГАМК у рослинних клітинах (Kabała, Janicka, 2024).

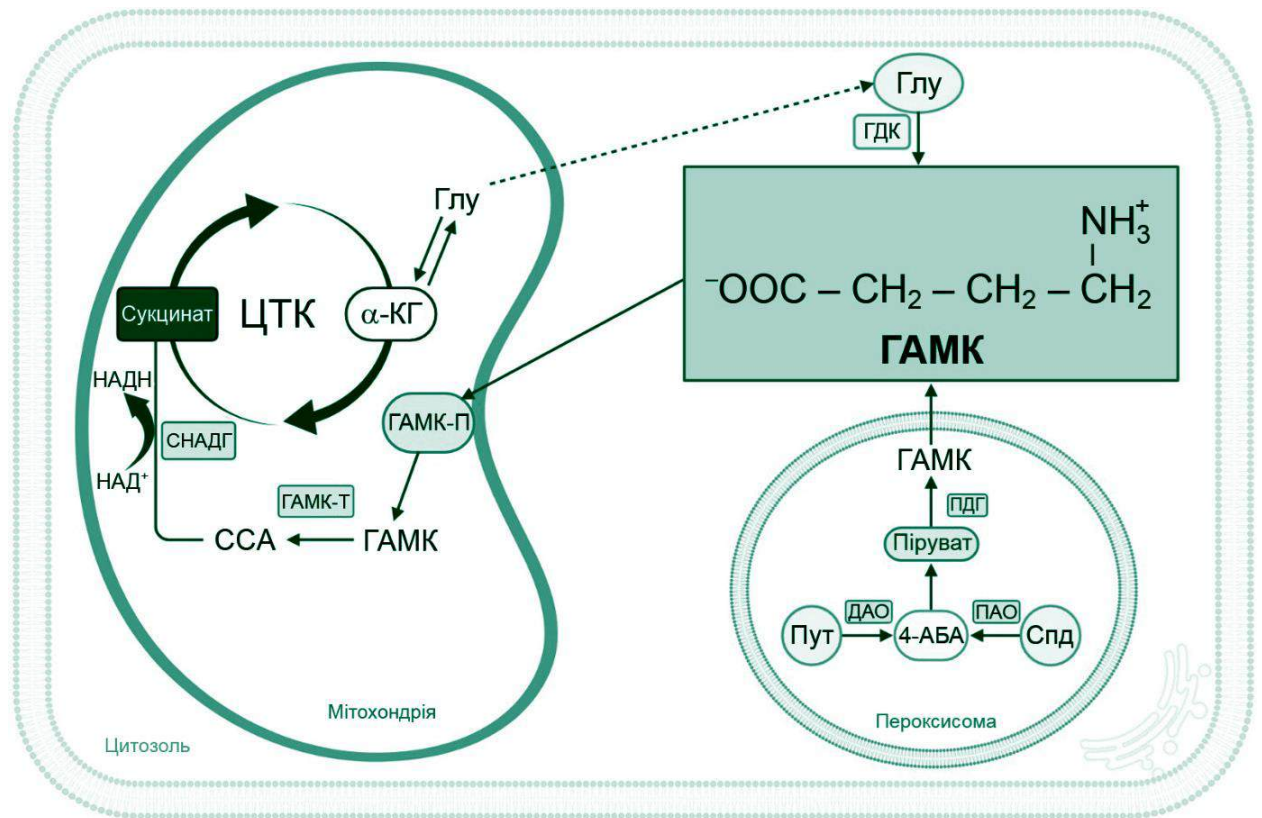


Рис. 1.3. Синтез і метаболізм  $\gamma$ -аміномасляної кислоти у рослин (Адаптовано за: Колупаєв et al., 2024a). Глу – глутамат; ГАМК –  $\gamma$ -аміномасляна кислота; ГДК – глутаматдекарбоксилаза; ГАМК-П – ГАМК-пермеаза; ГАМК-Т – ГАМК-трансаміназа; ССА – сукцинатсеміальдегід; СНАДГ – сукцинат-напівальдегід-дегідрогеназа;  $\alpha$ -КГ –  $\alpha$ -кетоглутарат; Пут – путресцин; ДАО – діаміноксидаза; 4-АБА – 4-амінобутаналь; Спд – спермідин; ПАО – поліаміноксидаза; ПДГ – піроліндегідрогеназа, ЦТК — цикл трикарбонових кислот. Інші пояснення в тексті

Теоретичні дослідження вказують також на можливість утворення ГАМК з проліну (Signorelli et al., 2015). Вважається, що знешкодження проліном гідроксильного радикала призводить до утворення  $\Delta^1$ -проліну. Останній є субстратом піроліндегідрогенази, яка перетворює його на ГАМК

(Flores, Filner, 1985) (рис. 3). Комп'ютерне моделювання, а також відомі факти посилення генерації гідроксильного радикала, утворення проліну та ГАМК у рослин за стресових умов є основою для припущення існування такого шляху (Kolupaev et al., 2025c). Однак поки що прямих експериментальних доказів утворення ГАМК у рослин в результаті окислювальних перетворень проліну немає.

### **1.3.2 Феноменологія стрес-протекторного впливу ГАМК на рослини**

Протекторні ефекти ГАМК на рослини різних таксономічних груп виявлено за дії стресорів різної природи: гіпоксії, посухи, засолення, низьких та високих температур, важких металів та низки біотичних стресів (Sheteiwy et al., 2019; Shelp et al., 2021). Застосування екзогенної ГАМК зазвичай підвищує її ендогенний вміст та викликає різноманітні зміни на молекулярному, біохімічному та організмовому рівнях. В огляді Shelp та співавторів (2021) наведено ряд прикладів, котрі свідчать про те, що підвищений вміст ендогенної ГАМК може посилювати індуковане стрес-факторами підвищення активності антиоксидантних ферментів, вмісту низькомолекулярних антиоксидантів та накопичення осмолітів, у тому числі проліну. За умов теплового стресу у рослин рису показано підвищення під впливом ГАМК вмісту аскорбінової кислоти і відновленого глутатіону, посилення накопичення проліну і трегалози, зростання активності ряду антиоксидантних ферментів (Naayyar et al., 2014). Підвищення теплостійкості рослин льону під впливом ГАМК пов'язують зі зростанням ефективності фотосинтезу та зменшенням окиснювальних ушкоджень за рахунок підвищення активності антиоксидантних ферментів і вмісту поліфункціональних осмолітів – проліну та гліцин-бетаїну (Bhardwaj et al., 2021). Позитивний вплив ГАМК на ріст рослин соняшнику за дії високої температури супроводжувався накопиченням ряду захисних білків — дегідринів, осмотину та аквапоринів (Abdel Razik et al., 2021).

В цілому, позитивний вплив екзогенної ГАМК на стійкість рослин до основних абіотичних стресів пов'язують насамперед з її здатністю впливати на такі важливі захисні системи рослин, як антиоксидантна та осмопротекторна (Kolupaev et al., 2024a; Kozeko et al., 2024). Ймовірно, участь ГАМК у регуляції цих систем є однією з причин підвищення посухостійкості рослин (Li et al., 2016; Badr et al., 2024). Наприклад, показано, що праймінг насіння білої конюшини (*Trifolium repens*) ГАМК підвищував їх схожість при осмотичному стресі і призводив до збільшення вмісту цукрів та активності антиоксидантних ферментів у проростках (Zhou et al., 2021). Обприскування ГАМК рослин квасолі за помірної посухи зменшувало водний дефіцит та інгібування росту і посилювало накопичення осмолітів (Abd El-Gawad et al., 2021). Фоліарна обробка ГАМК рослин ріпаку підвищувала їх виживання та відновлення росту після посухи, при цьому відзначалося підвищення вмісту проліну та фотосинтетичних пігментів у листках, зменшення прояву окиснювального стресу (Jurkonienė et al., 2025). Стрес-протекторну дію ГАМК на рослини мітлиці (*Agrostis stolonifera*) за посухи пов'язують із посиленням дихального метаболізму та накопиченням амінокислот і вуглеводів, що беруть участь в осмотичному регулюванні та енергетичному обміні (Li et al., 2017). В експериментах з рисом показано, що тривала (24 год) обробка насіння ГАМК з подальшим їх висушуванням підвищувала стійкість проростків до модельної посухи, засолення та комбінації цих стресів (Sheteiwu et al., 2019). Така обробка посилювала синтез ендогенної ГАМК, індукувала антиоксидантні ферменти та вторинний метаболізм.

Стрес-протекторна дія ГАМК зареєстрована і на рослинах пшениці. Так, показано, що фоліарна обробка ГАМК зменшувала спричинювані сольовим стресом окиснювальні пошкодження та активувала експресію генів дегідринів (Badr et al., 2024). Однак вплив праймінгу насіння ГАМК як можливого прийому, що індукує стійкість рослин пшениці до стресів, які призводять до зневоднення, вивчався лише в поодиноких дослідженнях. У

роботі Zhao та співавт. (2023) показано, що праймінг насіння ГАМК шляхом її розпилення підвищував стійкість проростків пшениці до посухи, що супроводжувалося активацією вторинного метаболізму. У недавньому дослідженні Al Ghafri та співавторів (2025) показано, що праймінг насіння пшениці в розчині ГАМК у низькій концентрації (1 мкМ) підвищував енергію проростання насіння та біомасу проростків в умовах посухи, а також сприяв збільшенню вмісту фенольних сполук та проліну. Однак у даній роботі використовувалося тривале (18 год) замочування насіння, ефекти якого порівнювали не з гідропраймінгом, а з проростанням сухого насіння. Це не дозволяє однозначно пов'язувати підвищення посухостійкості з дією ГАМК, оскільки гідропраймінг насіння, особливо при тривалій експозиції, сам по собі підвищує енергію проростання у стресових та нормальних умовах (Тао et al., 2018; Liu et al., 2022). В цілому, незважаючи на накопичення певного обсягу феноменологічних даних про вплив екзогенної ГАМК на стресостійкість рослин, чимало прикладних питань, таких як способи обробки, дози, тривалість впливу ГАМК та його видові особливості, поки що залишаються малодослідженими.

### **1.3.3 Функціональні зв'язки ГАМК з активними формами кисню**

Вплив ГАМК на редокс-гомеостаз рослинних клітин за стресових умов вважають однією з можливих причин її стрес-протекторної дії (Bor, Turkan, 2019). Зокрема, припускають, 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), що вказує на її вплив на функціонування сигнальної мережі.

На рівні гіпотез розглядається низка механізмів впливу ГАМК на вміст АФО, хоча не всі вони мають експериментальне підтвердження (Kolupaev et al., 2024). Одним з механізмів впливу ГАМК на вміст АФО може бути зміна експресії генів ензимів, що їх генерують. Так, під впливом ГАМК в коренях рослин *Caragana intermedia* спостерігали посилення експресії гена *CaGR60*, що кодує НАДФН-оксидазу (Shi et al., 2010). При цьому у рослин, оброблених ГАМК, вміст гідроген пероксиду за умов сольового стресу був істотно нижчим порівняно з таким у необроблених рослин. Є припущення, що внаслідок спричинюваного ГАМК посилення експресії гена НАДФН-оксидази, виникає сигнал, який активує антиоксидантну систему і тим самим підвищує стійкість рослин (Suhel et al., 2023a). До певної міри схожі результати було отримано на рослинах *Cucumis melo*. Під впливом ГАМК у них посилювалася експресія гена однієї з форм каталітичної субодиниці НАДФН-оксидази (RВОНD) і накопичення гідроген пероксиду за нормальних умов. Водночас за впливу содового засолення, обробка знижувала прояви окиснювального стресу – зростання вмісту гідроген пероксиду і малонового діальдегіду (МДА) у листках (Jin et al., 2019). При цьому диметилтіосечовина (ДМТС — скавенджер H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) та дифеніленіодоніум (ДФІ — інгібітор НАДФН-оксидази) усували захисний ефект ГАМК.

Ще одним механізмом впливу ГАМК на редокс-гомеостаз рослинних клітин може бути посилення функціонування ГАМК-шунту, який постачає в клітини відновники НАДН або сукцинат. Таким чином, він може компенсувати порушення в циклі трикарбонових кислот, які зазвичай виникають в стресових умовах (Kolupaev et al., 2024a). Отже, функціонування ГАМК-шунту запобігає надмірному утворенню АФО під час стресу. Встановлено, що порушення у функціонуванні ГАМК-шунту у рослин арабідопсису генотипу *ssadh* (дефектні за геном сукцинатсеміальдегід-дегідрогенази і, як наслідок, дефіцитні за вмістом сукцинату) мають підвищену чутливість до теплового стресу та впливу ультрафіолету В (УФ-В)

(Bouche et al., 2003). Вплив цих стресових чинників на мутанти *ssadh* призводив до різкого зростання вмісту АФО, що призводило до загибелі частини клітин. Водночас специфічна роль складових ГАМК-шунту в регуляції редокс-гомеостазу поки що має недостатньо експериментальних підтверджень (Kolupaev et al., 2024a).

Зв'язуючою ланкою між ГАМК і АФО може бути зміна кальцієвого гомеостазу. Так, є відомості про можливість посилення дією ГАМК надходження іонів  $Ca^{2+}$  в цитозоль за рахунок відкриття кальцієвих каналів, що активуються гіперполяризацією (Ramesh et al., 2017). Крім того, на зв'язки між ГАМК і кальцієм вказує збільшення під впливом екзогенної ГАМК експресії кальційневрин-В-подібних білків, здатних взаємодіяти з кальційневрин-В-залежною протеїнкіназою (Sheteiwu et al., 2019; Sita, Kumar, 2020). Також слід зауважити, що не лише ГАМК може впливати на надходження кальцію в цитозоль, а й, навпаки, підвищення вмісту цитозольного кальцію може активувати синтез ГАМК. Встановлено, що підвищення вмісту  $Ca^{2+}$  в цитозолі активує кальмодулін. Активний комплекс Са/кальмодулін зв'язується з глутаматдекарбоксилазою і активує її (Suhel et al., 2023a). Припускають, що можливе взаємне підсилення сигнальних процесів, що відбуваються за участю кальцію і ГАМК (Dabravolski, Isayenkov, 2023). Разом з тим, даних, які б дозволяли скласти бодай гіпотетичну картину функціональної взаємодії між ГАМК, іонами кальцію і АФО, поки що недостатньо.

#### **1.3.4 Функціональні зв'язки ГАМК та NO**

Зв'язки між ГАМК та нітроген оксидом залишаються слабовивченими. Разом з тим, наявні дані свідчать про те, що NO може діяти в сигнальних ланцюгах вище від ГАМК, модулюючи її синтез, а нітроген оксид також може виступати як медіатор передачі сигналу ГАМК (Jalil et al., 2025). Декілька досліджень продемонстрували індуковану NO-активацію синтезу ГАМК. Наприклад, обробка проростків сої донором NO НПН посилювала біосинтез ГАМК під впливом УФ-В-випромінювання (Suhel et al., 2023a).

Навпаки, було показано, що стрес-протекторний ефект НПН на томати та баклажани не пов'язаний із змінами вмісту ендогенної ГАМК (Suhel et al., 2023b). У плодах банана обробка екзогенним NO збільшувала активність діамінооксидази, поліамінооксидази та глутаматдекарбоксілази, що призводило до накопичення ГАМК. Автори пояснили підвищену стійкість плодів томату до холоду активацією взаємопов'язаного метаболізму ГАМК та поліамінів (Wang et al., 2016).

У чайній рослині виявили, що підвищення стійкості до холоду під дією донора NO НПН супроводжувалося активацією ГАМК-шунту. Це виявилось у підвищенні активності аргініндекарбоксілази, орнітиндекарбоксілази та глутаматдекарбоксілази; однак збільшення вмісту ГАМК не було зафіксовано. На думку авторів, це можна пояснити швидким перетворенням ГАМК на поліаміни, рівні яких підвищувалися (Wang et al., 2020). Отже, спричинена NO-активація метаболізму ГАМК може вказувати на участь цього процесу у розвитку стрес-захисної дії оксиду азоту.

Навпаки, існують дані, що вказують на те, що NO діє як медіатор в індукованій ГАМК стійкості рослин до різних абіотичних стресорів. У білої конюшини, за умов осмотичного стресу, як ГАМК, так і донор NO НПН підвищували стійкість рослин, що було пов'язано зі збільшенням вмісту двох осмолітів — *mio*-інозитулу і маннози (Li et al., 2019). Примітно, що екзогенна ГАМК суттєво збільшувала вміст NO, тоді як обробка рослин НПН не підвищувала ГАМК, що вказує на те, що оксид азоту розташований нижче від ГАМК в сигнальному ланцюгу.

Обробка ГАМК *Agrostis stolonifera* підвищувала стійкість до осмотичного стресу, створюваного дією ПЕГ 6000 (Tang et al., 2020). При цьому однак екзогенна ГАМК збільшувала її ендогенний вміст, сприяла накопиченню осмолітів та підвищенню активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, дегідроаскорбатредуктази, глутатіонредуктази та монодегідроаскорбатредуктази), що призвело до ефективного зменшення ушкоджень, спричинюваних водним стресом, включаючи зниження

окиснювальних пошкоджень, фотоінгібування та втрат води рослинами. При цьому індуковане ГАМК утворення NO виявилось залежним як від нітратредуктази, так і від білків, подібних до NO-синтази (Tang et al., 2020).

В умовах сольового стресу обробка рослин пшениці ГАМК підвищувала їхню фотосинтетичну продуктивність та знижувала окиснювальне пошкодження за рахунок посилення аскорбат-глутатіонового циклу та метаболізму проліну (Khanna et al., 2021). Примітно, що скавенджер NO сРТІО значно зменшував прояв позитивних ефектів ГАМК на ріст рослин і фотосинтез, вказуючи на те, що NO діє як медіатор ефектів ГАМК. Аналогічні механізми посилення синтезу нітроген оксиду, ймовірно, діють і за індукованої ГАМК стійкості дині до содового засолення. Обробка рослин ГАМК підвищувала вміст NO та активність нітратредуктази та ферменту, подібного до NO-синтази тварин (Xu et al., 2021). Натомість обробка рослин скавенджером NO сРТІО усувала як спричинюване ГАМК підвищення рівня NO, так і його стрес-захисні ефекти. Автори припустили, що NO є компонентом сигнального шляху ГАМК, важливого для стимуляції антиоксидантної системи та регулювання іонного гомеостазу за умов стресу (Xu et al., 2021).

Також показано, що у рослин сої спричинюване обробкою ГАМК посилення синтезу фенольних сполук в умовах сольового стресу зменшувалося в присутності як інгібітору синтезу NO за окислювальним шляхом L-NAME, так і за дії інгібітору нітратредуктази вольфрамату натрію, що вказує на роль двох основних шляхів синтезу нітроген оксиду у реалізації ефектів ГАМК (Xie et al., 2021). Отже, ймовірно, участь ГАМК у регуляції синтезу вторинних метаболітів у рослин опосередкована нітроген оксидом.

Останнім часом отримані дані метаболомного аналізу, що вказують на те, що NO і ГАМК, викликаючи стрес-протекторні ефекти, можуть активувати як загальні, так і різні метаболічні шляхи, підвищуючи рівні амінокислот, цукрів, органічних кислот і цукрових спиртів та вторинних метаболітів (Kabała, Janicka, 2024; Jalil et al., 2025). При цьому, однак,

залишається недослідженою ймовірна взаємодія між нітроген оксидом та іншими ключовими сигнальними посередниками, в першу чергу АФО та іонами кальцію, при формуванні під впливом ГАМК NO-опосередкованих адаптивних реакцій рослин. Також досі відсутні молекулярно-генетичні докази участі NO у захисних реакціях рослин, спричинюваних дією ГАМК.

### **Висновки до розділу 1**

Формування адаптивних реакцій рослин на дію стресорів є результатом функціонування складної регуляторної мережі, яка включає в себе сигнальні посередники, класичні фітогормони, ряд гормоноподібних сполук, а також речовини, що поєднують у собі функції стресових метаболітів і біорегуляторів. До групи останніх належить і ГАМК. У метаболічних шляхах вона пов'язана з такими важливими стресовими метаболітами, як поліаміни і пролін, котрі також залучені в стресову сигнально-регуляторну мережу (Kolupaev et al., 2025). ГАМК належить до молекул, які чинять комплексний вплив на редокс-гомеостаз, пов'язаний з її залученням у процеси формування пулу відновника НАДН та синтез сукцинату, прямою антиоксидантною дією і впливом на експресію генів антиоксидантних ферментів. Водночас синтез ГАМК з участю глутаматдекарбоксилази безпосередньо залежить від надходження кальцію в цитозоль, а ГАМК, в свою чергу, може впливати на кальцієвий гомеостаз.

Ще одним сигнальним посередником, з яким ГАМК має тісні функціональні зв'язки, є нітроген оксид. Отримані експериментальні дані, що вказують як на його вплив на синтез ГАМК, так і на участь в трансдукції її сигналів. Разом з тим, наявні дані поки що не дозволяють скласти цілісну картину зав'язків ГАМК з основними сигнальними посередниками – АФО, NO та іонами кальцію. Зокрема, відкритим залишається питання ролі змін кальцієвого гомеостазу в реалізації впливу ГАМК на редокс-гомеостаз рослинних клітин. Наявні дуже обмежені дані про можливу роль генерування АФО як сигнальних посередників в спричинюваній ГАМК активації

антиоксидантної системи. Недостатньо відомостей про участь нітроген оксиду в реалізації фізіологічних (зокрема, стрес-протекторних) ефектів ГАМК, а також про зв'язки між NO та іншими посередниками, задіяними в передачі сигналів, спричинюваних ГАМК.

Незважаючи на накопичений певний обсяг феноменології стрес-протекторних ефектів ГАМК, відкритими залишаються і прикладні питання, пов'язані зі способами обробки рослин ГАМК. Наприклад, дотепер відсутні порівняльні дослідження впливу праймінгу насіння і фоліарної обробки рослин ГАМК на прояв її стрес-протекторних ефектів. Відкритими залишаються і питання впливу ГАМК на схожість насіння, зокрема, після його тривалого зберігання. Також дотепер не досліджені можливі видоспецифічні ефекти ГАМК. Її екзогенний вплив вивчений поки що на прикладі досить вузького кола культурних рослин. На вирішення перелічених питань і було спрямоване дисертаційне дослідження.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Експериментальні об'єкти та їх коротка характеристика

Експериментальними об'єктами були рослини та насіння пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) і тритикале ( $\times$  *Triticosecale*), що використовувалися для оцінки впливу ГАМК на стійкість до різних стресових факторів.

Для дослідження впливу ГАМК на стійкість рослин до потенційно летального теплового стресу експериментальним об'єктом слугували триденні (на момент початку експериментів) етіольовані проростки пшениці м'якої озимої сорту Досконала (оригіатор – Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України).

При дослідженні сортових особливостей впливу ГАМК на стійкість пшениці до модельної посухи використовували сорти з різним рівнем посухостійкості – Досконала та Тобак (оригіатор – Saaten-Union GmbH, Німеччина) генерації 2022 року. Сорту Тобак є більш стійким порівняно з сортом Досконала і здатний зберігати врожайність в умовах посухи (Urban et al., 2018). Відмінності у посухостійкості цих двох сортів також встановлені на ранніх фазах розвитку (Kolupaev et al., 2024c). Ці два сорти пшениці, а також гексаплоїдний сорт озимого тритикале Раритет (оригіатор – Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України) застосовувалися для дослідження впливу ГАМК на функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем етіольованих проростків за умов модельної посухи і сольового стресу.

Для дослідження впливу праймінгу ГАМК на стан антиоксидантної і осмопротекторної систем та для оцінки ролі нітроген оксиду як сигнального посередника під час проростання зернівок, а також для порівняльного вивчення ефектів праймінгу та фоліарної обробки ГАМК на функціонування протекторних систем за умов ґрунтової посухи використовували насіння

сорту Етана (оригіатор – Deutsche Saatveredelung AG, Німеччина) генерації 2023 року. Етана є одним із найпоширеніших іноземних сортів, які вирощуються в Україні

(<https://agroportal.ua/news/rastenievodstvo/nazvanonaypopulyarnishi-sorti-pshenici-v-ukrajini>). Відомо, що він має помірно високу посухостійкість у польових умовах (Kryzhanovsky, 2019).

Вивчення впливу праймінгу ГАМК на проростання зернівок пшениці і тритикале, що зазнали природного старіння, проводили на м'якій озимій пшениці сорту Скорпіон (Чехія, Австрія) і тритикале озимого сорту Раритет генерації 2020 року. Пшениця Скорпіон має блакитні зернівки з підвищеним вмістом поліфенольних сполук (Martinek et al., 2013). Водночас повідомляється, що насіння цього сорту навіть при правильному зберіганні легко всихає, зморщується, що призводить до зниження його схожості (Martinek et al., 2013). Насіння тритикале сорту Раритет, як засвідчено раніше (Kolupaev et al., 2024b), після зберігання протягом кількох років також помітно втрачає схожість. У вказаних експериментах насіння пшениці і тритикале протягом 3,5 року зберігалося за несприятливих умов: періодичне підвищення температури в літній період до 30–32 °С, її зниження до –7–9 °С, варіювання вологості повітря від 20 до 80%.

## **2.2. Дизайн експериментів та визначення фізіологічних показників**

*Дослідження впливу осмотичного стресу і ГАМК на ріст проростків пшениці з різною посухостійкістю.* Перед початком експериментів насіння пшениці знезаражували 70%-вим розчином етанолу впродовж 2 хвилин, а далі протягом 15 хв 4%-вим розчином NaClO. Після цього зернівки восьмиразово промивали дистильованою водою. Для оцінки впливу ГАМК на пшеницю різних сортів за дії осмотичного стресу знезаражені зернівки пшениці пророщували впродовж двох діб в термостаті без світла за температури 24 °С в чашках Петрі. Потім проростки приблизно однакового розміру переносили в інші чашки Петрі з двома шарами фільтрувального

паперу, змоченого 15% розчином ПЕГ 6000 (концентрацію ПЕГ, яка спричиняла 30–50% інгібування росту, було обрано на основі попередніх експериментів) для створення модельної посухи. Проростки контрольних варіантів переносили в чашки Петрі з фільтрувальним папером, змоченим дистильованою водою. ГАМК розчиняли в невеликому об'ємі етанолу; розчин розбавляли дистильованою водою і додавали до чашок Петрі для отримання робочих розчинів в концентраціях діапазону від 0,025 до 2,5 мМ. У попередніх експериментах було встановлено, що концентрації етанолу в розчинах ГАМК не мали істотного впливу на ріст і посухостійкість проростків та досліджувані біохімічні показники. Після дводенного впливу на рослини розчинів ПЕГ 6000 та/або ГАМК проводили біохімічні аналізи та оцінку біомаси пагонів і коренів рослин. Пригнічення росту рослин у модельних умовах посухи було розраховано за формулою (Kolupaev et al., 2023):

$$I = 100 - (E/C \times 100\%),$$

де  $I$  — пригнічення росту проростків, %;

$C$  — значення сирої маси органів проростків у контрольному варіанті, мг;

$E$  — значення сирої маси органів проростків в експериментальному (вплив ПЕГ 6000) варіанті, мг.

*Оцінка загального та відносного вмісту води в пагонах.* Загальний вміст води в тканинах визначали гравіметричним методом шляхом висушування за температури 103 °С до сталої маси. Відносний вміст води оцінювали після 12-годинного насичення водою пагонів, відокремлених від проростків, і розраховували за формулою (Tambussi et al., 2005):

$$C = 100\% \times (MF - MD)/(MT - MD),$$

де  $MF$  — маса до насичення, мг;

$MT$  — маса після насичення, мг;

$MD$  — маса сухої речовини, мг.

*Дослідження впливу ГАМК на стійкість етіолованих проростків тритикале до модельної посухи, сольового стресу та їх комбінації.* У досліджах з визначення впливу ГАМК на ріст проростків за умов осмотичного, сольового та комбінованого стресів насіння тритикале знезаражували 5%-вим розчином NaClO з подальшим промиванням 8–10 разів дистильованою водою. Після цього проростки пророщували у чашках Петрі в термостаті при температурі 24 °C без світла протягом 2 діб. Надалі рослини приблизно однакового розміру переносили в чашки Петрі, що містили два шари фільтрувального паперу, змоченого 15% ПЕГ 6000 або 100 мМ NaCl або комбінацією обох речовин. У контрольному варіанті рослини були перенесені в чашки Петрі з фільтрувальним папером, змоченим дистильованою водою. ГАМК додавали в чашки для отримання кінцевої концентрації 0,5 мМ. Ця концентрація була обрана на основі попередніх експериментів з використанням 0,1–2,5 мМ ГАМК. Після дводенного впливу на проростки тритикале осмотичного та сольового стресів, а також їх комбінації вимірювали біомасу пагонів і коренів проростків та проводили біохімічні аналізи.

*Дослідження впливу праймінгу насіння ГАМК на проростання зернівок і ріст проростків за нормальних і стресових умов.* Під час досліджень, в яких обробка розчинами ГАМК відбувалася шляхом праймінгу, зернівки знезаражували 5%-вим розчином NaClO протягом 15 хв, після чого їх промивали дистильованою водою. Потім частину насіння протягом 3 год витримували в склянках з дистильованою водою (гідропраймінг). Як показано раніше, гідропраймінг дещо підвищує (приблизно в межах 10%) схожість насіння (Kolupaev et al., 2024c). Зважаючи на це, контролем вважали саме варіант з гідропраймінгом.

У варіантах з обробкою ГАМК насіння витримували протягом 3 год у її розчинах з концентрацією 0,2; 1 і 2,5 мМ у темному термостаті при 24 °C. В окремих серіях експериментів для доведення специфічної дії ГАМК на проростання насіння використовували для порівняння дві  $\alpha$ -амінокислоти —

гліцин і валін в концентрації 1 мМ. Всі досліджувані амінокислоти були L-ізомерами. Насіння, піддане гідропраймінгу або обробці ГАМК чи іншими амінокислотами, висушували в темному термостаті за температури 24 °С і вологості повітря 40% протягом доби. Після цього зернівки розкладали в чашки Петрі з двома шарами стерильного фільтрувального паперу, зволоженого дистильованою водою, і пророщували в темному термостаті за температури 24 °С протягом 3 діб. Через 2 доби пророщування оцінювали відносну кількість схожого насіння (показник енергії проростання) На 3-тю добу пророщування оцінювали схожість (відносну кількість пророслого насіння) і масу стеблової та кореневої частини проростків, отриманих від нормально пророслих зернівок. Пагони 3-добових проростків використовували для біохімічних аналізів.

*Порівняння впливу праймінгу зернівок і фоліарної обробки рослин пшениці ГАМК на функціонування протекторних систем за умов ґрунтової посухи.* Знезаражене за допомогою 5% гіпохлориту натрію (див. вище) насіння праймували протягом 3 годин дистильованою водою або розчинами ГАМК в концентраціях 0,1, 0,5 та 2,5 мМ з подальшим висушуванням до вихідної вологості (близько 11%). У варіантах, в яких зернівки не праймувалися, проводили лише знезараження і висушування. Сухе насіння висівали у пластикові кювети з ґрунтом. Рослини вирощували на типовому важкосуглинковому чорноземі (за 80 % повної вологості) при температурі 24/20 °С (день/ніч) за освітлення 12 кЛк протягом 14 год щоденно. Протягом перших 6 діб вологість ґрунту підтримували на рівні 80% від повної вологості. Після 6 діб варіанти з фоліарною обробкою обприскували розчинами ГАМК в концентраціях 0,1, 0,5 та 2,5 мМ до повного змочування листків, рослини всіх інших варіантів обприскували дистильованою водою. Впродовж наступних 6 діб у всіх варіантах, крім контрольних (варіант без обробки насіння та гідропраймінгу), знижували вологість ґрунту до 30% від повної вологості шляхом зниження норми поливу, створюючи ефект помірної ґрунтової посухи. На 12 день з моменту

висіву насіння вимірювали висоту, сиру і суху біомасу надземної частини рослин та проводили аналізи біохімічних показників.

*Дослідження участі сигнальних сполук та іонів (АФО,  $Ca^{2+}$  і NO) у реалізації фізіологічних ефектів ГАМК.* Для дослідження ролі активних форм кисню та іонів кальцію у реалізації стрес-протекторної дії ГАМК на проростки пшениці за умов теплового стресу незаражені зернівки пшениці сорту Досконала 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 розчином ГАМК в концентрації 0,5 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<sub>3</sub>) неоміцину (200 мкМ) на теплостійкість проростків та біохімічні показники інкубація коренів у розчинах становила 26 год (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., 2019b; Shkliarevskyi et al., 2020).

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. Частина проростків через 5 год після теплового стресу використовували для аналізу активності антиоксидантних ферментів, вмісту продукту пероксидного окиснення лілідів (ПОЛ) малонового діальдегіду (МДА) та виходу УФ-В-поглинальних речовин, а іншу частину проростків витримували впродовж трьох діб за температури 24°C 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 спектра (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 на спектрофотометрі при  $A_{252}$  та  $A_{264}$ . 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 (Shkliarevskiy et al., 2020).

*Дослідження участі нітроген оксиду у реалізації впливу ГАМК на проростання зернівок за умов модельної посухи проводили на пшениці сорту Етана.* Оскільки, як уже зазначалося, гідропраймінг сам по собі підвищує схожість насіння злаків (Kolupaev et al., 2024b), як контроль використовували зернівки, витримані протягом 3 год у темному термостаті за температури 24°C у хімічних стаканах з дистильованою водою (співвідношення об'ємів 1:4). Зразки дослідних варіантів витримували протягом 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., 2025b). Після гідропраймінгу (контрольний варіант) та обробки досліджуваними речовинами насіння висушували протягом 24 год на скляній поверхні у темному термостаті за температури 24 °C та відносної вологості повітря 40% до вихідної вологості (близько 11%).

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 протягом 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 її 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.

## 2.3. Біохімічні аналізи

### 2.3.1. Визначення вмісту нітроген оксиду, супероксидного аніон-радикала, гідроген пероксиду і малонового діальдегіду

*Визначення вмісту NO у рослинному матеріалі.* 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 центрифугузі MPW 350R (“MPW MedInstruments”, Польща) за температури 2–4 °С при 8000 g протягом 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%-ного реактиву Гріса в 12% 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 сирої маси.

*Визначення генерації супероксидного аніон-радикала.* В основі методу взаємодія  $O_2^{\cdot-}$  з нітросинім тетразолієм з утворенням формазану (Karpets et al., 2012). По 10 пагонів однакового розміру поміщали на 1 год в бюкси з 5

мл 0,1 М К, Na-фосфатного буферу (рН 7,6), що містив 0,05% нітросинього тетразолію, 10 мкМ ЕДТА та 0,1% тритону X-100. Після закінчення експозиції пагони обережно вилучали з бюксів та вимірювали абсорбцію інкубаційного розчину за довжини хвилі 530 нм на спектрофотометрі UV-1280 (Shimadzu, Японія). Показник генерації  $O_2^{\cdot -}$  розраховували в умовних одиницях ( $A_{530} \cdot 1000 / \text{маса сирої речовини пагонів}$ ).

*Визначення вмісту гідроген пероксиду.* Наважки рослинного матеріалу масою 300 мг на льоду гомогенізували у 5%-му розчині трихлороцтової кислоти (ТХО). Проби центрифугували при 8000 g протягом 10 хв за температури 2–4 °С на центрифугі MPW 350R (MPW MedInstruments, Польща) і в супернатанті визначали концентрацію  $H_2O_2$  за допомогою феротіоціанатного методу (Sagisaka, 1976).

*Визначення вмісту продуктів ПОЛ, що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК).* Для аналізу продуктів ПОЛ (переважно МДА) наважку масою 300 мг гомогенізували у розчині 0,25% ТБК в 10% ТХО (дослідна проба) або у розчині лише 10% ТХО (контроль). Суміші кип'ятили в пробірках, закритих ковпачками з фольги, на водяній бані протягом 30 хв. Після цього охолоджували і центрифугували протягом 15 хв при 10000 g. Абсорбцію супернатанту вимірювали за довжини хвилі 532 нм (основний сигнал) та 600 нм (неспецифічне світлопоглинання, величину якого віднімали від основного результату  $A_{532}$ ) (Kolupaev et al., 2024b). 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.

### **2.3.2. Аналіз активності антиоксидантних ферментів**

При визначенні активності антиоксидантних ферментів — супероксиддисмутази (СОД), каталази і гваяколпероксидази — наважки рослинного матеріалу гомогенізували на холоді в 0,15 М К, Na-фосфатному буфері (рН 7,6), що містив 0,1 мМ ЕДТА та 1 мМ дитіотрейтолу (Kolupaev et al., 2020). Активність ферментів визначали у супернатанті після центрифугування гомогенату при 8000 g протягом 10 хв при 4 °С.

*Активність СОД* (КФ: 1.15.1.1) аналізували при рН 7,6 за методом, в основі якого здатність ферменту до конкуренції з нітросинім тетразолієм за супероксидні радикали, утворені аеробною взаємодією фенозинметосульфату та НАДН. Абсорбцію вимірювали при 540 нм. Активність ферменту виражали в умовних одиницях як різницю у зміні абсорбції контрольної (без рослинного матеріалу) і дослідної проб у розрахунку на 1 г речовини і час реакції (хв).

*Активність каталази* (КФ 1.11.1.6) аналізували при рН 7,0 за кількістю гідроген пероксиду, розкладеного за одиницю часу, і виражали в ммоль  $\text{H}_2\text{O}_2$  / (г речовини  $\times$  хв).

*Активність гваяколпероксидази* (КФ 1.11.1.7) визначали з використанням гваяколу як донора гідрогену та гідроген пероксиду як субстрату. Попередньо рН реакційної суміші доводили до 6,2 з використанням К-, Na-фосфатного буферу. Абсорбцію тетрагваяколу визначали при 470 нм. Активність ферменту виражали в умовних одиницях/(г речовини  $\times$  хв).

### **2.3.3. Визначення активності амілази у зернівках**

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). 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 °C протягом 3 год. Після цього гелі заливали 10 мл розчину Люголя (0,04%  $\text{I}_2$  у 0,1% KI), надлишок розчину через 5 хвилин 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  $\text{мм}^2$ . Активність ферменту виражали в умовних одиницях ( $\text{мм}^2$ ) за годину.

#### **2.3.4. Визначення вмісту низькомолекулярних сполук зі стрес-протекторними властивостями**

*Сумарний вміст розчинних вуглеводів у пагонах проростків визначали методом Рое (Roe, 1954) з модифікаціями (Kolupaev et al., 2022a). Рослинний матеріал гомогенізували у дистильованій воді, гомогенат кип'ятили на водяній бані протягом 10 хв. Для осадження білків до гомогенату додавали однакові об'єми 30% сульфату цинку та 15%  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . 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 спіавт. (1973) із незначними модифікаціями. Наважки пагонів гомогенізували в дистильованій воді, після чого гомогенат відразу кип'ятили протягом 10 хв на водяній бані. Проби охолоджували, екстракти фільтрували через паперові фільтри. У реакційних пробірках змішували по 1 мл екстракту, льодяної оцтової кислоти та нінгідринового реактиву. Пробірки, закриті ковпачками з фольги, нагрівали на киплячій водяній бані протягом 1 год. Абсорбцію визначали за довжини хвилі 520 нм. Стандартом слугував L-пролін.*

*Визначення вмісту фенольних речовин і антоціанів. Для визначення загального вмісту фенольних сполук і антоціанів 300 мг рослинного матеріалу гомогенізували в 6 мл 80%-го етанолу, екстрагували протягом 20*

хв за кімнатної температури і центрифугували при 8000 g протягом 15 хв. Для оцінки вмісту фенольних сполук у реакційні пробірки вносили 0,5 мл супернатанту, 8 мл дистильованої води та 0,5 мл реактиву Фоліна, перемішували і через 3 хв додавали 1 мл 10%-го карбонату натрію. Через 1 годину абсорбцію реакційної суміші вимірювали при 725 нм (Bobo-García et al., 2015). Вміст фенольних сполук виражали у мкмоль галової кислоти на 1 г 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 величини абсорбції у розрахунку на 1 г рослинного матеріалу.

#### **2.4. Повторність експериментів і статистична обробка результатів**

При визначенні впливу ГАМК та інших сполук на проростання насіння та біомасу проростків кожна повторність складалася з 80 зернівок або проростків, а в кожному варіанті досліду було не менше трьох повторень. В експериментах з дослідження впливу ГАМК на стійкість до стресорів шляхом її надходження через корені у кожному повторенні використовували не менше 30 проростків. 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 проводили у 5-разовому повторенні, кожне в окремій чашці Петрі, яка містила всі варіанти досліду, кожен з яких містив чотири зернівки.

Статистичні розрахунки, аналіз головних компонент (PCA) та загальний аналіз даних виконували в середовищі R (версія 4.5.1) із використанням інтегрованого середовища розробки RStudio (версія 2025.01.1+403). Вірогідність відмінностей між експериментальними варіантами оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента. Кореляційний аналіз Пірсона та побудову теплових карт проводили в Microsoft Excel 2016. При

побудові теплових карт усі значення були нормалізовані в діапазоні від 0 до 1.

Для комплексної оцінки впливу досліджуваних факторів та їх взаємодії на аналізовані показники застосовували однофакторний або двофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA). У разі виявлення статистично значущого ефекту проводили пост-хок аналіз із використанням критерію найменшої суттєвої різниці Фішера (LSD-test) та тесту Тьюкі (HSD-test). Для контролю ймовірності помилки першого роду при множинних порівняннях в окремих випадках застосовували поправку Бонферроні.

### РОЗДІЛ 3. ФЕНОМЕНОЛОГІЯ ВПЛИВУ ГАМК НА СТІЙКІСТЬ ПШЕНИЦІ І ТРИТИКАЛЕ ДО АБІОТИЧНИХ СТРЕСОРІВ

#### 3.1. Вплив ГАМК на стійкість проростків пшениці до потенційно летального теплового стресу

У літературі є відомості про підвищення під впливом екзогенної ГАМК стійкості рослин до абіотичних стресорів різної природи, включно з тепловим стресом. 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. Водночас вплив ГАМК на теплостійкість пшениці на ранніх фазах розвитку дотепер не досліджувався. Однак є відомості про її чутливість до стрес-протекторної дії ГАМК. Наприклад, показано підвищення стійкості рослин пшениці на різних фазах розвитку до зневоднення і засолення за обробки ГАМК (Wang et al., 2022; Zhao et al., 2023). Зважаючи на це, вивчали вплив 24-годинної інкубації проростків на розчинах ГАМК на їхню стійкість до потенційно летального теплового стресу.

Попередня обробка проростків розчинами ГАМК у діапазоні концентрацій 0,1–2,5 мМ супроводжувалася підвищенням виживаності після ушкоджувального нагрівання (рис. 3.1). Статистично значущий ефект ( $p \leq 0,05$ ) спостерігали за використання 0,5 та 1,0 мМ, тоді як за нижчої і вищої концентрацій позитивна тенденція фіксувалася лише на рівні  $p \leq 0,1$ . З урахуванням отриманих результатів для подальших досліджень біохімічних показників проростків обрано концентрацію ГАМК 0,5 мМ як оптимальну.

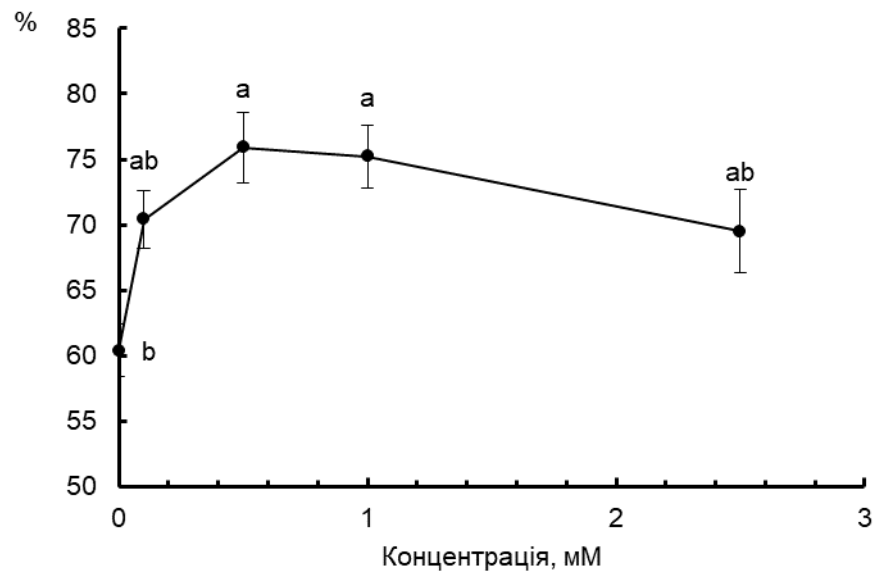


Рис. 3.1 Концентраційна залежність впливу ГАМК на виживаність проростків пшениці після прогріву за температури 45 °С (10 хв).

### 3.2. Індукування дією ГАМК стійкості пшениці до модельної посухи

Захисні ефекти екзогенної ГАМК за умов стресу посухи показані на прикладі ряду видів рослин: *Trifolium repens* (Yong et al., 2017), *Agrostis stolonifera* (Tang et al., 2020), *Phaseolus vulgaris* (Abd El-Gawad et al., 2021). Незважаючи на господарську важливість та поширеність м'якої пшениці, вплив ГАМК на її посухостійкість вивчено недостатньо. У роботі Fargoq та співавт. (2017), виконаній на рослинах пшениці, що росли у ґрунтовій культурі в теплиці, показано, що обробка ГАМК сприяла збереженню стабільності мембран, збільшувала вміст хлорофілу і показники продуктивності. У дослідженні Zhao та співавторів (2023) виявлено, що обробка ГАМК 2–6-денних проростків пшениці в умовах осмотичного стресу, створюваного дією ПЕГ, зменшувала інгібування росту та знижувала вміст продуктів ПОЛ. Водночас сортові особливості дії ГАМК вивчалися у поодиноких дослідженнях і стосувалися лише окремих інтегральних фізіологічних показників – стабільності мембран, ефективності використання води та продуктивності (Fargoq et al., 2017). Зважаючи на це, вивчали

концентраційну залежність впливу ГАМК на ріст органів проростків пшениці за модельної посухи, створюваної перенесенням 2-добових проростків на середовище з 15% ПЕГ 6000. У роботі використовували два сорти: чутливий до посухи – Досконала і більш стійкий – Тобак.

За дводенного впливу модельної посухи спричиненої дією 15% розчину ПЕГ 6000 накопичення біомаси коренів та пагонів пригнічувалося на понад 50% у нестійкого сорту пшениці Досконала. У більш стійкого сорту Тобак пригнічення біомаси кренів становило 33%, а пагонів – близько 43% (рис. 3.2).

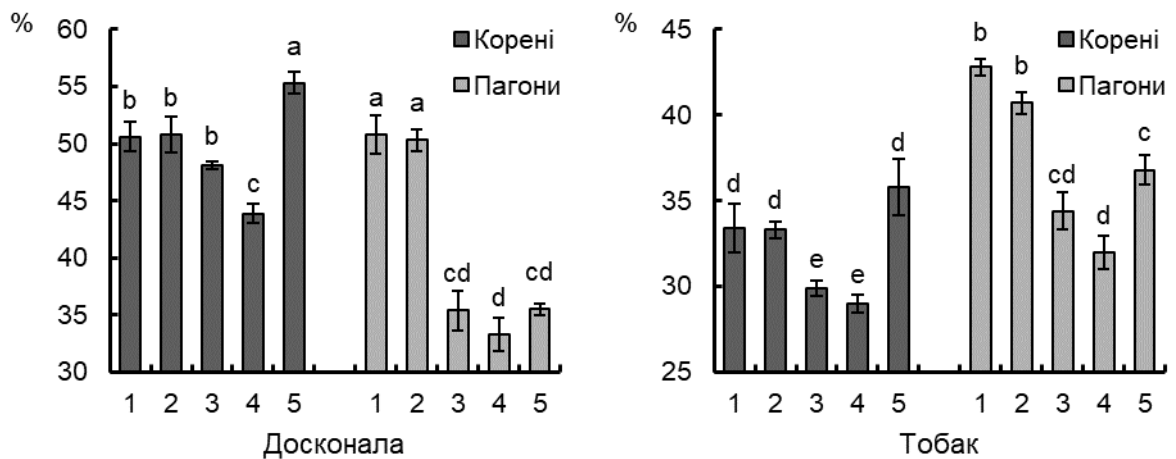


Рис. 3.2 Модуляція інгібуючого впливу (%) 15% ПЕГ 6000 на ріст проростків пшениці сортів Досконала та Тобак обробкою ГАМК. 1 – ПЕГ 6000 (15%) ; 2 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,025 мМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,1 мМ); 4 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (2,5 мМ).

Обробка розчинами ГАМК в концентраціях від 0,025 до 2,5 мМ знижувала інгібуючий вплив модельної посухи на накопичення біомаси рослин. Стрес-протекторний ефект на ріст коренів був значимим за концентрацій 0,1 і 0,5 мМ (при  $p \leq 0,05$ ) (рис. 3.2). При цьому позитивний ефект ГАМК був більш вираженим на ріст пагонів. Також були виявлені сортові відмінності: ГАМК мала більш виражений позитивний ефект на ріст проростків пшениці менш стійкого сорту Досконала. Однак, при

вирощуванні рослин за нормальних умов розчини ГАМК у концентраціях 0,1 і 0,025 мМ не мали значного впливу на ріст як коренів так і пагонів проростків в обох сортів пшениці. У зв'язку з цим в подальшому використовували розчин ГАМК в концентрації 0,5 мМ, який найбільш істотно пом'якшував негативні ефекти від посухи на ріст проростків при дослідженні її впливу на біохімічні показники.

Модельна посуха сприяла зниженню відносного вмісту води в пагонах проростків пшениці обох сортів, але цей ефект був більш вираженим у нестійкого сорту Досконала (рис. 3.3). Обробка ГАМК підвищувала відносний вміст води в проростках, інкубованих на розчині ПЕГ 6000, майже до контрольного рівня в обох сортах.

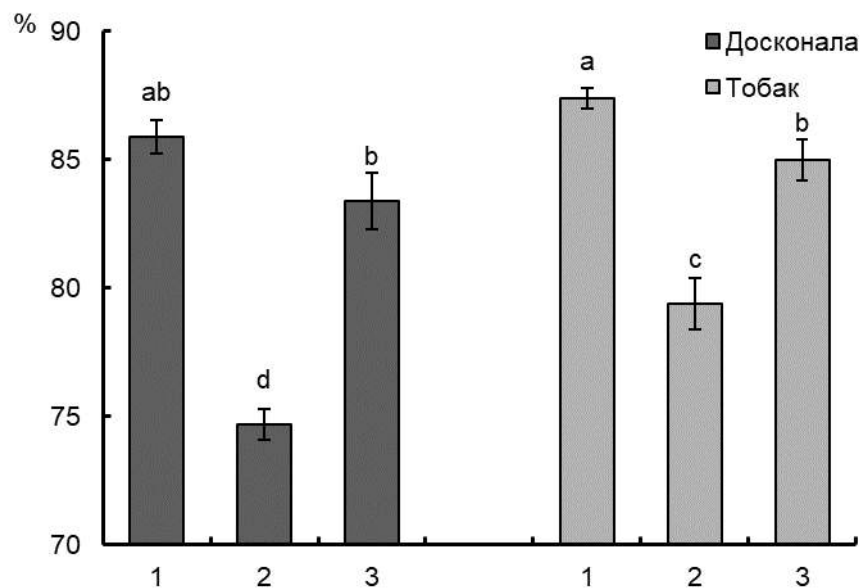


Рис. 3.3 Відносний вміст води в пагонах проростків пшениці. 1 – Контроль; 2 – ПЕГ 6000 (15%); 3 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ).

Отже, обробка ГАМК підвищувала стійкість етіюльованих проростків пшениці до осмотичного стресу, спричиненого дією ПЕГ 6000. При цьому стрес-протекторна дія була більш вираженою у менш стійкого сорту пшениці Досконала, хоча і вплив ГАМК більш на посухостійкий сорт Тобак також був істотним.

### **3.3. Вплив ГАМК на ріст проростків тритикале за умов осмотичного, сольового в комбінованого стресів**

Посуха і засолення — найпоширеніші стрес-фактори, що впливають життя рослин у всьому світі (Bakhoum et al., 2023; Sadak & Dawood, 2023). У районах сільськогосподарського виробництва відбувається постійне скорочення запасів зрошувальної води з одночасним посиленням засолення ґрунтів через застосування підземних солонуватих вод (Abobatta, 2020).

Посуха та засолення, особливо при їх поєднанні, спричиняють у рослин жорсткий водний дефіцит, пригнічення фотосинтезу, порушення енергетичного метаболізму і, як наслідок, посилене утворення АФО та розвиток окиснювального стресу (Bakhoum et al., 2023; Goharrizi et al., 2021). Токсична дія іонів солей на біомакромолекули посилює негативні ефекти посухи (Sadak et al., 2023).

Відомо, що в умовах сольового стресу (Jalil & Ansari, 2020) та посухи (Z. Li et al., 2021) у багатьох видів рослин посилюються процеси накопичення ГАМК та її перетворення у реакціях ГАМК-шунту. Це сприяє стабілізації внутрішньоклітинного рН клітини, карбоново-нітрогенного обміну та енергетичних процесів (Shelp et al., 2021; Jin et al., 2023; Ramzan et al., 2023). Показано, що ГАМК-шунт відіграє дуже важливу роль у дихальному метаболізмі при сольовому стресі, забезпечуючи альтернативу постачанню карбону в цикл трикарбонових кислот за рахунок синтезу сукцинату, обминаючи чутливі до дії солей мітохондріальні піруватдегідрогеназний і 2-оксоглутаратдегідрогеназний комплекси (Che-Othman et al., 2020).

На даний час отримано феноменологічні дані про підвищення толерантності культурних рослин до посухи та сольового стресу під дією екзогенної ГАМК (Seifikalhor et al., 2019; Sheteiwy et al., 2019; Shomali et al., 2021; Zhao et al., 2023). Однак стратегії адаптації рослин різних видів і навіть сортів до тих самих стресів можуть помітно відрізнятися, внесок окремих компонентів стрес-протекторних систем (зокрема, антиоксидантної та осмопротекторної) істотно залежить від видових (Kolupaev et al., 2022b) і

навіть сортових (Seifikalhor et al., 2022) особливостей. Це не дозволяє безпосередньо екстраполювати результати, отримані на одних видах, на інші об'єкти.

Тритикале – гібридний вид, отриманий шляхом схрещування пшениці та жита, він поєднує в собі властивості харчової та кормової культури. На підставі аналізу польових випробувань різних сортів відзначається вища посухостійкість тритикале порівняно з видами пшениці (Blum, 2014).

Також тритикале розглядається як перспективний солестійкий кормовий вид, який можна вирощувати на посушливих і деградованих пасовищах (Atak et al., 2023; Kankarla et al., 2020). Тим не менш, поєднаний вплив посухи та засолення значно більшою мірою пригнічує ріст та знижує врожайність тритикале порівняно з дією кожного стрес-фактора окремо (Mohammadi Alagoz et al., 2023). У зв'язку з цим пошук прийомів, що підвищують його толерантність до засолення, посухи та особливо їх комбінації, дуже актуальний.

Вплив ГАМК на толерантність тритикале до абіотичних стрес-факторів, включаючи посуху та засолення, дотепер залишався зовсім не дослідженим. У зв'язку з цим вивчали вплив екзогенної ГАМК на стійкість проростків тритикале до дії посухи, створюваної за допомогою ПЕГ 6000, хлоридно-натрієвого засолення та комбінації стресів.

У проростках тритикале без стресового впливу обробка ГАМК дещо збільшувала біомасу коренів і пагонів (рис. 3.4). За умов модельної посухи, імітованої 15%-вим розчином ПЕГ 6000, маса коренів і пагонів проростків тритикале знижувалася в два рази. Сольовий стрес, спричинений дією NaCl, мав дещо менший вплив на ріст проростків порівняно з посухою, зниження біомаси становило 45% від контролю. У варіанті із поєднанням осмотичного і сольового стресів спостерігалось істотне пригнічення росту проростків. Зменшення біомаси коренів і пагонів за комбінації обох стресів становило 77% порівняно з контролем (рис. 3.4).

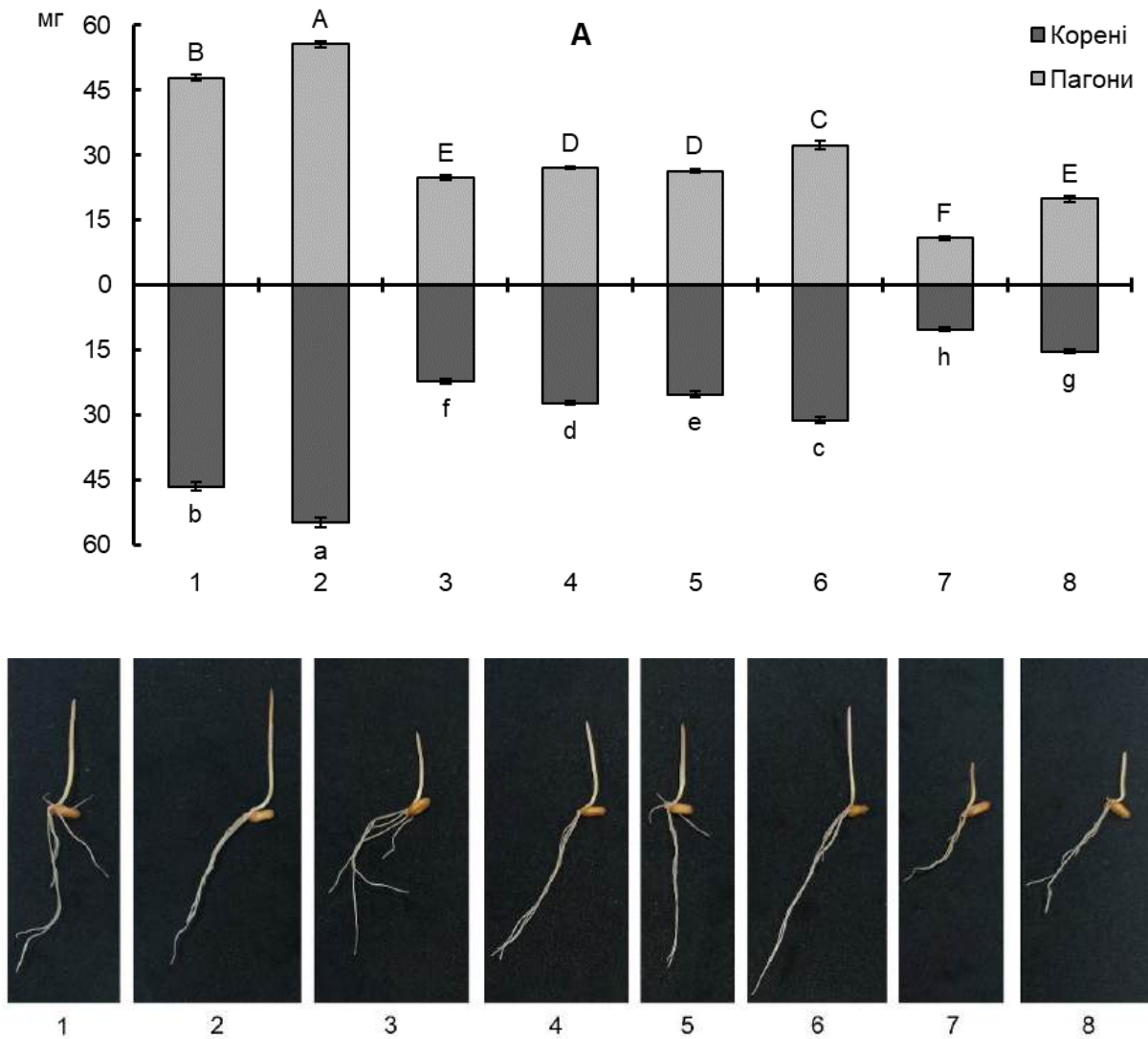


Рис. 3.4. Сира маса органів проростків тритикале та їхній фенотип. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (0,5 мМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ); 5 – NaCl (100 мМ); 6 – NaCl (100 мМ) + ГАМК (0,5 мМ); 7 – ПЕГ 6000 (15%) + NaCl (100 мМ); 8 – ПЕГ 6000 (15%) + NaCl (100 мМ) + ГАМК (0,5 мМ).

Обробка ГАМК не впливала на вміст води в тканинах проростків за фізіологічно нормальних умов (рис. 3.5). Модельна посуха зменшувала оводненість тканин на 9,3%. Дія сольового стресу була менш вираженою: вміст води зменшився на 3,9%. Особливо різке зниження вмісту води в проростках (на 14,5%) спостерігалось при комбінації модельної посухи та сольового стресу. ГАМК значно ( $p \leq 0,05$ ) підвищувала оводненість в

тканинах проростків, що зазнавали впливу стресових факторів як окремо, так і за їх комбінації (рис. 3.5).

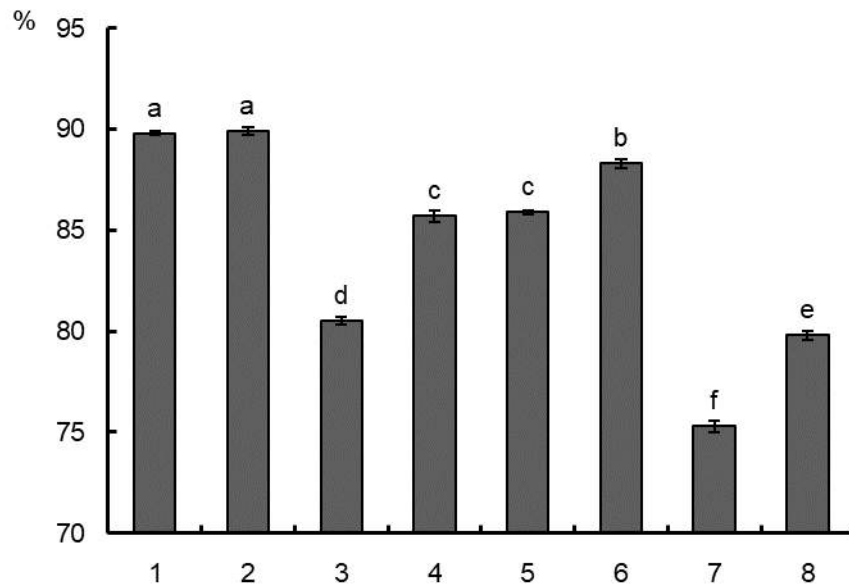


Рис. 3.5 Відносний вміст води у пагонах проростків тритикале. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (0,5 мМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ); 5 – NaCl (100 мМ); 6 – NaCl (100 мМ) + ГАМК (0,5 мМ); 7 – ПЕГ 6000 (15%) + NaCl (100 мМ); 8 – ПЕГ 6000 (15%) + NaCl (100 мМ) + ГАМК (0,5 мМ).

Отримані результати свідчать про те, що екзогенна ГАМК підвищувала стійкість проростків тритикале до посухи, сольового стресу та їх поєднання. ГАМК мала виражений вплив на найбільш інтегральний показник — ріст проростків за стресових умов. Варто зазначити, що ГАМК також вірогідно ( $p \leq 0,05$ ) впливала на ріст проростків за фізіологічно нормальних умов, однак цей стимулюючий ефект був значно менш вираженим. За сольового стресу вплив ГАМК на біомасу проростків був помітнішим, ніж за посухи, проте за комбінованої дії посухи та сольового стресу ефект ГАМК на ріст проростків був особливо вираженим (рис. 3.4).

Обробка проростків тритикале ГАМК забезпечувала підтримання рівня води в тканинах за умов посухи та сольового стресу (рис. 3.5). Подібні явища спостерігалися і в інших видів рослин. Зокрема, у *Trifolium repens* за умов

посухи та обробки ГАМК відзначали вищий відносний вміст води в листках (Yong et al., 2017). Обробка чотириденних проростків *Oryza sativa* ГАМК підвищувала вміст води у них за теплового стресу (Nayyar et al., 2014). Таким чином, тритикале, як і ряд інших видів культурних рослин, є досить чутливим до стрес-протекторної дії екзогенної ГАМК.

### **Висновки до розділу 3**

Екзогенна ГАМК чинила позитивний вплив на інтегральні показники, що характеризують стійкість зернових злаків до основних абіотичних стресорів – високої температури, посухи і засолення. Зокрема, встановлено істотне підвищення виживаності проростків пшениці після потенційно летального теплового стресу за обробки 0,5 і 1 мМ ГАМК. Обробка проростків пшениці 0,5 мМ ГАМК також істотно зменшувала інгібування накопичення біомаси органів за умов осмотичного стресу, створюваного 15% ПЕГ 6000. При цьому обробка ГАМК сприяла підвищенню відносного вмісту води у тканинах за умов осмотичного стресу. Більш помітний стрес-протекторний вплив ГАМК виявлено на чутливому до посухи сорті пшениці.

Вперше встановлено стрес-протекторний вплив ГАМК на проростки тритикале за умов модельної посухи, сольового стресу та комбінованої дії цих чинників, що виявлявся у зменшенні інгібування росту коренів і пагонів. Також обробка ГАМК зменшувала ефект втрати води органами проростків за вказаних стресів та їх комбінації.

Таким чином, проростки злаків (пшениця, тритикале) можуть бути чутливою моделлю для дослідження механізмів впливу ГАМК на стійкість до найбільш поширених абіотичних стресів – високих температур, посухи і засолення.

## РОЗДІЛ 4. РОЛЬ СИГНАЛЬНИХ ПОСЕРЕДНИКІВ І СТРЕС-ПРОТЕКТОРНИХ СИСТЕМ У РОЗВИТКУ ІНДУКОВАНОЇ ГАМК СТІЙКОСТІ ПШЕНИЦІ І ТРИТИКАЛЕ ДО ТЕПЛОВОГО, ОСМОТИЧНОГО ТА СОЛЬОВОГО СТРЕСІВ

### 4.1. Участь сигнальних посередників в індукуванні теплостійкості проростків пшениці ГАМК

Як зазначалося раніше, участь ключових сигнальних посередників, передусім активних форм кисню та іонів кальцію, у забезпеченні захисної дії ГАМК вивчена недостатньо. Зокрема, донедавна бракувало відомостей про залучення активних форм кисню до реалізації ефектів ГАМК за температурних впливів на рослини.

Також невизначеним залишається значення кальцію у формуванні сигналів за участю активних форм кисню під дією ГАМК. Водночас існують свідчення про його участь у процесах теплового загартування рослин (Finka, Goloubinoff, 2014; Karpets et al., 2015) та в активації НАДФН-оксидази (Kohli et al., 2019). Крім того, показано, що ГАМК може посилювати надходження  $\text{Ca}^{2+}$  до клітин через кальцієві канали, керовані гіперполяризацією (Ramesh et al., 2017). Попри це, причинно-наслідкові взаємозв'язки між змінами кальцієвого гомеостазу, утворенням активних форм кисню, запуском захисних систем і формуванням теплостійкості рослин залишаються нез'ясованими.

З огляду на викладене, одним із завдань дослідження було встановити участь активних форм кисню у запуску антиоксидантних механізмів і формуванні теплостійкості проростків пшениці під впливом ГАМК. Окремо за допомогою інгібиторного підходу оцінювали залежність цих процесів від кальцієвого гомеостазу.

Для оцінювання ролі гідроген пероксиду у прояві захисної дії ГАМК аналізували зміну його вмісту в коренях проростків контрольованого варіанта та

після обробки ГАМК. У контролі концентрація  $\text{H}_2\text{O}_2$  упродовж усього періоду спостережень залишалася практично сталою (рис. 4.1). Додавання 0,5 мМ ГАМК до середовища інкубації спричиняло швидке короткочасне зростання вмісту гідроген пероксиду в коренях. Ознаки такого підвищення фіксували вже через 20 хв після початку обробки, а через 1–2 год показники у дослідному варіанті достовірно перевищували контрольні значення. Через 3 год інкубації різниця між варіантами зникала, і наприкінці досліду (через 24 год) рівень  $\text{H}_2\text{O}_2$  у коренях обох варіантів ставав однаковим (рис. 4.1).

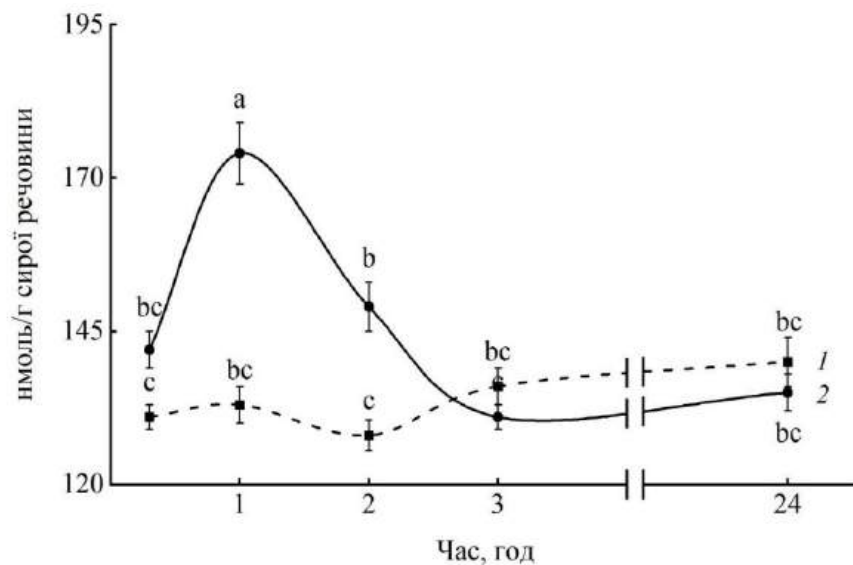


Рис. 4.1 Динаміка вмісту гідроген пероксиду в коренях проростків пшениці. 1 — Контроль; 2 — ГАМК (0,5 мМ).

Короткочасне підвищення вмісту гідроген пероксиду в коренях після дії ГАМК може свідчити про активацію антиоксидантної ферментної системи на відповідних етапах досліду. І дійсно, вже через 2 год від початку впливу ГАМК у коренях зростала активність СОД (рис. 4.2 А). Такий ефект зберігався протягом всього періоду експозиції проростків на середовищі з додаванням ГАМК (24 год). Подібну динаміку посилення активності під впливом цієї сполуки встановлено також для каталази та гваяколпероксидази (рис. 4.2 Б, В).

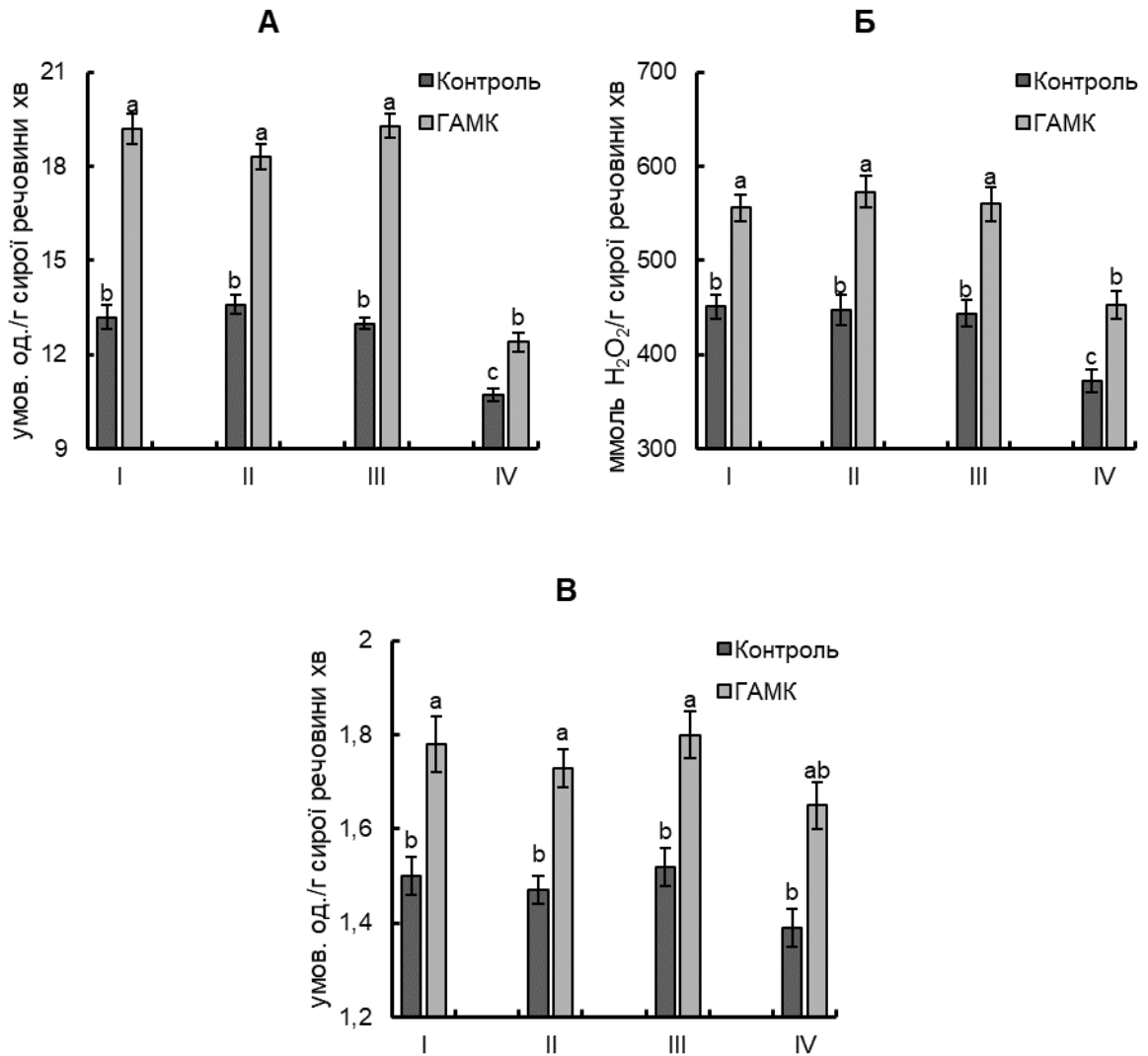


Рис. 4.2 Активність СОД (А), КАТ (Б) і ГПО (В) у корнях проростків пшениці за дії ГАМК та ушкоджувального прогріву. I, II, III — відповідно через 2, 4 і 24 год після інкубації проростків на розчинах з додаванням ГАМК; IV — через 5 год після ушкоджувального прогріву за температури 45 °С (10 хв).

Після ушкоджувального нагрівання у корнях проростків пшениці відзначали зниження активності супероксиддисмутази та каталази, тоді як попереднє витримування у середовищі з ГАМК сприяло збереженню їх функціонування (рис. 4.2 А, Б). Активність гваяколпероксидази під дією нагрівання істотно не змінювалася, однак у варіанті з використанням ГАМК вона залишалася дещо вищою порівняно з контролем (рис. 4.2 В).

У наступній серії експериментів оцінювали вплив антагоністів АФО і кальцію на прояв у коренях проростків модуляції вмісту  $H_2O_2$ , спричиненої дією ГАМК. Застосування скавенджера гідроген пероксиду ДМТС зменшувало рівень гідроген пероксиду у коренях і повністю нівелювало підвищення, спричинене обробкою ГАМК (рис. 4.3). Імідазол, який пригнічує НАДФН-оксидазу — фермент, відповідальний за утворення активних форм кисню на поверхні клітин, — також викликав певне зниження вмісту гідроген пероксиду та істотно послаблював його збільшення під впливом ГАМК.

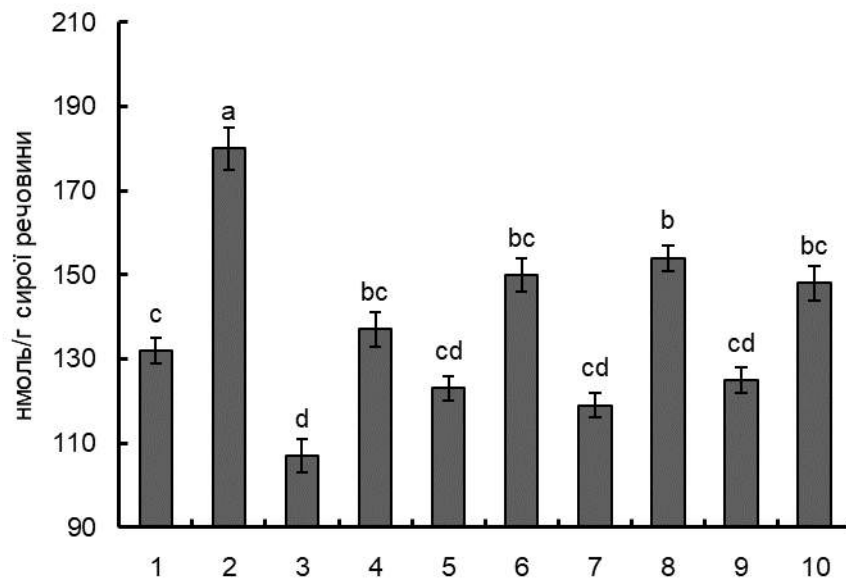


Рис. 4.3 Вплив ГАМК, антагоністів АФО і кальцію на вміст гідроген пероксиду у коренях проростків пшениці. 1 — Контроль; 2 — ГАМК (0,5 мМ); 3 — ДМТС (0,15 мМ); 4 — ГАМК (0,5 мМ) + ДМТС (0,15 мМ); 5 — імідазол (10 мкМ); 6 — ГАМК (0,5 мМ) + імідазол (10 мкМ); 7 — ЕГТА (0,4 мМ); 8 — ГАМК (0,5 мМ) + ЕГТА (0,4 мМ); 9 — неоміцин (0,2 мМ); 10 — ГАМК (0,5 мМ) + неоміцин (0,2 мМ).

Застосування хелатора позаклітинного кальцію ЕГТА саме по собі спричинювало незначне зменшення вмісту  $H_2O_2$  у коренях (рис. 4.3), проте водночас частково послаблювало підвищення рівня активних форм кисню, індуковане ГАМК. Іншим антагоністом кальцію був неоміцин, який завдяки

зв'язуванню фосфатидилінозитолбіфосфатів пригнічує фосфатидилінозитолспецифічну фосфоліпазу С (Liu et al., 2006) і тим самим перешкоджає утворенню інозитол-1,4,5-трифосфату — сполуки, що регулює вивільнення кальцію до цитозолу з внутрішньоклітинних депо (Lee, Lee, 2008). Під його впливом рівень  $H_2O_2$  у коренях істотно не змінювався, однак приріст вмісту гідроген пероксиду, спричинений ГАМК, значною мірою зменшувався (рис. 4.3). Отже, використання різних антагоністів кальцію частково послаблювало індуковане ГАМК посилення утворення активних форм кисню.

Антагоністи активних форм кисню та кальцію також модифікували вплив ГАМК на активність антиоксидантних ферментів (рис. 4.4). Обробка скавенджером гідроген пероксиду ДМТС і інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом сама по собі не змінювала активність СОД у коренях проростків пшениці, однак повністю усувала її підвищення, викликане ГАМК (рис. 4.4 А).

Використання ЕГТА та неоміцину окремо не впливало на активність цього ферменту. При сумісній дії ГАМК і ЕГТА активність СОД залишалася підвищеною на рівні, характерному для варіанта з однією ГАМК. Натомість неоміцин, що перешкоджає надходженню кальцію з внутрішньоклітинних компартментів у цитозоль, достовірно послаблював ефект ГАМК щодо активності СОД (рис. 4.4 А).

Активність каталази у присутності ДМТС та імідазолу суттєво не змінювалася, хоча за дії скавенджера  $H_2O_2$  простежувалася тенденція до її певного зниження (рис. 4.4 Б). Водночас обидва інгібітори усували підвищення активності каталази, що спостерігалось після обробки коренів ГАМК.

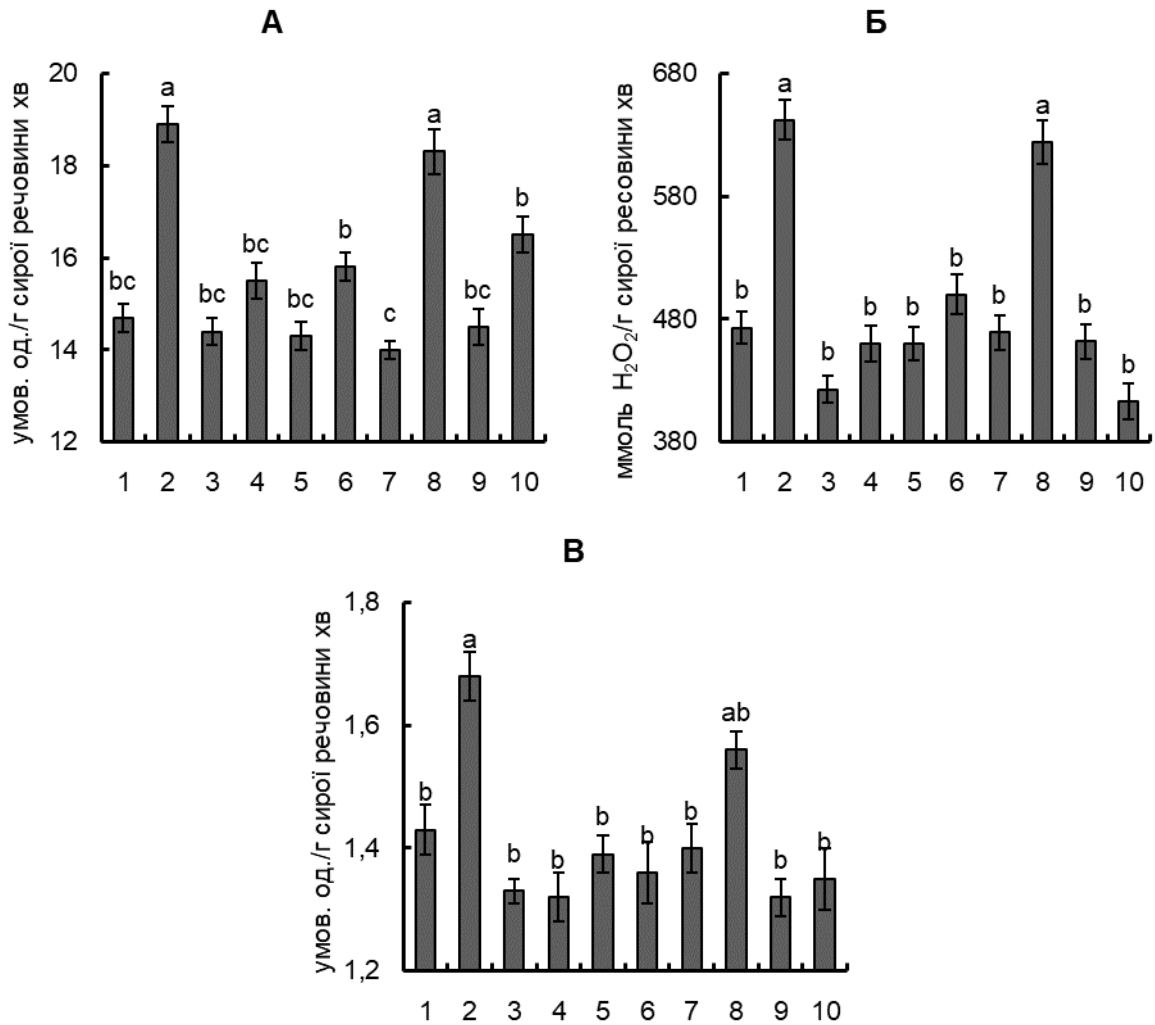


Рис. 4.4 Вплив ГАМК, антагоністів АФО і кальцію на активність СОД (А), КАТ (Б) і ГПО (В) у корнях проростків пшениці. 1 — Контроль; 2 — ГАМК (0,5 мМ); 3 — ДМТС (0,15 мМ); 4 — ГАМК (0,5 мМ) + ДМТС (0,15 мМ); 5 — імідазол (10 мкМ); 6 — ГАМК (0,5 мМ) + імідазол (10 мкМ); 7 — ЕГТА (0,4 мМ); 8 — ГАМК (0,5 мМ) + ЕГТА (0,4 мМ); 9 — неоміцин (0,2 мМ); 10 — ГАМК (0,5 мМ) + неоміцин (0,2 мМ).

Антагоністи кальцію — ЕГТА та неоміцин — за відсутності ГАМК не змінювали активність каталази в корнях (рис. 4.4 Б). Водночас ЕГТА не впливав і на підвищення активності ферменту, викликане ГАМК. На відміну від нього, неоміцин, що перешкоджає надходженню кальцію з внутрішньоклітинних депо, повністю усував індуковане ГАМК зростання активності каталази.

У разі застосування ДМТС та імідазолу активність гваяколпероксидази істотно не змінювалася (рис. 4.4 В), однак ці обидві сполуки повністю усували підвищення активності ферменту, спричинене ГАМК. Антагоністи кальцію без додавання ГАМК практично не впливали на активність гваяколпероксидази, проте ЕГТА дещо послаблював її індукцію під дією ГАМК, тоді як неоміцин повністю усував цей ефект (рис. 4.4 В).

Отже, зростання активності трьох досліджених антиоксидантних ферментів у коренях під впливом ГАМК залежало від АФО, утворюваних за участю НАДФН-оксидази, тоді як вплив антагоністів кальцію виявився менш однозначним. У цій експериментальній системі хелатор позаклітинного кальцію ЕГТА майже не змінював ефекти індукції ферментів дією ГАМК. Натомість неоміцин, який блокує залежне від фосфоліпази С надходження кальцію з внутрішньоклітинних компартментів до цитозолу, повністю або частково усував підвищення активності всіх трьох ферментів, викликане обробкою проростків ГАМК.

Про участь АФО та внутрішньоклітинного кальцію у реалізації ефектів ГАМК свідчать також інтегральні показники, що характеризують ушкодження проростків тепловим впливом і пов'язаний з ним окиснювальний стрес. Після дії високої температури в коренях накопичувався малоновий діальдегід — один з основних кінцевих продуктів пероксидного окиснення ліпідів (рис. 4.5 А). Попереднє витримування проростків у середовищі з ГАМК майже повністю запобігало цьому ефекту. Самі по собі антагоністи АФО (ДМТС, імідазол) та кальцію (ЕГТА, неоміцин) істотно не змінювали індукване нагріванням накопичення МДА. Водночас ДМТС і імідазол практично повністю усували захисну дію ГАМК: у варіантах комбінованої обробки рівень МДА зростав так само виражено, як і в контролі без застосування ГАМК.

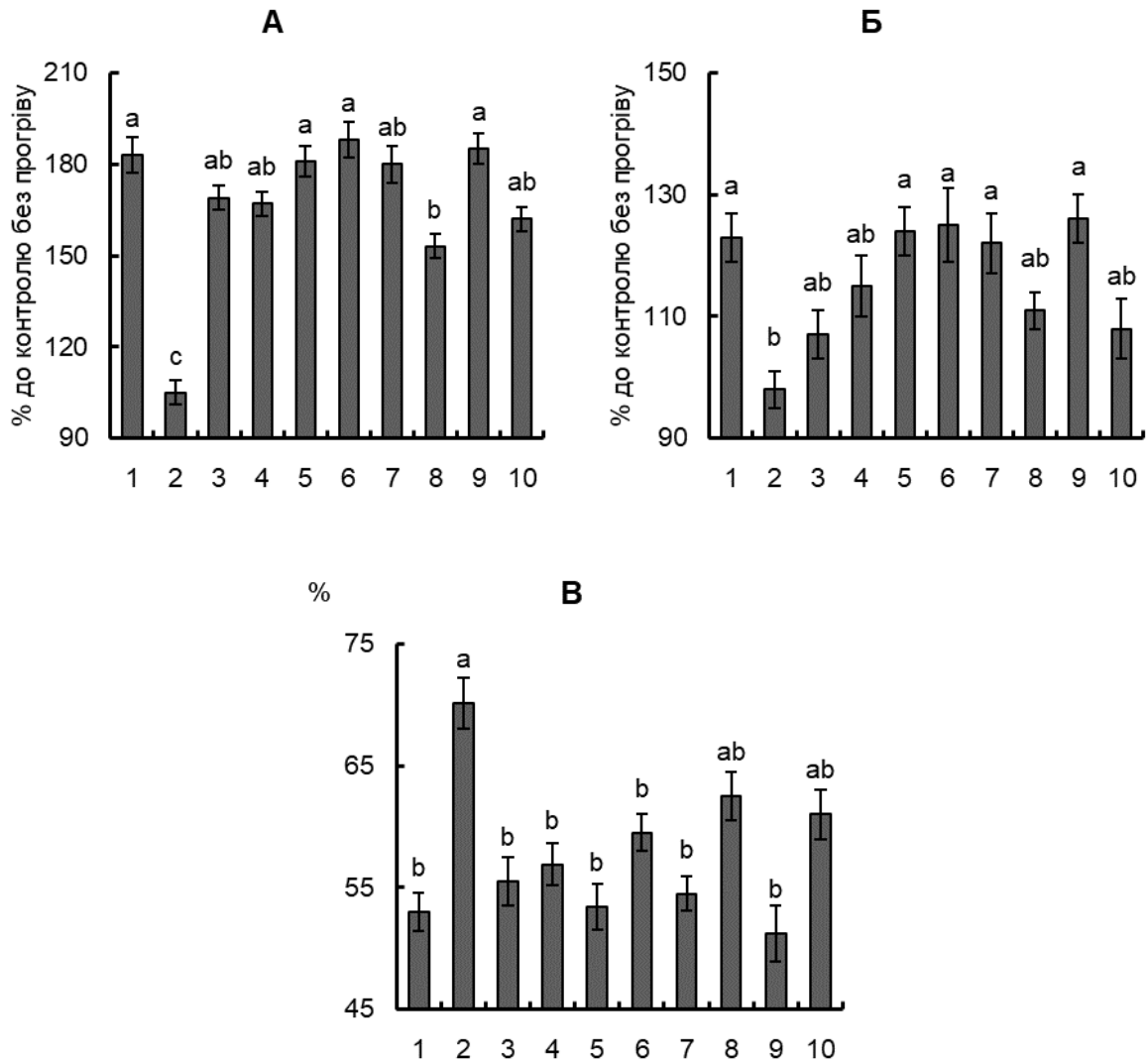


Рис. 4.5 Вміст МДА (А) у коренях, вихід речовин, що поглинають УФ-В (Б) та виживаність (В) проростків пшениці після теплового стресу. 1 — Контроль; 2 — ГАМК (0,5 мМ); 3 — ДМТС (0,15 мМ); 4 — ГАМК (0,5 мМ) + ДМТС (0,15 мМ); 5 — імідазол (10 мкМ); 6 — ГАМК (0,5 мМ) + імідазол (10 мкМ); 7 — ЕГТА (0,4 мМ); 8 — ГАМК (0,5 мМ) + ЕГТА (0,4 мМ); 9 — неоміцин (0,2 мМ); 10 — ГАМК (0,5 мМ) + неоміцин (0,2 мМ).

Антагоністи кальцію також послаблювали здатність ГАМК гальмувати розвиток ПОЛ у коренях після теплового впливу. За поєднання ГАМК з ЕГТА вміст МДА перевищував показники варіанта з однією ГАМК, але залишався нижчим, ніж у контролі без обробки, що свідчить про часткове зменшення захисного ефекту (рис. 4.5 А). У присутності неоміцину зниження інтенсивності ПОЛ, індуковане ГАМК, практично не спостерігалось.

Зміни виходу УФ-В-поглинальних сполук із клітин коренів, які характеризують цілісність мембран, узгоджувалися з показниками ПОЛ (рис. 4.5 Б). Підвищена температура посилювала вихід цих речовин, що вказує на ушкодження мембран. Обробка ГАМК повністю запобігала такому ефекту. ДМТС також зменшував вихід сполук, однак значно слабше, ніж ГАМК, ймовірно через власну антиоксидантну дію. За комбінованого застосування ГАМК і ДМТС мембраностабілізувальний вплив ГАМК суттєво слабшав. Імідазол не змінював стабільність мембран під час теплового стресу, але повністю усував ефект ГАМК щодо зменшення виходу УФ-В-поглинальних речовин. Таким чином, у присутності антиоксиданту або інгібітора НАДФН-оксидази мембраностабілізувальна дія ГАМК майже не проявлялася.

ЕГТА і неоміцин практично не впливали на цей показник у стресових умовах (рис. 4.5 В) і лише незначно послаблювали мембраностабілізувальний ефект ГАМК. У варіантах комбінованої дії значення показника не відрізнялися ні від контролю, ні від варіанта з ГАМК.

Зміни показників стану мембран загалом відповідали динаміці виживаності проростків після ушкоджувального нагрівання (рис. 4.5 В). ДМТС та імідазол самі по собі не впливали на виживаність, однак практично повністю усували її підвищення, викликане ГАМК. ЕГТА і неоміцин істотно не змінювали теплостійкість, а за їх поєднання з ГАМК спостерігалось лише незначне зменшення позитивного ефекту, яке не було статистично значущим ( $p < 0,05$ ).

Отримані результати переконливо свідчать про участь активних форм кисню в реалізації захисної дії ГАМК у проростках пшениці під час теплового впливу. На це вказує майже повне зникнення ефектів зниження інтенсивності ПОЛ, стабілізації мембран, активації антиоксидантних ферментів і підвищення виживаності після застосування скавенджера  $H_2O_2$ . Подібно, у присутності інгібітора НАДФН-оксидази імідазолу захисні ефекти ГАМК практично не проявлялися, що свідчить про ключову роль цього

ферменту в генерації активних форм оксигену клітинами коренів за дії ГАМК.

Ймовірно, поряд з активними формами оксигену до реалізації ефектів ГАМК за високих температур залучаються й інші внутрішньоклітинні сигнальні посередники, зокрема  $\text{Ca}^{2+}$ . Посилення генерації АФО за участю НАДФН-оксидази може бути пов'язане з активацією надходження кальцію до цитозолу. Відомо, що взаємодія ГАМК з мембранними білками GLR та пригнічення каналів ALMT здатні підвищувати концентрацію кальцію в цитозолі (Bor, Turkan, 2019), що потенційно активує каталітичну субодиницю НАДФН-оксидази, яка містить два  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язувальні домени (Kohli et al., 2019). У наших досліджах ЕГТА лише частково зменшував утворення гідроген пероксиду і не впливав на зростання активності СОД та каталази, що свідчить про можливу участь також незалежних від кальцію механізмів. Водночас неоміцин, який впливає на надходження кальцію з внутрішньоклітинних депо, значно сильніше модифікував ефекти ГАМК щодо вмісту АФО, активності ферментів і формування теплостійкості. Це дозволяє припустити, що окремі реакції, зокрема активація СОД і каталази, можуть не залежати від надходження позаклітинного кальцію.

Отже, у наших дослідженнях уперше показано роль АФО в індукуванні теплостійкості проростків пшениці дією ГАМК. Такий феномен узгоджується з відомостями стосовно їх участі у прояві захисної дії ГАМК при сольовому стресі, отриманими в експериментах з іншими видами рослин (Shi et al., 2010; Jin et al., 2019). Водночас одержані дані вказують 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. Загалом, ГАМК можна розглядати як регулятор редокс-гомеостазу та інших сигнальних процесів, що бере участь у широкому спектрі захисних реакцій рослин.

#### **4.2. Вплив ГАМК на функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем етіюльованих проростків пшениці і тритикале за умов модельної посухи і сольового стресу**

##### **4.2.1. Стан стрес-протекторних систем у проростків пшениці різних сортів за дії ГАМК і модельної посухи**

Як зазначалося, нами було встановлено зменшення ріст-інгібувального впливу модельної посухи (15% ПЕГ 6000) на проростки пшениці двох сортів з різною посухостійкістю за впливу на них ГАМК. Зважаючи на це, вважали за доцільне вивчення впливу ГАМК на стан антиоксидантної та осмопротекторної систем в умовах модельної посухи у двох сортів пшениці, які істотно відрізнялися за посухостійкістю.

Після добової інкубації проростків на розчинах 15% ПЕГ 6000 вміст гідроген пероксиду в пагонах проростків пшениці нестійкого сорту Досконала збільшився в півтора рази. В той же час вміст  $H_2O_2$  у пагонах більш стійкого сорту Тобак зріс на третину. Обробка ГАМК майже повністю

усувала підвищення рівня  $H_2O_2$ , спричинюване дією модельної посухи (рис. 4.6 А).

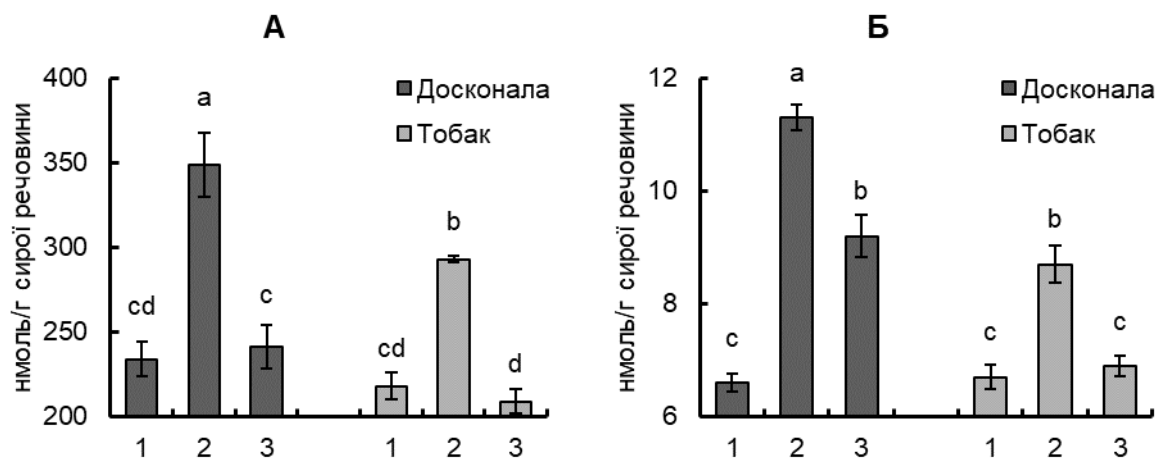


Рис. 4.6 Вміст гідроген пероксиду (А) та ТБК-активних продуктів (Б) (розраховано за МДА) у пагонах проростків пшениці. 1 – Контроль; 2 – ПЕГ 6000 (15%); 3 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ).

В проростках пшениці сорту Досконала вміст продукту ПОЛ МДА за стресових умов був в 1,7 раза вищим від контролю, а в проростках сорту Тобак спостерігалось збільшення цього маркера окиснювального стресу лише на 30%. ГАМК суттєво знизила вміст ТБК-активних продуктів ПОЛ у нестійкого сорту пшениці і майже повністю усувала цей ефект у стійкого (рис. 4.6 Б).

Початкове значення активності СОД в обох досліджуваних сортів значно відрізнялося. Сорт Тобак мав значно вищу активність цього ферменту, ніж Досконала (рис. 4.7 А). За впливу осмотичного стресу активність СОД знижувалася в обох сортів. Обробка ГАМК запобігла стресовому зниженню активності цього ферменту.

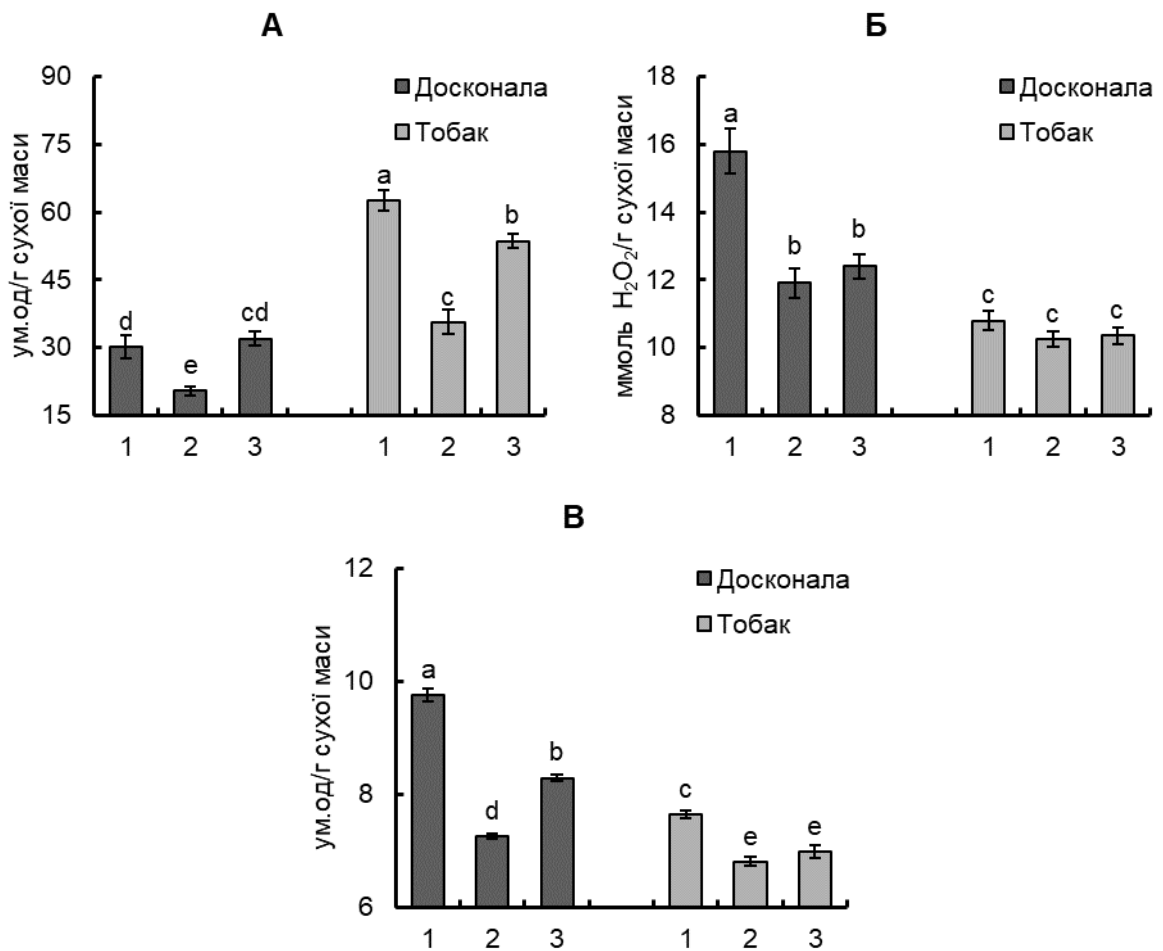


Рис 4.7 Активність СОД (А), каталази (Б) і гваяколпероксидази (В) в пагонах проростків пшениці. 1 – Контроль; 2 – ПЕГ 6000 (15%); 3 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ).

На відміну від СОД, початкова активність каталази була вищою у сорті Досконала порівняно з сортом Тобак (рис. 4.7 Б). Однак в умовах осмотичного стресу вона значно знижувалася. У посухостійкого сорту Тобак активність ферменту в стресових умовах була на рівні, близькому до контрольного варіанта. При цьому обробка ГАМК не мала значного впливу на активність каталази в умовах модельної посухи у обох сортів.

Активність гваяколпероксидази за дії осмотичного стресу значно знижувалася у сорту Досконала, тоді як у сорту Тобаку цей ефект проявлявся меншою мірою (рис. 4.7 В). Обробка ГАМК проростків сорту Досконала сприяла значному збільшенню активності ферменту за умов посухи, тоді як її вплив на цей показник у сорту Тобак проявлявся лише на рівні тенденції.

Вміст одного з важливих осмолітів – проліну – за фізіологічно нормальних умов росту був вищим у сорту Досканала. Осмотичний стрес збільшував його кількість на 57% у сорті Досканала і на 47% у сорті Тобак. При цьому ефект від обробки ГАМК на цей показник у двох сортів виявився протилежним. Якщо у нестійкого сорту вміст проліну за дії ГАМК збільшився, то у стійкого сорту він зменшився (рис. 4.8 А).

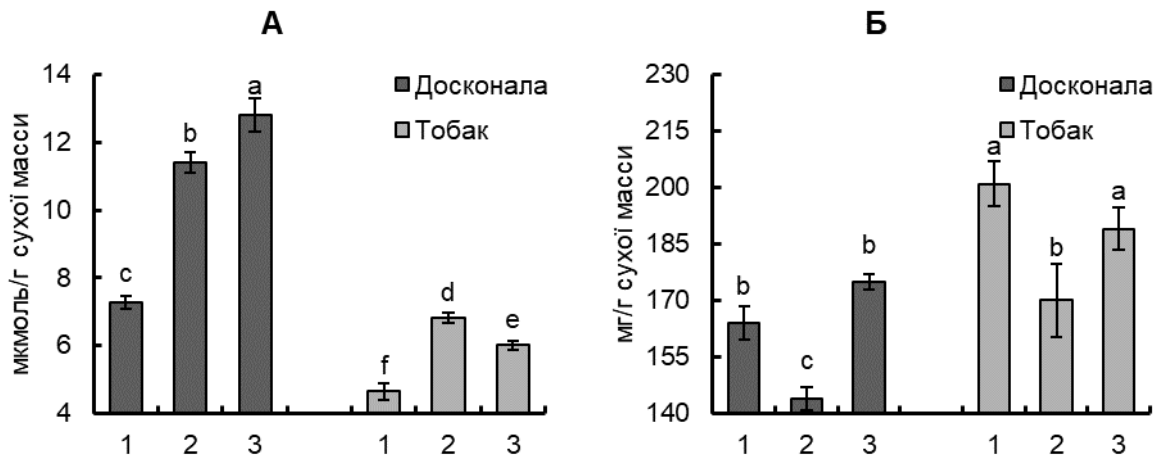


Рис. 4.8 Вміст проліну (А) та цукрів (Б) в пагонах проростків пшениці. 1 – Контроль; 2 – ПЕГ 6000 (15%); 3 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ).

В контрольному варіанті у сорту Тобак вміст ще одного компонента осмопротекторної системи – цукрів – був істотно вищим, ніж у сорту Досканала. Проте за дії осмотичного стресу, спричиненого дією ПЕГ 6000, вміст розчинних вуглеводів знижувався у проростках двох сортів пшениці, але обробка ГАМК сприяла збереженню рівня цукрів в обох випадках (рис. 4.8 Б).

За вмістом фенольних речовин та антоціанів, які можуть мати внесок як в антиоксидантний захист, так і у підтримання осмотичного тиску за умов посухи, не було виявлено значимої різниці між двома сортами за нормальних умов. Проте за впливу стресу лише у сорту Тобак зростав вміст фенолів (рис. 4.9 А), а кількість антоціанів знижувалася в обох сортів (рис. 4.9 Б).

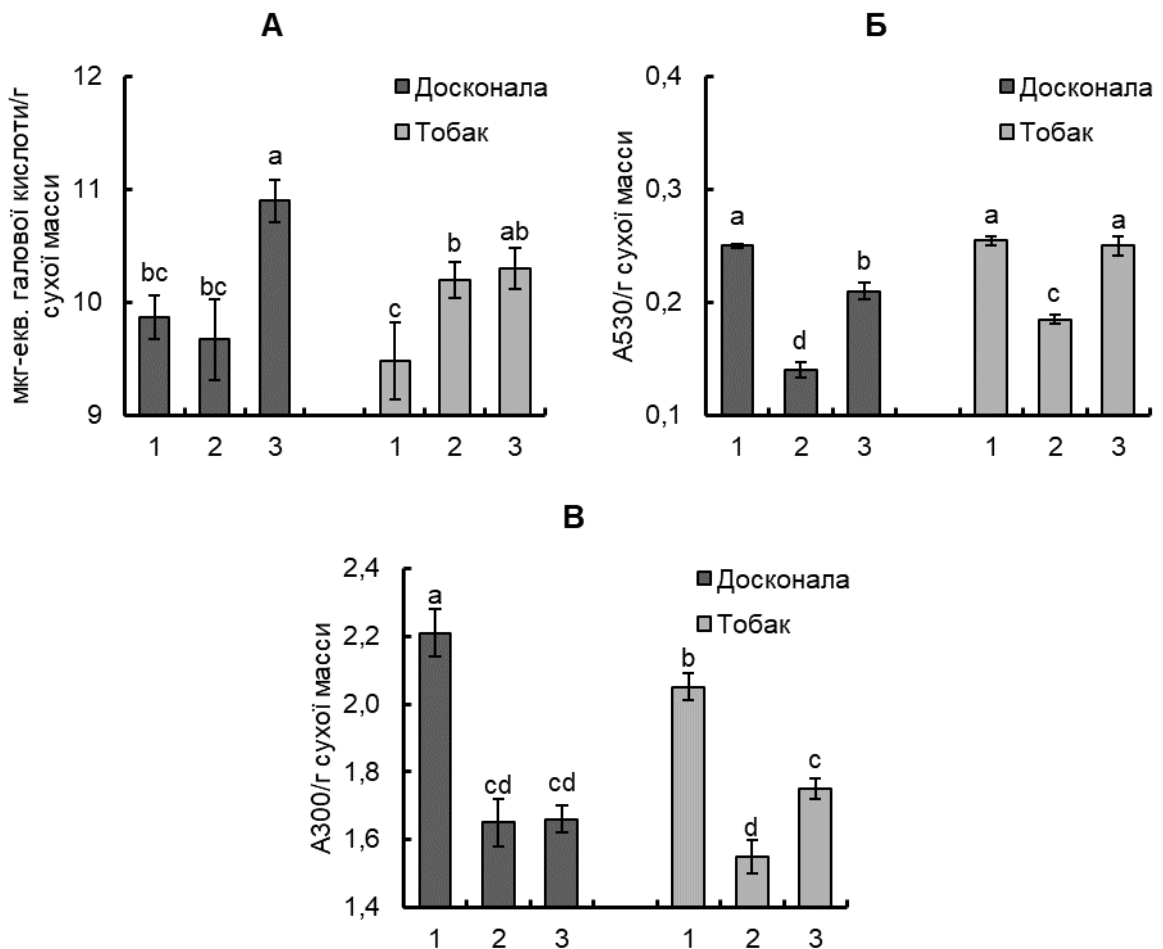


Рис. 4.9 Вміст фенольних сполук (А), антоціанів (Б) і флавоноїдів (В), поглинаючих в області УФ-В в пагонах проростків пшениці. 1 – Контроль; 2 – ПЕГ 6000 (15%); 3 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ).

Обробка ГАМК збільшувала рівень фенолів у сорті Досконала і не впливала на цей показник у сорті Тобак. У випадку з антоціанами ефект був подібний, ГАМК сприяла збереженню пулу антоціанів, при цьому у більш стійкого сорту за обробки ГАМК їх кількість зберігалася на рівні контрольного варіанта.

Вміст флавоноїдів, що поглинають в області УФ-В і також беруть участь в антиоксидантному захисті, за умов стресу зменшувався в обох сортах. Обробка ГАМК не впливала на їх кількість у чутливого до посухи сорту Досконала, але дещо пом'якшувала стресовий вплив на їх вміст у стійкішого сорту Тобак (рис. 4.9 В).

В цілому обробка ГАМК посилювала функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем проростків пшениці за умов осмотичного стресу, запобігаючи прояву окиснювальних пошкоджень (рис. 4.10).

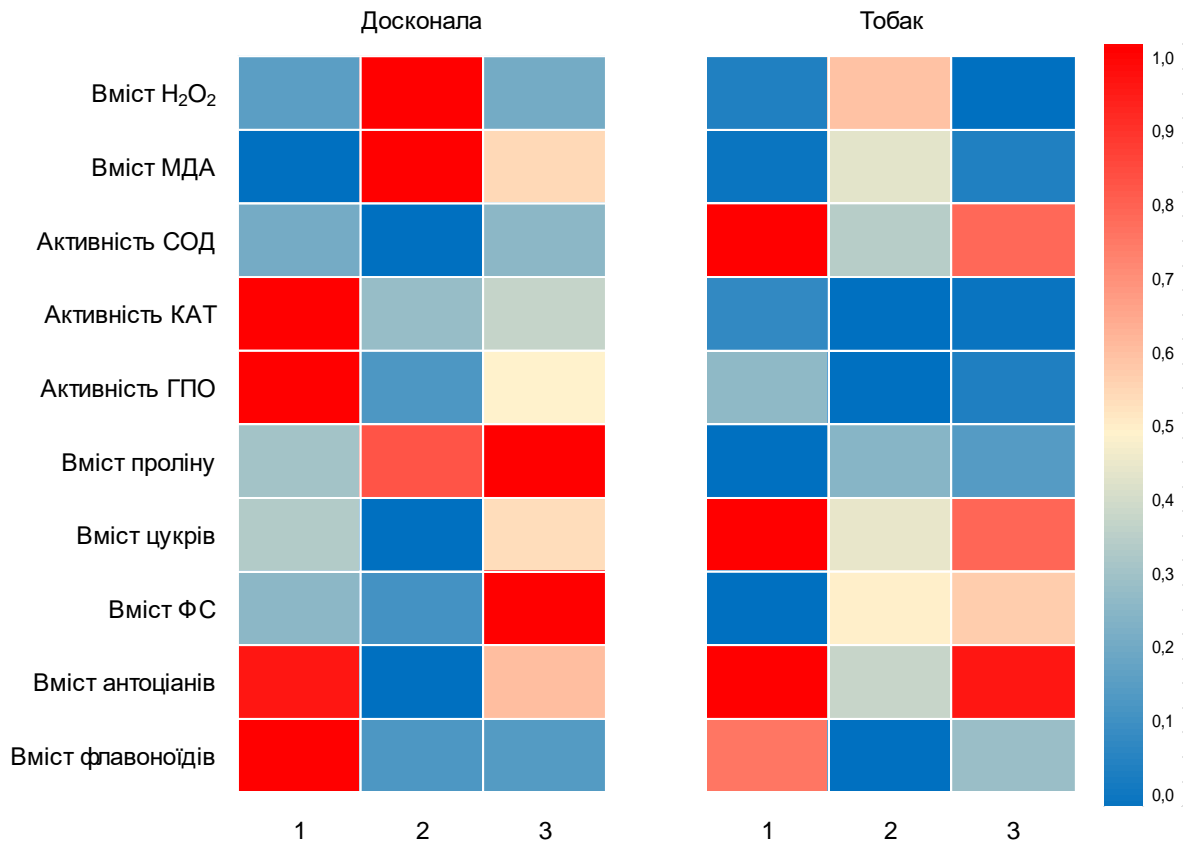


Рис. 4.10 Теплова карта змін показників стану антиоксидантної та осмопротекторної систем проростків пшениці. 1 – Контроль; 2 – ПЕГ 6000 (15%); 3 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ).

Слід зазначити, що ефекти зменшення прояву окислювального стресу під впливом ГАМК зареєстровані у рослин різних видів за несприятливих впливів різної природи. Наприклад, зниження вмісту пероксиду водню та МДА при обробці ГАМК показано у рослин машу (*Vigna radiata*) в умовах високотемпературного (Kumar et al., 2021) та сольового (Ullah et al., 2023) стресів, у кукурудзи (*Zea mays*) при стресі затоплення (Salah et al., 2019). Отримані нами результати добре узгоджуються з даними роботи Zhou та співавторів (2023), в якій показано часткове усунення дією ГАМК ефекту підвищення вмісту МДА у тканинах проростків пшениці в умовах модельної

посухи (дії ПЕГ 6000). Однією з причин зменшення прояву окиснювального стресу за впливу на проростки пшениці ГАМК є стабілізація активності антиоксидантних ферментів (рис. 4.10). Схожий ефект стабілізації обробкою ГАМК активності антиоксидантних ферментів показаний у рослин *Agrostis stolonifera* при зневодненні їх тканин (Tang et al., 2020). У *Trifolium repens* під впливом ГАМК при сольовому стресі показано посилення експресії генів та підвищення активності різних форм СОД, каталази та ферментів аскорбат-глутатіонового циклу (Cheng et al., 2018).

Очевидно, ГАМК залучається до регуляції накопичення мультифункціональних низькомолекулярних сполук зі стрес-протекторним ефектом. Так, в умовах наших експериментів під впливом ГАМК посилювалося накопичення проліну у нестійкого сорту Досконала під час осмотичного стресу (рис. 4.10). У той же час у стійкого сорту Тобак при обробці ГАМК вміст проліну на тлі стресу посухи дещо знижувався. Відомо, що підвищення вмісту проліну є реакцією рослин на досить сильні стресові дії (Nasirzadeh et al., 2021). Можливо, що при помірних стресах підвищення вмісту проліну як адаптивна реакція активується у нестійких сортів, у той же час при сильніших впливах його накопичення стає помітнішим у стійких рослин. Так, на 20-денних рослинах пшениці показано, що вміст проліну в листках найбільш посухостійкого сорту перевищував такий в інших сортів тільки за дуже сильної посухи (Nasirzadeh et al., 2021).

Вплив ГАМК на вміст проліну при стресах виявлено і в інших видів злаків. Так, обробка ГАМК рослин рису посилювала накопичення проліну при тепловому стресі (Naayyar et al., 2014). З іншого боку, у рослин цього ж виду показано зниження вмісту проліну при осмотичних стресах за їх обробки ГАМК (Sheteiwy et al., 2019; Shelp et al., 2021). Можна припустити, що вплив ГАМК на вміст проліну включає різні механізми, які можуть бути пов'язані з модуляцією під її впливом енергетичних процесів, формуванням редокс-сигналів, а також використанням частини пулу ГАМК для

метаболических процесів. Звичайно, таке припущення потребує спеціальних досліджень.

Як один із протекторних ефектів ГАМК в умовах наших експериментів можна розглядати стабілізацію вмісту розчинних вуглеводів у проростках пшениці. В обох сортів обробка ГАМК усувала зменшення пулу цукрів, спричинюване стресом (рис. 4.10). Ефекти підвищення вмісту цукрів або запобігання зменшенню їх пулу в стресових умовах під дією ГАМК зареєстровані на різних об'єктах. Так, обробка насіння конюшини білої збільшувала вміст цукрів при їх проростанні в умовах водного дефіциту (Zhou et al., 2021). При проростанні насіння рису за умов сольового стресу вміст цукрів у проростках знижувався, а обробка ГАМК сприяла збереженню їхнього пулу (Sheteiwy et al., 2019). Подібні ефекти можуть бути зумовлені позитивним впливом активації ГАМК-шунту на енергетичний метаболізм у стресових умовах (Bor, Turkan, 2019).

ГАМК, ймовірно, задіяна і в регуляції змісту ще однієї важливої групи сполук з мультифункціональною стрес-протекторною дією – фенолів та флавоноїдів. Так, під впливом ГАМК відзначалося підвищення загального вмісту фенольних сполук у стресових умовах у нестійкого сорту Досконала (рис. 4.10). При цьому в обох сортів обробка ГАМК запобігала зменшенню пулу антоціанів, спричинюваного посухою. Ймовірно, деградація пулу антоціанів при стресі пов'язана саме з виконанням ними антиоксидантних функцій (Kolupaev et al., 2020), а підтримання достатнього їх пулу в стресових умовах може бути важливим фактором забезпечення антиоксидантного захисту. У роботі Zhou та співавт. (2023) показано значне підвищення активності ключових ферментів синтезу вторинних метаболітів у 4-добових проростків пшениці при їх обробці ГАМК.

У нашій роботі досліджено вплив ГАМК на ферментативну антиоксидантну систему, а також на вміст мультифункціональних захисних сполук (проліну, цукрів, вторинних метаболітів), що поєднують антиоксидантні та осмопротекторні властивості у проростків пшениці в

умовах модельної посухи. Цілком природно, що цим не обмежується вплив ГАМК на стрес-протекторні системи пшениці. В даний час відомо, що важливою складовою захисної дії ГАМК може бути модуляція утворення білків теплового шоку з широким спектром молекулярних мас (Zeng et al., 2021), дегідринів (Zhou et al., 2021), а також вплив на експресію генів ряду транскрипційних факторів, що контролюють адаптацію до зневоднення (Zhou et al., 2021). Крім того, на ряді об'єктів показано участь ГАМК у регуляції стану проростків, що може бути дуже важливо для прояву посухостійкості (Xu et al., 2021b). Результати, отримані в нашій роботі, свідчать про те, що стрес-протекторна дія ГАМК може проявлятися на ранніх фазах розвитку і за відсутності розвинених фотосинтетичного і проросткового апаратів. Важливою складовою захисних ефектів ГАМК у молодих проростків пшениці може бути її залучення до регуляції утворення та знешкодження АФО, а також до процесів підтримання осмотичного балансу клітин.

#### **4.2.2. Функціонування стрес-протекторних систем проростків тритикале за дії ГАМК, осмотичного і сольового стресів та їх комбінації**

Як зазначалося в розділі 3, нашими дослідженнями встановлено, що обробка ГАМК пом'якшувала рістінгібуючу дію модельної посухи та сольового стресу на етіологовані проростки тритикале, але особливо помітно вона зменшувала пригнічення накопичення біомаси за комбінованої дії стрес-факторів. Також обробка ГАМК при дії стрес-факторів окремо і в комбінації підвищувала обводненість тканин проростків. Слід зауважити, що вплив ГАМК на функціонування найбільш важливих за умов посухи та сольового стресу захисних систем – осмопротекторної і антиоксидантної – у рослин тритикале до початку наших досліджень взагалі не вивчався. Разом з тим, відомо, що тритикале відрізняється від пшениці за рядом особливостей метаболізму, зокрема, здатністю активувати синтез великої кількості вторинних метаболітів у відповідь на стресові чинники (Kolupaev et al., 2022b). Зважаючи на це, вважали за доцільне оцінити видові особливості

реакції антиоксидантної та осмопротекторної систем тритикале на дію ГАМК за фізіологічно нормальних і стресових умов.

Обробка ГАМК суттєво зменшувала утворення супероксидного аніон-радикала в пагонах проростків тритикале за відсутності стресового впливу (рис. 4.11 А). В умовах модельної посухи, а особливо сольового стресу та при їх комбінації, утворення  $O_2^-$  в пагонах значно посилювалося. Однак, ГАМК знижувала їх генерацію до рівня контролю при осмотичному стресі, а також значно зменшувала при сольовому стресі. При поєднанні цих стресів вплив ГАМК на утворення супероксидного аніон-радикала був менш вираженим, проте залишався значимим ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 4.11).

Вміст гідроген пероксиду в проростках тритикале майже не змінювався при обробці ГАМК за фізіологічно нормальних умов (рис. 4.11 Б). Осмотичний стрес, спричинений дією ПЕГ 6000, збільшував вміст  $H_2O_2$  в пагонах приблизно на 43%. Ефект від впливу NaCl був менш вираженим, хоча і доволі значним ( $p \leq 0,05$ ). Особливо різке підвищення вмісту пероксиду водню (на 68% більше порівняно з контролем) спостерігалось при поєднанні посухи та сольового стресу, але обробка ГАМК значно знижувала прояви окиснювального стресу, знижуючи вміст  $H_2O_2$  майже до контрольного рівня в пагонах, що піддавалися впливу стресорів як окремо так і за їх поєднання, (рис. 4.11 Б).

Вміст кінцевого продукту ПОЛ не змінювався за обробки ГАМК, за нормальних умов (рис. 4.11 В). Посуха та сольовий стрес спричинили більш ніж дворазове збільшення вмісту МДА в тканинах пагонів, а за їх комбінованої дії цей показник окиснювального стресу зростав ще більше (рис. 4.11 В). Обробка ГАМК пом'якшувала прояв окиснювального стресу в умовах посухи, сольового стресу та їх комбінації, зменшуючи вміст МДА у пагонах тритикале.

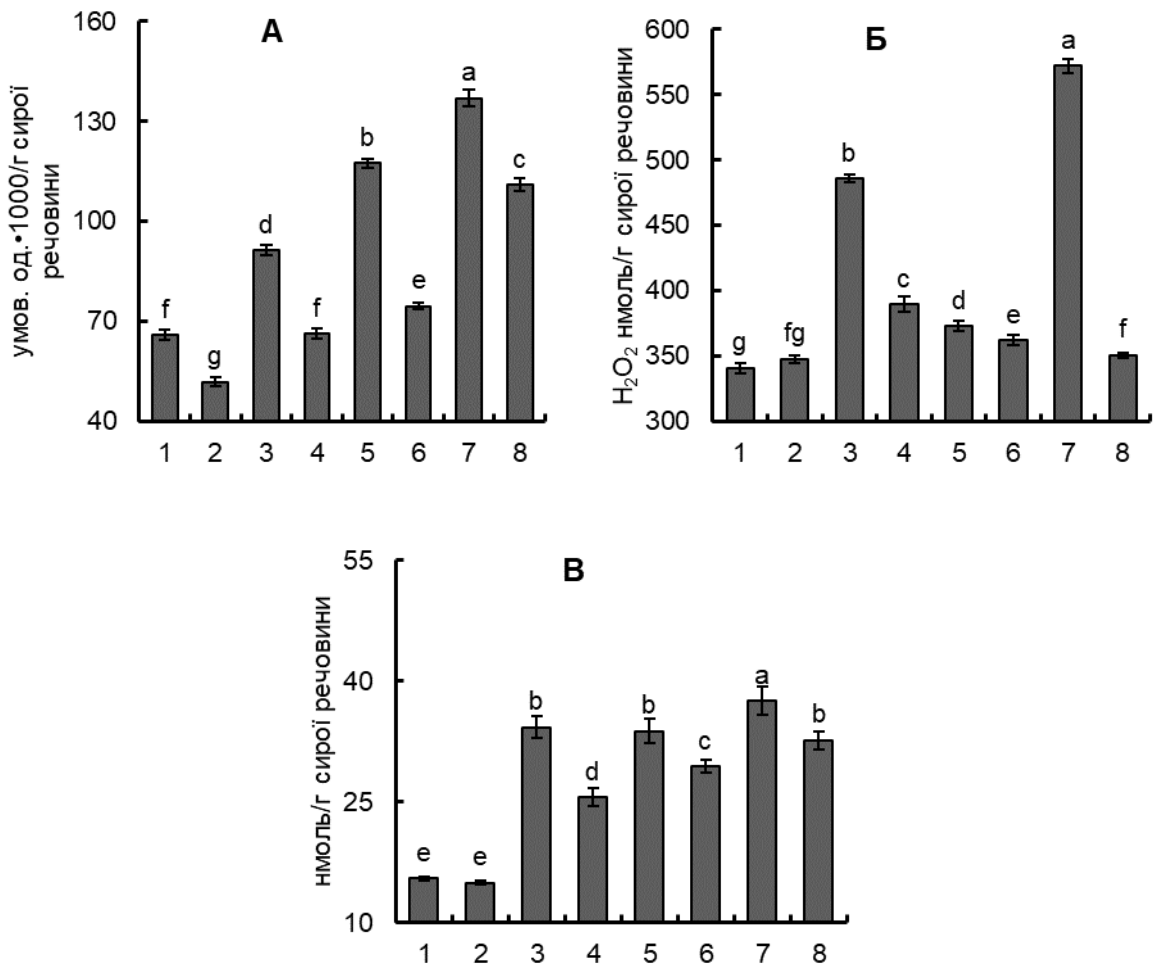


Рис. 4.11 Генерація супероксидного аніон-радикала (А), вміст гідроген пероксиду (Б) та малонового діальдегіду (В) у пагонах проростків тритикале. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (0,5 мМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ); 5 – NaCl (100 мМ); 6 – NaCl (100 мМ) + ГАМК (0,5 мМ); 7 – ПЕГ 6000 (15%) + NaCl (100 мМ); 8 – ПЕГ 6000 (15%) + NaCl (100 мМ) + ГАМК (0,5 мМ).

Обробка ГАМК за відсутності впливу стресових факторів спричиняла зростання активності СОД у пагонах (рис. 4.12 А). При осмотичному стресі активність ферменту теж зростала, але за впливу сольового стресу та у варіанті із поєднанням його з посухою значних змін в активності СОД не спостерігалось. Активність ферменту при обробці ГАМК додатково зростала як за умов посухи, так і за умов дії NaCl та поєднання двох стресових чинників (рис. 4.12 А).

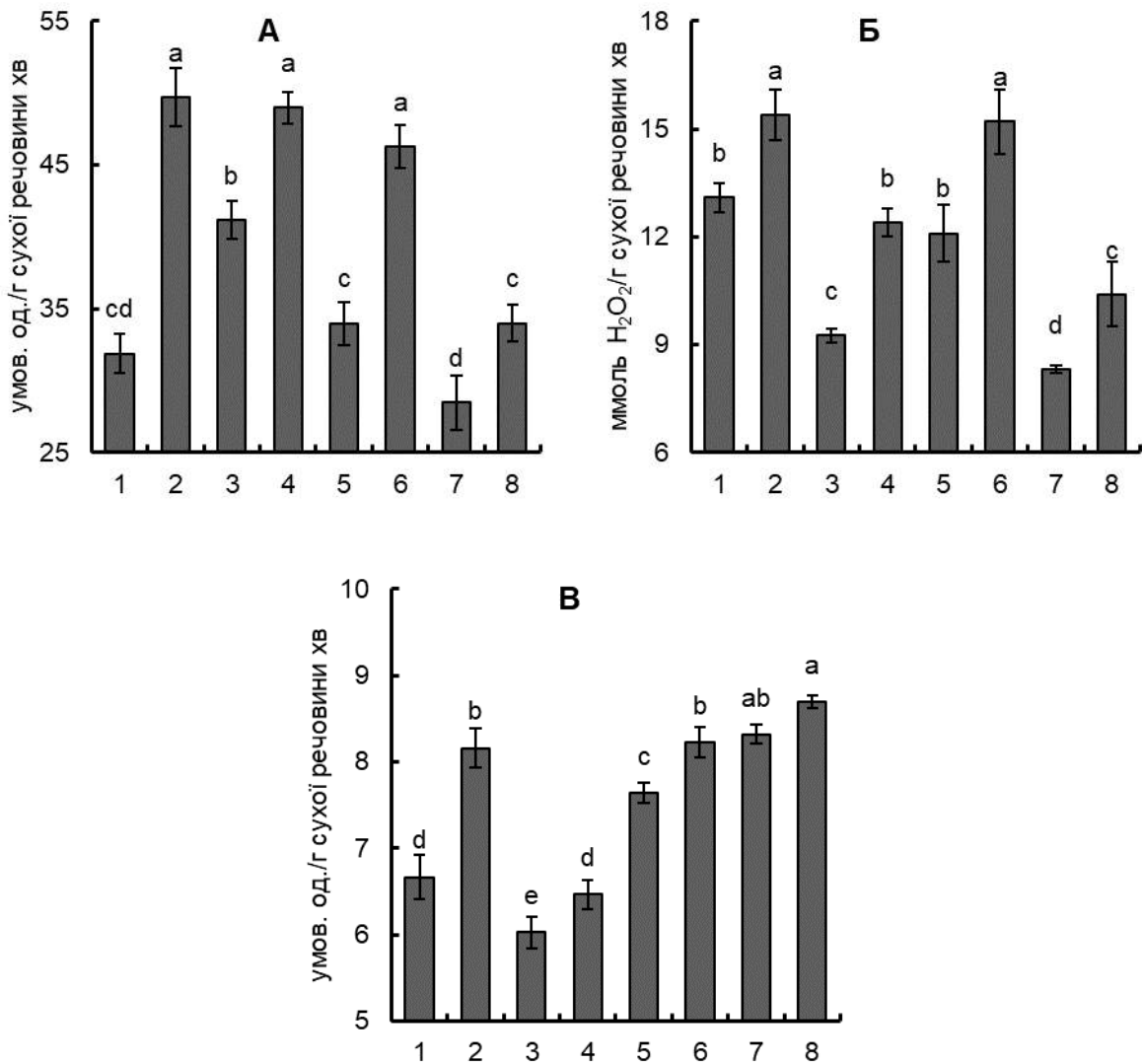


Рис. 4.12. Активність СОД (А), каталази (Б) та гваяколпероксидази (В) у пагонах проростків тритикале. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (0,5 мМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ); 5 – NaCl (100 мМ); 6 – NaCl (100 мМ) + ГАМК (0,5 мМ); ; 7 – ПЕГ 6000 (15%) + NaCl (100 мМ); 8 – ПЕГ 6000 (15%) + NaCl (100 мМ) + ГАМК (0,5 мМ).

Активність каталази у пагонах у фізіологічно нормальних умовах за обробки ГАМК підвищувалася. Сольовий стрес майже не впливав на цей показник, проте ефект від посухи був протилежним, активність ферменту знижувалася (рис. 4.12 Б). ГАМК запобігала зниженню активності каталази при осмотичному стресі. За умов сольового стресу активність ферменту була підвищеною у пагонах проростків, оброблених ГАМК (рис. 4.12 Б). Також

обробка ГАМК істотно пом'якшувала пригнічення активності каталази, спричинене комбінованою дією модельної посухи та сольового стресу.

За відсутності впливу стресових факторів обробка тритикале ГАМК спричиняла також істотне підвищення активності гваяколпероксидази (рис. 4.12 В). Посуха дещо знижувала активність ферменту, тоді як сольовий стрес та комбінація двох стресових чинників спричиняли суттєве підвищення активності гваяколпероксидази. В умовах посухи ГАМК викликала підвищення активності цього ферменту до рівня контрольного варіанта (рис. 4.12 В). В умовах сольового стресу за обробки ГАМК активність гваяколпероксидази також підвищувалася. Водночас за дії комбінованого стресу відзначалася лише тенденція до підвищення активності ферменту у варіанті з обробкою ГАМК.

За відсутності стресових чинників обробка проростків тритикале ГАМК призвела до збільшення вмісту проліну на 28% порівняно з контролем (рис. 4.13 А). За умов посухи та сольового стресу вміст проліну в пагонах зростав у 2,62 та 2,47 рази відповідно. За комбінованого впливу посухи та сольового стресу спостерігалось ще більш виражене (у 2,75 рази) підвищення вмісту проліну в пагонах (рис. 4.13 А). ГАМК також підвищувала вміст проліну за умов посухи та сольового стресу. Однак за комбінованої дії двох стресових факторів цей ефект був незначним (рис. 4.13 А).

Обробка ГАМК підвищувала загальний вміст розчинних вуглеводів у пагонах тритикале майже на 20% за нормальних умов (рис. 4.13 Б). При осмотичному стресі спостерігалася тенденція до зниження вмісту цукрів (різниця була статистично незначущою:  $p > 0,05$ ). Водночас за сольового стресу вміст цукрів у пагонах зростав, хоча різниця порівняно з контролем була відносно невеликою. Комбінована дія двох стресів знижувала рівень цукрів у пагонах порівняно з контрольним варіантом. Застосування ГАМК за умов стресу підвищувало вміст розчинних вуглеводів у тканинах пагонів різною мірою (рис. 4.13 Б). Найбільш виражений ефект ГАМК спостерігався за сольового стресу: вміст цукрів був у півтора рази вищим від контролю.

Водночас при комбінованій дії посухи та сольового стресу ГАМК лише стабілізувала вміст цукрів до рівня контролю.

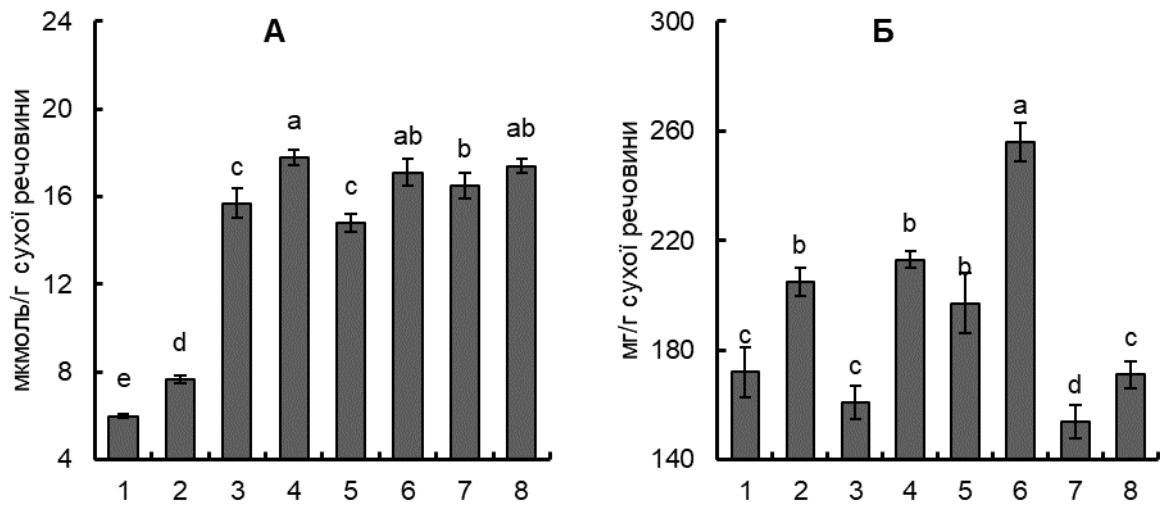


Рис. 4.13 Вміст проліну (А) та цукрів (Б) у пагонах проростків тритикале. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (0,5 мМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ); 5 – NaCl (100 мМ); 6 – NaCl (100 мМ) + ГАМК (0,5 мМ); ; 7 – ПЕГ 6000 (15%) + NaCl (100 мМ); 8 – ПЕГ 6000 (15%) + NaCl (100 мМ) + ГАМК (0,5 мМ).

За відсутності впливу стресорів ГАМК підвищувала загальний вміст фенольних сполук приблизно на 30% (рис. 4.14 А). Посуха та комбінований стрес не спричиняли достовірних змін у вмісті фенольних сполук, однак за дії лише сольового стресу цей показник зростав приблизно на 20% порівняно з контролем. Обробка ГАМК за дії кожного зі стресів окремо та за їх поєднання призводила до підвищення вмісту фенольних сполук у пагонах тритикале в 1,4–1,6 раза порівняно з контрольною групою (рис. 4.14 А).

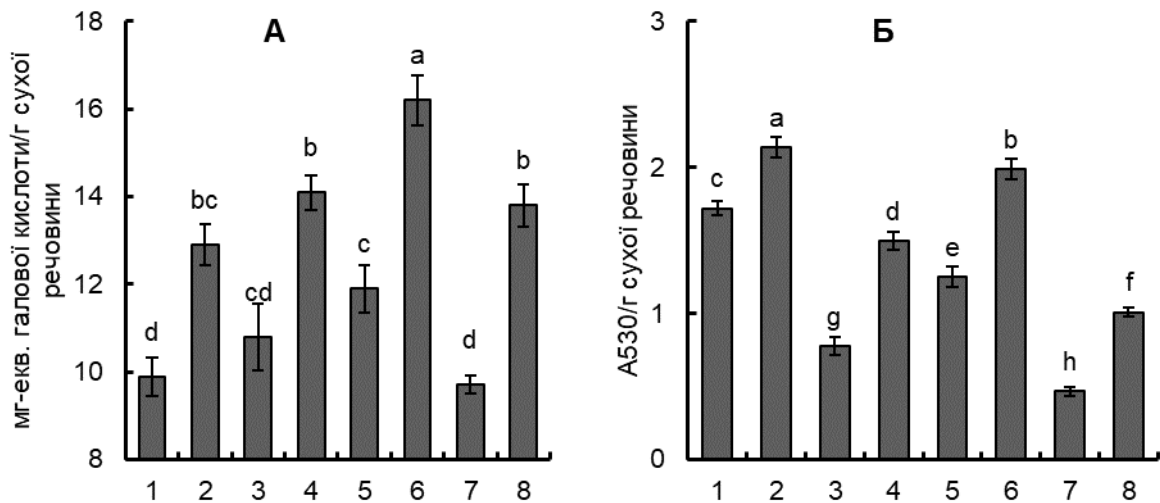


Рис. 4.14 Вміст фенольних сполук (А) та антоціанів (Б) у пагонах проростків тритикале. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (0,5 мМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ); 5 – NaCl (100 мМ); 6 – NaCl (100 мМ) + ГАМК (0,5 мМ); ; 7 – ПЕГ 6000 (15%) + NaCl (100 мМ); 8 – ПЕГ 6000 (15%) + NaCl (100 мМ) + ГАМК (0,5 мМ).

За фізіологічно нормальних умов обробка проростків ГАМК призводила до збільшення вмісту антоціанів майже на 25% (рис. 4.14 Б). Посуха спричинила більш ніж дворазове зниження вмісту антоціанів. Сольовий стрес мав подібний, але менш виражений ефект. Одночасний вплив посухи та засолення спричинив найбільше зменшення вмісту антоціанів: їх кількість знижувалася на 73% (рис. 4.14 Б). В умовах посухи обробка ГАМК пом'якшувала зниження вмісту антоціанів, підтримуючи цей показник майже на рівні контролю (рис. 4.14 Б). За сольового стресу ГАМК значно підвищувала вміст антоціанів; у цьому варіанті їхня кількість значно перевищувала контрольне значення. При комбінованій дії двох стресових факторів ГАМК також стабілізувала вміст антоціанів; він був майже вдвічі вищим, ніж у варіантах зі стресовим впливом без застосування ГАМК, хоча залишався нижчим, ніж з контролі (рис. 4.14 Б).

Таким чином, отримані результати свідчать, що обробка проростків тритикале ГАМК підвищувала їх стійкість до осмотичного та сольового стресів, а також їх комбінованої дії. Зафіксовано посилене накопичення

одного з найважливіших поліфункціональних осмолітів — проліну, у проростках тритикале як за відсутності, так і за дії стресових чинників (рис. 4.15).

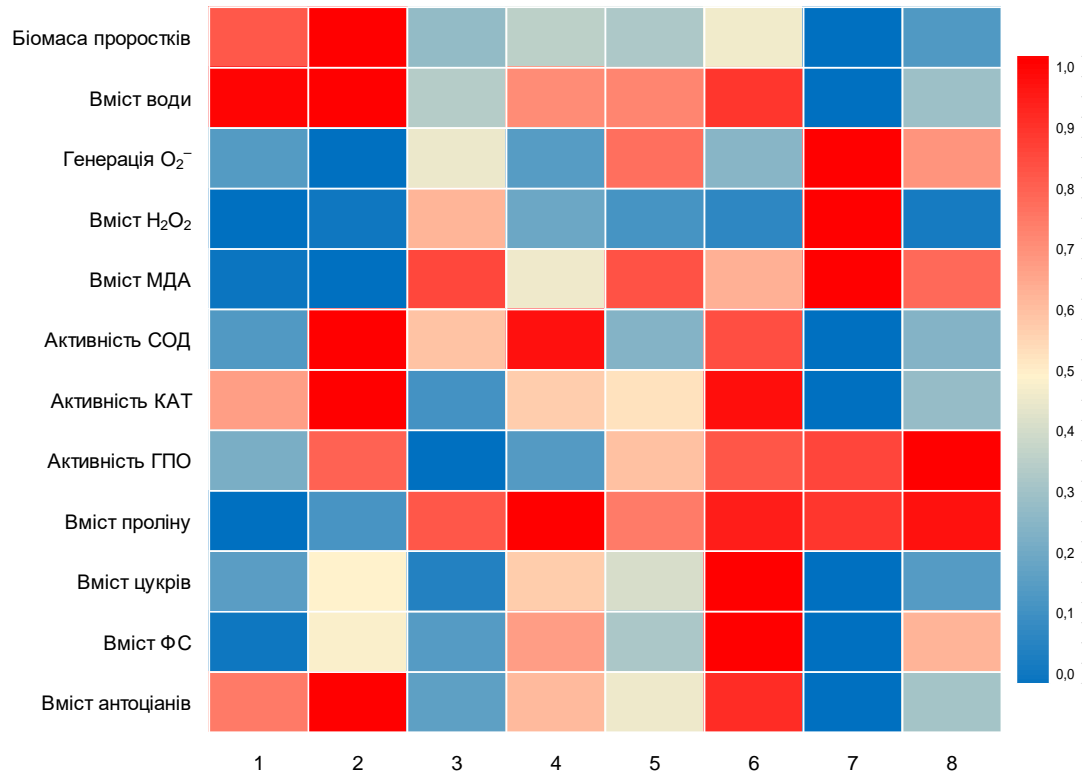


Рис. 4.15 Теплова карта змін показників стану антиоксидантної та осмопротекторної систем проростків тритикале. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (0,5 мМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ); 5 – NaCl (100 мМ); 6 – NaCl (100 мМ) + ГАМК (0,5 мМ); ; 7 – ПЕГ 6000 (15%) + NaCl (100 мМ); 8 – ПЕГ 6000 (15%) + NaCl (100 мМ) + ГАМК (0,5 мМ).

Посилене накопичення розчинних вуглеводів під впливом ГАМК, ймовірно, є ще одним компонентом регуляції осмотичних властивостей клітин. Обробка ГАМК підвищувала загальний вміст цукрів у пагонах тритикале за нормальних умов, а також за умов посухи та сольового стресу (рис. 4.15).

Обробка ГАМК суттєво зменшувала підвищене посухою, засоленням та їх поєднанням утворення супероксидного аніон-радикала проростками, а також стрес-індуковане накопичення гідроген пероксиду та МДА (рис. 4.15).

Таким чином, можна однозначно стверджувати, що запобігання розвитку окиснювального ушкодження проростків тритикале є складовою захисного ефекту ГАМК за осмотичного стресу. Як зазначалося, ми спостерігли подібний вплив ГАМК на етіольовані проростки пшениці за умов осмотичного стресу (див. п. 4.2.1).

Також ГАМК підвищувала активність ключових антиоксидантних ферментів — СОД, каталази і гваяколпероксидази, навіть у проростках, які не зазнавали впливу стресових чинників (рис. 4.15). За стресових умов активність СОД і каталази у проростків, оброблених ГАМК, також була вищою, ніж у необроблених, у всіх випадках.

Активация вторинного метаболізму за дії ГАМК може бути ще одним важливим компонентом стрес-протекторного ефекту цієї сполуки. Як уже зазначалося, тритикале істотно перевершує пшеницю за базовим вмістом вторинних метаболітів, зокрема антоціанів (Kolupaev et al., 2022b). Через це тритикале вважають доволі зручним модельним видом для вивчення впливу ГАМК на основні характеристики синтезу вторинних метаболітів. Обробка ГАМК за відсутності стресів достовірно підвищувала загальний вміст фенольних сполук та антоціанів (рис. 4.15). При поєднанні дії двох стресових чинників, які суттєво гальмували ріст, вміст фенольних речовин у проростків не підвищувався, проте обробка ГАМК у цьому експерименті спричинила майже 1,5-кратне збільшення фенольних сполук. Стресові фактори, а особливо їх поєднання, значно знижували вміст антоціанів, які, ймовірно, окислювалися під час розвитку оксидативного стресу, спричиненого посухою та засоленням. Обробка ГАМК також усувала або пом'якшувала негативні наслідки від цих стресорів (рис. 4.15).

Таким чином, протекторна дія ГАМК виявлялася у підвищенні активності антиоксидантних ферментів у фізіологічно нормальних та стресових умовах, посиленні накопичення проліну, стабілізації пулу цукрів та помітному збільшенні вмісту фенольних сполук і антоціанів. Активация за дії ГАМК широкого спектра адаптивних реакцій у проростків тритикале при

осмотичному та сольовому стресах, і особливо при їх поєднанні, вказує на ймовірну системну дію ГАМК як молекули, яка залучається до функціонування сигнальної мережі рослинних клітин.

#### **4.3. Порівняльне дослідження впливу праймінгу зернівок і фоліарної обробки рослин пшениці ГАМК на функціонування протекторних систем за умов ґрунтової посухи**

Стрес-протекторна дія ГАМК на рослини пшениці зареєстрована у нашій роботі та ряді інших досліджень. Так, показано, що фоліарна обробка ГАМК зменшувала викликані сольовим стресом окиснювальні ушкодження та активувала експресію генів дегідринів (Badr et al., 2024). Однак вплив праймінгу насіння ГАМК як можливого прийому, що індукує стійкість рослин пшениці до стресів, котрі спричиняють зневоднення, вивчався лише в поодиноких дослідженнях. У роботі Zhao та співавт. (2023) показано, що праймінг насіння ГАМК шляхом її розпилення підвищував стійкість проростків пшениці до посухи, що супроводжувалося активацією вторинного метаболізму. У недавньому дослідженні Al Ghafri та співавторів (2025) показано, що праймінг насіння пшениці в розчині ГАМК у низькій концентрації (1 мкМ) підвищував енергію проростання насіння та біомасу проростків в умовах посухи, а також сприяв збільшенню вмісту фенольних сполук, проліну та активності антиоксидантних ферментів. Однак у даній роботі використовувалося тривале (18 год) замочування насіння, ефекти порівнювали не з гідропраймінгом, а з проростанням сухого насіння. Це не дозволяє однозначно пов'язувати підвищення посухостійкості з дією ГАМК, оскільки гідропраймінг насіння, особливо при тривалій експозиції, сам по собі підвищує енергію його проростання у стресових та нормальних умовах (Tao et al., 2018; Liu et al., 2022). Водночас дотепер відсутні роботи, в яких би порівнювався вплив праймінгу насіння та фоліарної обробки ГАМК на посухостійкість рослин пшениці, в тому числі в умовах, наближених до природних.

У зв'язку з викладеним ми проводили порівняльне дослідження стрес-протекторних ефектів ГАМК на рослини пшениці в умовах ґрунтової посухи при її застосуванні шляхом праймінгу насіння перед посівом та фоліарної обробки рослин безпосередньо перед посухою.

При вирощуванні рослин в оптимальних умовах гідропраймінг насіння не впливав на висоту надземної частини рослин (рис. 4.16).

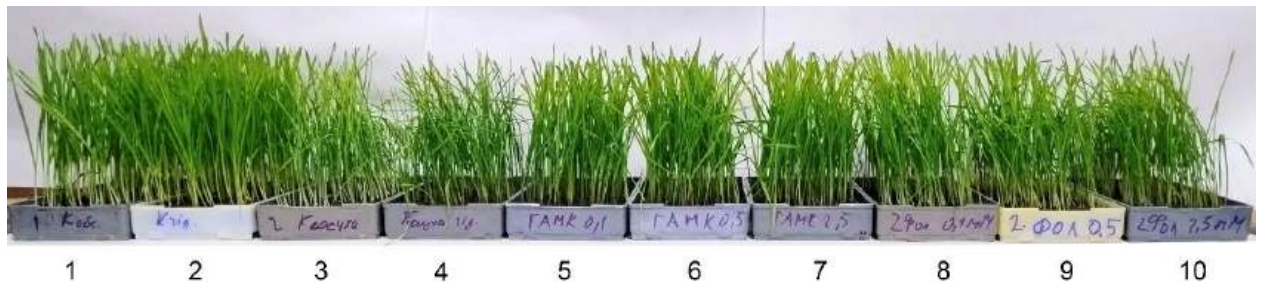


Рис 4.16 Фенотип рослин пшениці після 6-денної посухи. 1 – Контроль (нормальний полив); 2 – Гідропраймінг (нормальний полив); 3 – Контроль (посуха); 4 – Гідропраймінг (посуха); 5 – Праймінг ГАМК (0,1 мМ) (посуха); 6 – Праймінг ГАМК (0,5 мМ) (посуха); 7 – Праймінг ГАМК (2,5 мМ) (посуха); 8 – Фоліарна обробка ГАМК (0,1 мМ) (посуха); 9 – Фоліарна обробка ГАМК (0,5 мМ) (посуха); 10 – Фоліарна обробка ГАМК (2,5 мМ) (посуха).

Посуха істотно пригнічувала лінійний ріст, також за її впливу візуально спостерігалось зменшення розміру листкових пластинок (рис. 4.16). Гідропраймінг несуттєво збільшував показник висоти рослин за умов посухи. У той же час праймінг насіння ГАМК у концентрації 0,5 мМ спричиняв значне збільшення висоти рослин після впливу посухи, дія двох інших концентрацій на ріст рослин під час посухи була менш помітною і за величинами істотно не відрізнялася від впливу гідропраймінгу (рис. 4.16). Вплив фоліарної обробки на висоту рослин в умовах посухи був дуже схожим на ефекти праймінгу: істотний позитивний ефект був помітний у варіанті з обробкою 0,5 мМ ГАМК. Також слід відзначити візуальне збільшення розмірів листя в умовах посухи у варіантах як з праймінгом

насіння, так і з фоліарною обробкою рослин ГАМК у всіх трьох використовуваних концентраціях (рис. 4.16).

Посуха спричиняла майже дворазове зниження сирої біомаси надземної частини рослин (рис. 4.17 Б). Гідропраймінг істотно не впливав на цей показник ні в оптимальних умовах, ні під час посухи. Однак праймінг насіння ГАМК пом'якшував спричинене посухою пригнічення накопичення сирої маси. Найбільший позитивний ефект спостерігали при використанні концентрації 0,5 мМ, концентрація 2,5 мМ також викликала збільшення біомаси надземної частини рослин, а концентрація 0,1 мМ призводила лише до тенденції до підвищення цього показника за умов посухи (рис. 4.17 Б). Фоліарна обробка ГАМК у всіх трьох використовуваних концентраціях викликала збільшення накопичення сирої біомаси рослин під час посухи. Найбільший ефект спостерігали за концентрації 0,5 мМ. Однак порівняння праймінгу насіння і фоліарної обробки пшениці розчинами ГАМК в найбільш ефективній концентрації (0,5 мМ) показало, що вплив праймінгу був більш суттєвим ( $p \leq 0,05$ ).

Вплив посухи на накопичення сухої біомаси надземної частини рослин пшениці був не таким вираженим, як її вплив на сиру біомасу, але також значним (рис. 4.17 Б). Гідропраймінг насіння не впливав на накопичення рослинами сухої речовини як у звичайних умовах, так і під час посухи. У той же час праймінг 0,5 мМ ГАМК істотно зменшував пригнічення накопичення сухої речовини рослинами в умовах посухи, застосування двох інших концентрацій ГАМК не викликало помітних ефектів. За фоліарної обробки спостерігали практично такий же результат (рис. 4.17 В).

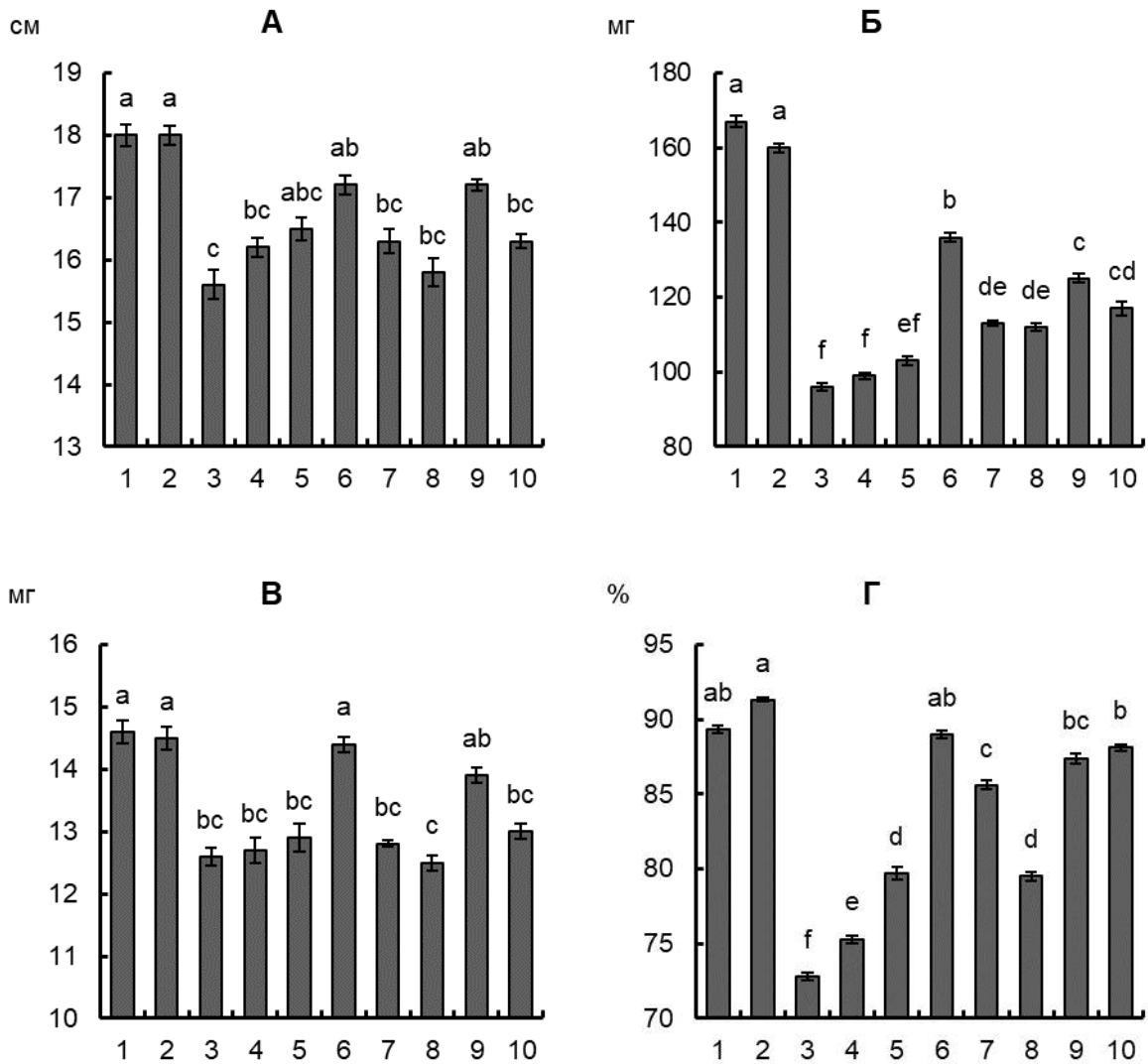


Рис. 4.17 Висота (А), сира (Б) і суха (В) маса надземної частини рослин та відносний вміст води (Г) в листках після 6-денної посухи. 1 – Контроль (нормальний полив); 2 – Гідропраймінг (нормальний полив); 3 – Контроль (посуха); 4 – Гідропраймінг (посуха); 5 – Праймінг ГАМК (0,1 мМ) (посуха); 6 – Праймінг ГАМК (0,5 мМ) (посуха); 7 – Праймінг ГАМК (2,5 мМ) (посуха); 8 – Фоліарна обробка ГАМК (0,1 мМ) (посуха); 9 – Фоліарна обробка ГАМК (0,5 мМ) (посуха); 10 – Фоліарна обробка ГАМК (2,5 мМ) (посуха).

Відносний вміст води (ВВВ) підвищувався у варіанті з гідропраймінгом за оптимальних умов вирощування рослин, проте цей ефект не був значущим при  $p \leq 0,05$  (рис. 4.17 Г). Показник відносного вмісту води в листках рослин під впливом посухи знижувався майже на 20%, гідропраймінг помітно підвищував цей показник (рис. 4.17 Г). Праймінг ГАМК в усіх досліджуваних концентраціях викликав підвищення ВВВ в листах за умов посухи, найбільший позитивний ефект спостерігали при концентрації 0,5 мМ. Фоліарна обробка ГАМК у концентраціях 0,1–2,5 мМ також підвищувала ВВВ у листках під час посухи, при цьому найбільш ефективними виявилися концентрації 0,5 і 2,5 мМ (рис. 4.17 Г).

При вирощуванні рослин в оптимальних умовах гідропраймінг не впливав на вміст хлорофілу *a*, хоча викликав тенденцію до невеликого підвищення вмісту хлорофілу *b* і сумарного вмісту хлорофілів, проте такі ефекти не були значущими при  $p \leq 0,05$ . Натомість у рослинах, вирощених з насіння, яке піддавалося гідропраймінгу, вміст каротиноїдів за відсутності стресового впливу дещо знижувався.

Посуха спричиняла істотне зниження вмісту всіх фотосинтетичних пігментів. При цьому гідропраймінг сприяв збереженню вмісту хлорофілу і каротиноїдів (рис. 4.18). Більш істотний у порівнянні з гідропраймінгом позитивний вплив на вміст хлорофілів мав праймінг насіння ГАМК у всіх трьох використовуваних концентраціях. При цьому ефект фоліарної обробки рослин ГАМК на вміст хлорофілів за посухи мав чітко виражений максимум при концентрації 0,5 мМ (рис. 4.18). Вплив праймінгу насіння і фоліарної обробки рослин розчинами ГАМК на вміст каротиноїдів в листах за умов посухи був невеликим. Ефект, що перевищує дію гідропраймінгу, спостерігали тільки при обробці насіння ГАМК в концентрації 0,1 мМ.

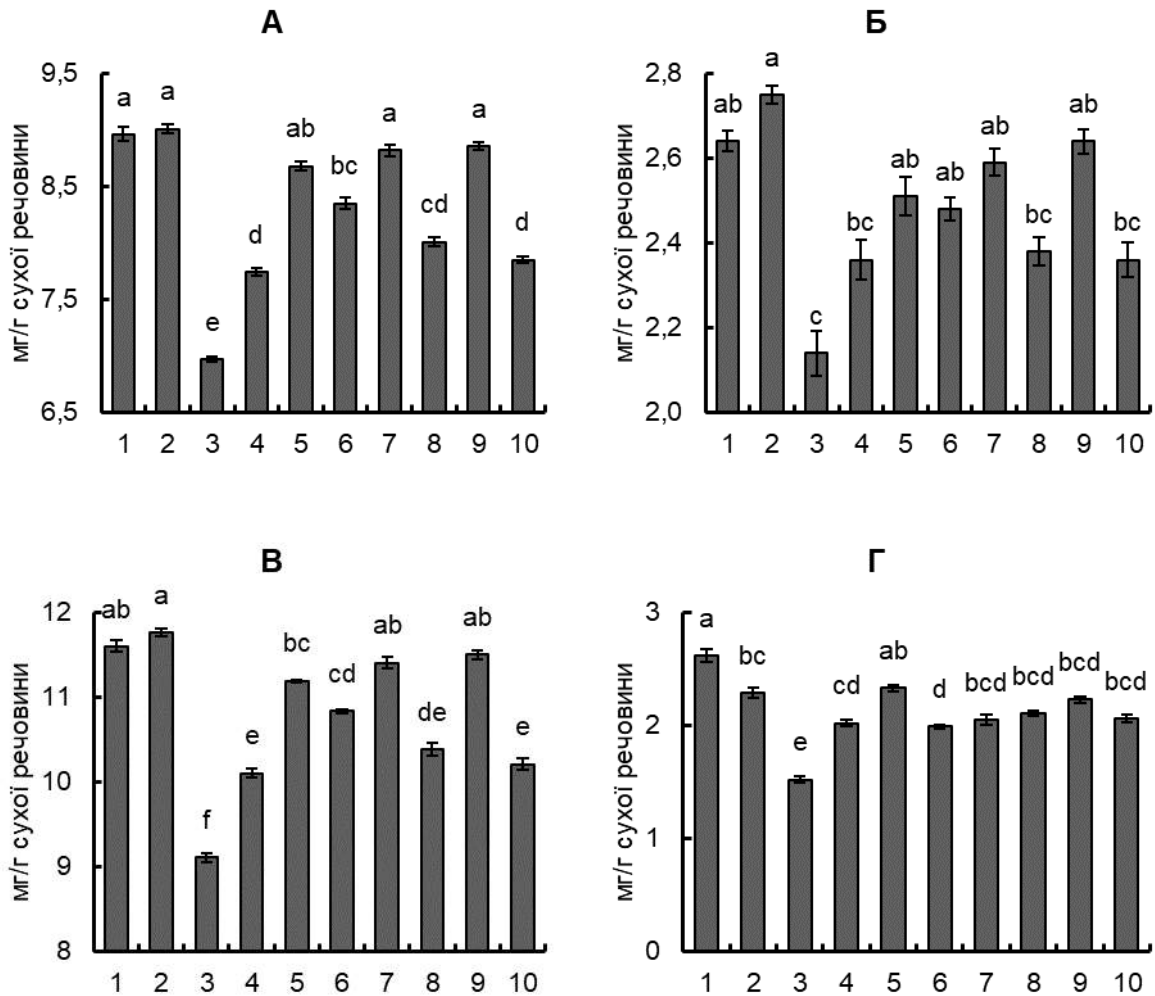


Рис 4.18 Вміст хлорофілу *a* (А), хлорофілу *b* (Б), загальний вміст хлорофілу (В) та вміст каротиноїдів (Г) в листках після 6-денної посухи. 1 – Контроль (нормальний полив); 2 – Гідропраймінг (нормальний полив); 3 – Контроль (посуха); 4 – Гідропраймінг (посуха); 5 – Праймінг ГАМК (0,1 мМ) (посуха); 6 – Праймінг ГАМК (0,5 мМ) (посуха); 7 – Праймінг ГАМК (2,5 мМ) (посуха); 8 – Фоліарна обробка ГАМК (0,1 мМ) (посуха); 9 – Фоліарна обробка ГАМК (0,5 мМ) (посуха); 10 – Фоліарна обробка ГАМК (2,5 мМ) (посуха).

Активність СОД підвищувалася у варіанті з гідропраймінгом при вирощуванні рослин в оптимальних умовах. Під впливом посухи активність ферменту знижувалася, а гідропраймінг насіння нівелював цей ефект. При праймінгу насіння ГАМК в концентрації 0,5 мМ активність ферменту в листках була вищою, ніж у варіанті з гідропраймінгом. При фоліарній обробці рослин ГАМК в концентрації 0,5 мМ в умовах посухи також зафіксовано найвищі значення активності СОД, а за фоліарної обробки ГАМК в двох інших концентраціях (0,1 і 2,5 мМ) активність СОД за впливу посухи підвищувалась в порівнянні з необробленими рослинами (рис. 4.19 А).

Активність каталази в листах за звичайних умов вирощування при гідропраймінгу істотно не змінювалася. Стресовий вплив призводив до зниження активності ферменту, а гідропраймінг насіння пом'якшував такий ефект (рис. 4.19 Б). Праймінг насіння ГАМК в концентрації 0,5 мМ стабілізував активність каталази в умовах посухи. Обробка насіння ГАМК в інших концентраціях (0,1 і 2,5 мМ) і фоліарна обробка рослин ГАМК у всьому діапазоні концентрацій також сприяла деякому підвищенню активності каталази за дії посухи, проте ефекти таких обробок лише незначно перевищували позитивний вплив гідропраймінгу на активність ферменту в умовах посухи (рис. 4.19 Б).

Активність гваяколпероксидази в листках за впливу гідропраймінгу не змінювалася в оптимальних умовах. Посуха спричиняла зниження активності ферменту, а гідропраймінг насіння незначно її збільшував (рис. 4.19 В). Праймінг насіння ГАМК у концентраціях 0,5 і 2,5 мМ та фоліарна обробка рослин її розчинами у всьому діапазоні концентрацій сприяли підвищенню активності ферменту майже до рівня безстресового контролю.

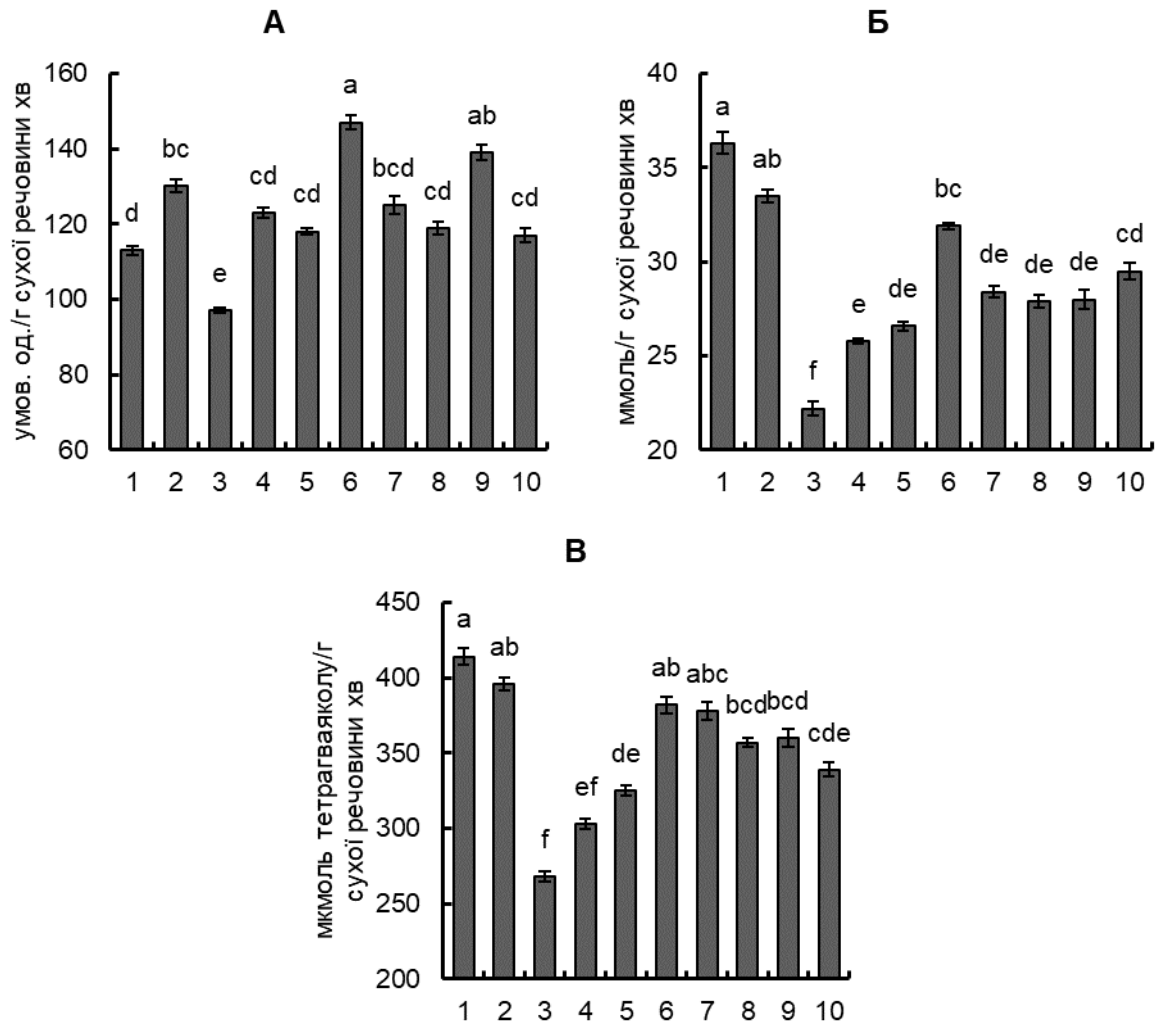


Рис 4.19 Активність СОД (А), каталази (Б) і гваяколпероксидази (В) в листках після 6-денної посухи. 1 – Контроль (нормальний полив); 2 – Гідропраймінг (нормальний полив); 3 – Контроль (посуха); 4 – Гідропраймінг (посуха); 5 – Праймінг ГАМК (0,1 мМ) (посуха); 6 – Праймінг ГАМК (0,5 мМ) (посуха); 7 – Праймінг ГАМК (2,5 мМ) (посуха); 8 – Фоліарна обробка ГАМК (0,1 мМ) (посуха); 9 – Фоліарна обробка ГАМК (0,5 мМ) (посуха); 10 – Фоліарна обробка ГАМК (2,5 мМ) (посуха).

Вміст продуктів ПОЛ у листках (переважно малонового діальдегіду) не змінювався при гідропраймінгу за оптимальних умов вирощування рослин (рис. 4.20). Посуха викликала півторарадове підвищення кількості МДА в листках. Гідропраймінг насіння не впливав на цей показник за дії посухи. У той же час праймінг насіння ГАМК в концентраціях 0,5 і 2,5 мМ знижував

вміст маленового діальдегіду в листках за впливу посухи майже до рівня контролю (рис. 4.20). Фоліарна обробка ГАМК також запобігала спричинюваному посухою накопиченню МДА в листках.

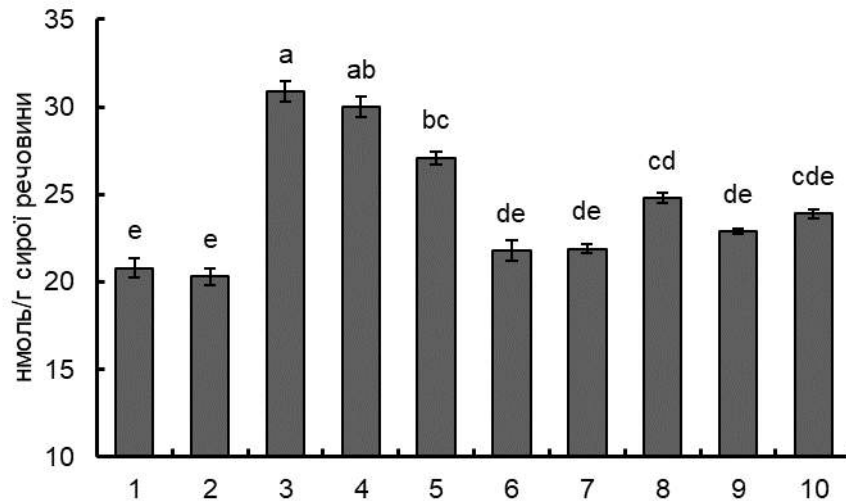


Рис 4.20. Вміст МДА в листках після 6-денної посухи. 1 – Контроль (нормальний полив); 2 – Гідропраймінг (нормальний полив); 3 – Контроль (посуха); 4 – Гідропраймінг (посуха); 5 – Праймінг ГАМК (0,1 мМ) (посуха); 6 – Праймінг ГАМК (0,5 мМ) (посуха); 7 – Праймінг ГАМК (2,5 мМ) (посуха); 8 – Фоліарна обробка ГАМК (0,1 мМ) (посуха); 9 – Фоліарна обробка ГАМК (0,5 мМ) (посуха); 10 – Фоліарна обробка ГАМК (2,5 мМ) (посуха).

Гідропраймінг насіння майже не впливав на вміст розчинних вуглеводів у листках за відсутності стресових впливів. Стресовий вплив посухи викликав істотне зниження вмісту цукрів у листках. Гідропраймінг насіння викликав тенденцію до стабілізації цього показника в умовах посухи, а праймінг ГАМК в концентраціях 0,5 і 2,5 мМ спричиняв підвищення вмісту цукрів у листках рослин, що зазнали посухи (рис. 4.21 А). Фоліарна обробка рослин розчинами ГАМК в таких же концентраціях також сприяла стабілізації пулу розчинних вуглеводів за посухи.

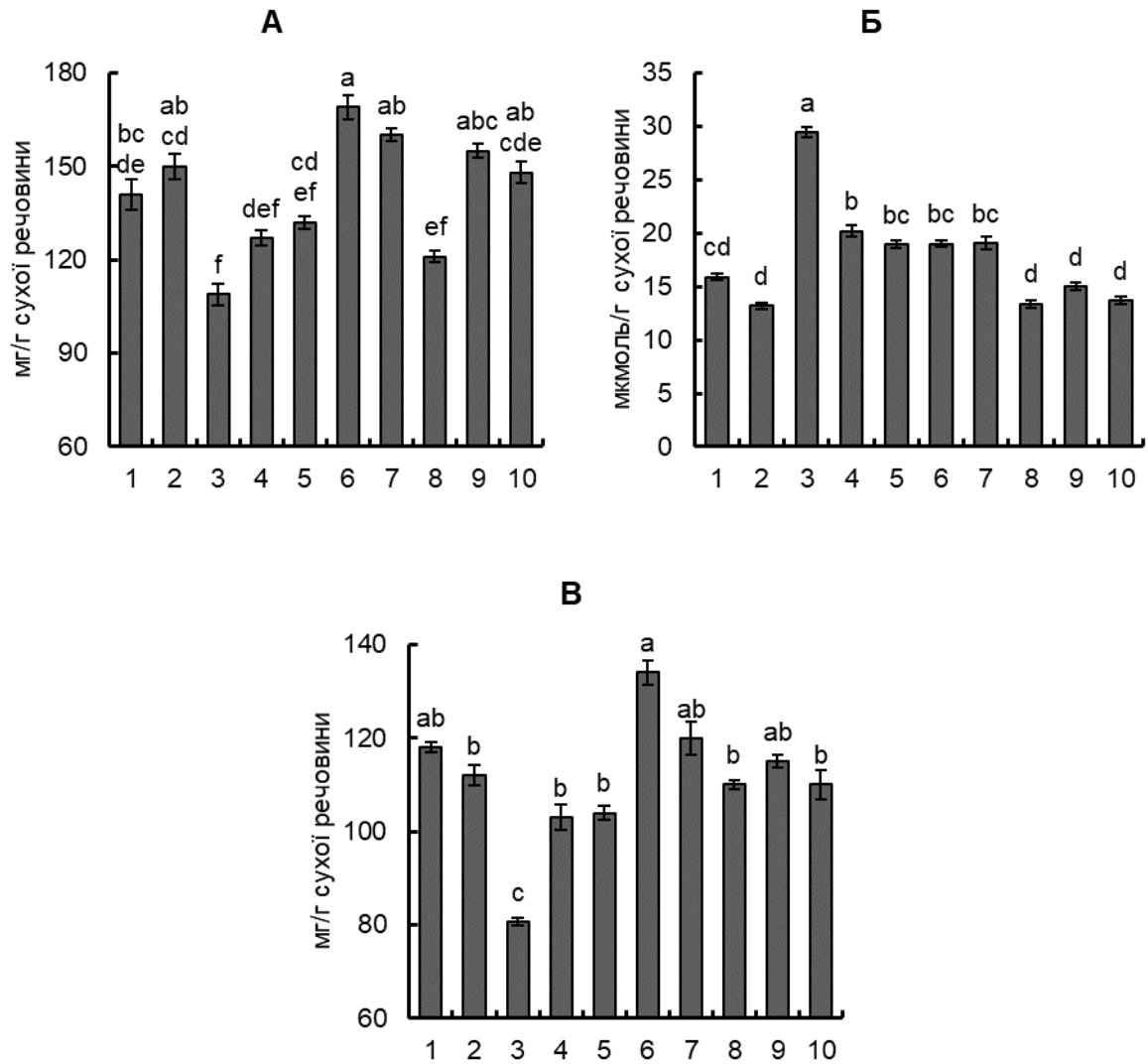


Рис. 4.21. Вміст цукрів (А), проліну (Б) та розчинних білків (В) в листках після 6-денної посухи. 1 – Контроль (нормальний полив); 2 – Гідропраймінг (нормальний полив); 3 – Контроль (посуха); 4 – Гідропраймінг (посуха); 5 – Праймінг ГАМК (0,1 мМ) (посуха); 6 – Праймінг ГАМК (0,5 мМ) (посуха); 7 – Праймінг ГАМК (2,5 мМ) (посуха); 8 – Фоліарна обробка ГАМК (0,1 мМ) (посуха); 9 – Фоліарна обробка ГАМК (0,5 мМ) (посуха); 10 – Фоліарна обробка ГАМК (2,5 мМ) (посуха).

Вміст проліну в листках практично не змінювався при вирощуванні рослин з гідропраймінгом в оптимальних умовах (рис. 4.21 Б). Посуха викликала майже дворазове збільшення вмісту проліну в листках, а гідропраймінг частково нівелював цей ефект. Праймінг насіння ГАМК у

всьому досліджуваному діапазоні концентрацій частково знижував стрес-індуковане підвищення вмісту проліну, а фоліарна обробка повністю усувала такий ефект (рис. 4.21 Б).

Загальний вміст розчинних білків у листках істотно не змінювався при гідропраймінгу (рис. 4.21 В). Посуха спричиняла значне зменшення вмісту розчинних білків у листках. У рослин, вирощених з насіння, підданого гідропраймінгу, цей негативний ефект посухи нівелювався. У той же час праймінг насіння ГАМК в концентраціях 0,5 і 2,5 мМ викликав істотне збільшення вмісту білків в листках за умов посухи (рис. 4.21 В). Фоліарна обробка рослин також стабілізувала вміст розчинних білків, проте її ефекти майже не перевищували позитивну дію гідропраймінгу.

Всі досліджувані інтегральні фізіологічні показники (лінійний ріст, сира і суха біомаса, відносний вміст води та вміст хлорофілів) перебували в тісній позитивній кореляції між собою (рис. 4.22). Коефіцієнти кореляції Пірсона між ними перебували в діапазоні від 0,69 до 0,96. Ряд показників антиоксидантної системи перебував у значущій прямій кореляції з показниками росту. Так, активність антиоксидантних ферментів каталази і гваяколпероксидази тісно корелювала з висотою надземної частини рослин, сирою і сухою біомасою, відносним вмістом води в листах і кількістю хлорофілу. Однак позитивна кореляція активності СОД з цими показниками не була значимою при  $p \leq 0,05$ . Вміст каротиноїдів, які є важливими гідрофобними низькомолекулярними антиоксидантами, досить тісно корелював з висотою і сирою біомасою рослин (рис. 4.22). У той же час кількість кінцевого продукту ПОЛ МДА, що характеризує інтенсивність окислювального стресу, перебувала в тісній зворотно пропорційній кореляції з усіма показниками росту рослин, ВВВ і вмістом хлорофілу.

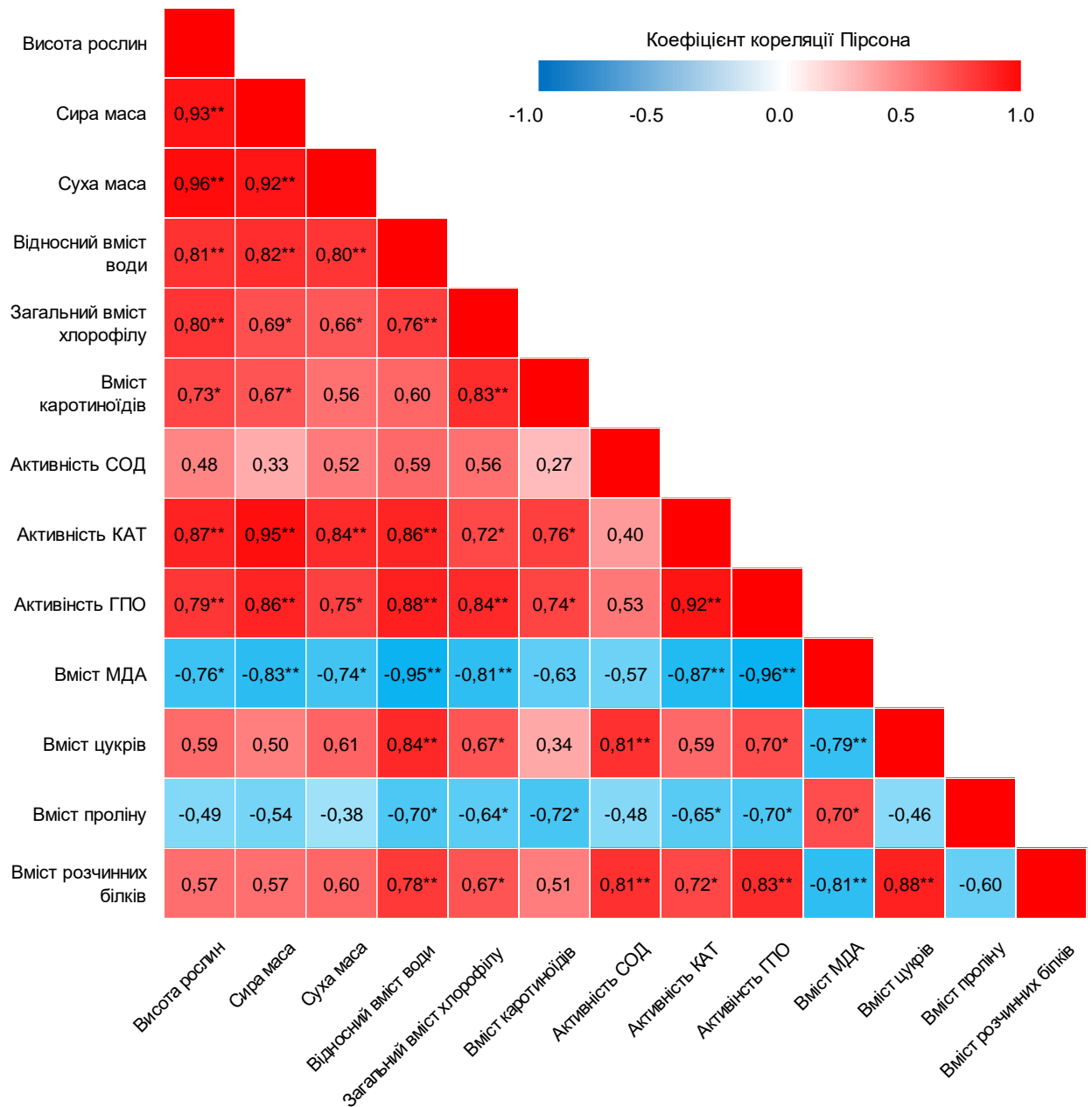


Рис. 4.22. Кореляційний аналіз між фізіологічними та біохімічними показниками.

Вміст цукрів і розчинних білків, які є важливими компонентами осмопротекторної системи, перебував у значимій кореляції з ВВВ ( $p \leq 0,01$ ) і вмістом хлорофілу ( $p \leq 0,05$ ). У той же час вміст проліну, який також вважається одним з основних осмолітів рослинних клітин, перебував у зворотній кореляції з цими показниками. Примітно, що вміст цукрів і розчинних білків перебував у тісній зворотній кореляції з маркером окислювального стресу МДА, а вміст проліну, навпаки, позитивно корелював

з кількістю МДА. Також слід відзначити досить високу пряму кореляцію вмісту цукрів і розчинних білків з активністю антиоксидантних ферментів і зворотну кореляцію між вмістом проліну і активністю досліджуваних ферментів (рис. 4.22).

Результати аналізу головних компонент (РСА) показують, що головна компонента 1 (PC1) пояснює 72,8% дисперсії, у той же час головна компонента 2 (PC2) лише 10,8% (рис. 4.23). Таким чином, PC1 пояснює основну частину варіабельності в отриманому наборі даних. У позитивній частині PC1 розташувалися варіанти без впливу посухи, а також варіанти з праймінгом насіння 0,1 і 0,5 мМ ГАМК і фоліарною обробкою рослин ГАМК в концентрації 0,5 мМ. У той же час в негативній частині PC1 знаходяться варіант з дією посухи (без додаткових обробок) і варіанти з поєднанням посухи і гідропраймінгу, посухи і фоліарної обробки 0,1 і 2,5 мМ ГАМК та праймінгу насіння 2,5 мМ ГАМК. При цьому варіанти з ГАМК розташувалися значно ближче до нульової точки в системі координат у порівнянні з варіантами з посухою без обробки рослин і посухою для рослин варіанта з гідропраймінгом насіння (рис. 4.23). Це свідчить про те, що будь-які впливи ГАМК з різним ступенем ефективності, пом'якшували ефекти посухи.

Щодо векторів показників, які характеризують фізіологічний стан рослин і функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем, можна констатувати, що більшість з них знаходиться в позитивній частині PC1 (всі ростові показники, відносний вміст води, вміст фотосинтетичних пігментів, активність антиоксидантних ферментів, вміст цукрів і розчинних білків), проте вектори вмісту проліну і особливо МДА чітко спрямовані в негативну частину PC1 (рис. 4.23).

Зв'язок досліджуваних показників з PC2 значно слабший, можна констатувати деяке позитивне навантаження на PC2 активності СОД і зовсім невелике навантаження вмісту двох груп осмолітів – цукрів і розчинних

білків. У той же час вміст каротиноїдів і активність каталази несуть деяке негативне значення на PC2 (рис. 4.23).

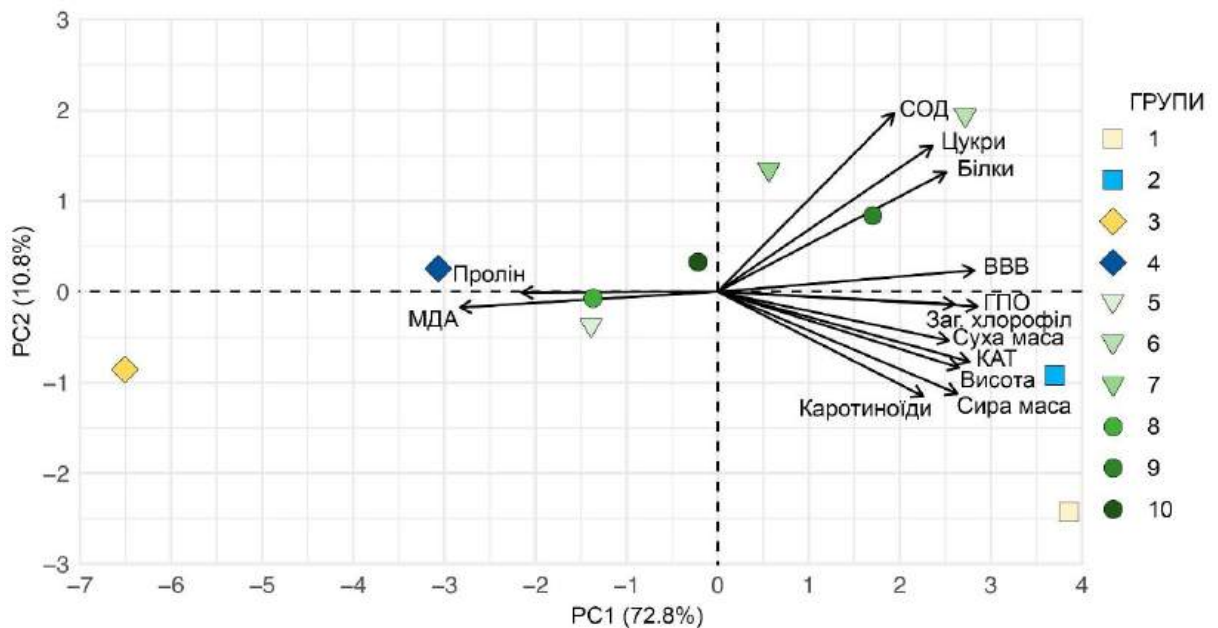


Рис. 4.23 Аналіз головних компонент за дії гідропраймінгу, праймінгу та фоліарної обробки ГАМК на фізіологічні та біохімічні показники рослин пшениці після 6-денної посухи. 1 – Контроль (нормальний полив); 2 – Гідропраймінг (нормальний полив); 3 – Контроль (посуха); 4 – Гідропраймінг (посуха); 5 – Праймінг ГАМК (0,1 мМ) (посуха); 6 – Праймінг ГАМК (0,5 мМ) (посуха); 7 – Праймінг ГАМК (2,5 мМ) (посуха); 8 – Фоліарна обробка ГАМК (0,1 мМ) (посуха); 9 – Фоліарна обробка ГАМК (0,5 мМ) (посуха); 10 – Фоліарна обробка ГАМК (2,5 мМ) (посуха).

Отримані експериментальні дані показують, що на більшість досліджених в наших експериментах фізіологічних і біохімічних показників ГАМК мала найбільш істотний вплив у концентрації 0,5 мМ. На тепловій карті візуалізовано ефекти 0,5 мМ ГАМК при її застосуванні шляхом праймінгу насіння перед посівом і фоліарної обробки рослин перед посухою. Як показують отримані дані, обидва способи використання ГАМК – шляхом праймінгу насіння або фоліарної обробки рослин підвищували ростові

показники рослин пшениці в умовах стресу посухи (рис. 4.24). При цьому захисна дія ГАМК на рослини при обох способах застосування значно перевершувала ефект гідропраймінгу насіння, який також підвищував посухостійкість рослин. Ці факти самі по собі можуть вказувати на різноманітні шляхи реалізації стрес-протекторної дії ГАМК.

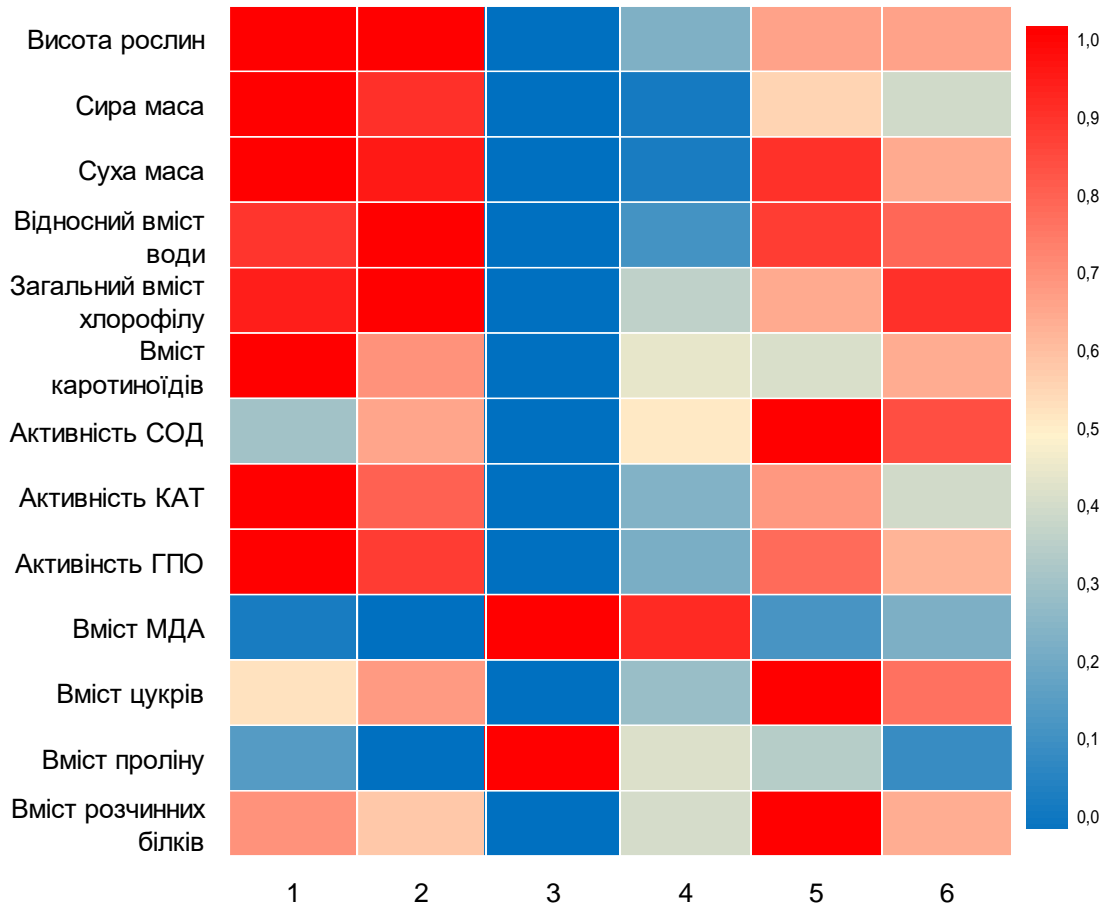


Рис. 4.24 Теплова карта впливу гідропраймінгу, праймінгу та фоліарної обробки на фізіологічні показники після 6-денної посухи. 1 – Контроль (нормальний полив); 2 – Гідропраймінг (нормальний полив); 3 – Контроль (посуха); 4 – Гідропраймінг (посуха); 5 – Праймінг ГАМК (0,5 мМ) (посуха); 6 – Фоліарна обробка ГАМК (0,5 мМ) (посуха).

В умовах наших дослідів праймінг насіння ГАМК сприяв підтриманню близького до контролю ВВВ в тканинах листів за умов посухи; схожий, але менший за силою ефект проявлявся у варіанті з фоліарною обробкою рослин ГАМК (рис. 4.24). При цьому обидва способи застосування ГАМК сприяли

збільшенню у рослин вмісту таких осмолітів, як цукри і розчинні білки. Однак праймінг насіння мав більш помітний вплив на ці показники в порівнянні з фоліарною обробкою.

Дещо незвичним ефектом в умовах наших експериментів виявилось зниження стрес-індукованого накопичення проліну у варіантах з ГАМК, особливо при обприскуванні нею рослин (рис. 4.24). У багатьох дослідженнях при осмотичних стресах, навпаки, показано підвищення вмісту проліну в рослинах під впливом екзогенної ГАМК. Однак відомо і про протилежні ефекти. Саме такий ефект (зменшення спричинюваного стресом накопичення проліну) було виявлено нами при дослідженні впливу ГАМК на стійкість до модельної посухи (впливу ПЕГ 6000) етіюльованих проростків резистентного сорту пшениці Тобак (див. п. 4.2).

У наших дослідженнях праймінг насіння і (меншою мірою) фоліарна обробка в умовах посухи знижували вміст у листках основного показника окислювального стресу МДА, що могло зменшити силу сигналу, який викликає синтез проліну (рис. 4.24). Запобігання розвитку окислювального стресу могло бути зумовлено збалансованим функціонуванням ферментативної антиоксидантної системи у рослин у варіантах з ГАМК. Так, застосування ГАМК знімало викликане посухою зниження активності ключових антиоксидантних ферментів – СОД, каталази і гваяколпероксидази (рис. 4.24). Особливо помітним ефект стабілізації активності антиоксидантних ферментів був у варіанті з праймінгом насіння ГАМК. На значний внесок антиоксидантних ферментів у реалізацію стрес-протекторної дії ГАМК може вказувати тісна позитивна кореляція між активністю каталази і гваяколпероксидази та інтегральними фізіологічними показниками, що характеризують ріст рослин, відносний вміст води та вміст фотосинтетичних пігментів (рис. 4.22). Про це свідчить і розташування варіантів з ефективною дією ГАМК в одному напрямку з векторами антиоксидантних ферментів в системі координат РСА (рис. 4.23).

Отже, вплив екзогенної ГАМК на посухостійкість рослин пшениці, ймовірно, включає в себе комплекс складних процесів, в яких ГАМК бере участь і як стресовий метаболіт, і як сигнальна молекула. Суттєвіший стрес-протекторний вплив праймінгу насіння порівняно з фоліарною обробкою ГАМК може бути зумовлений запуском довготривалих процесів, які відносять до ефектів так званої стресової пам'яті. Їхня природа в контексті дії ГАМК залишається майже невивченою, але може бути пов'язана з її залученням в активацію сигнальних шляхів, індукуванням нею накопичення факторів транскрипції, важливих для адаптації до посухи, наприклад, DREB і WRKY (Sahoo et al., 2025). Цілком природно, що з'ясування ймовірності розвитку таких клітинних подій під впливом ГАМК потребує спеціальних досліджень.

Слід зазначити, що у наших експериментах показано позитивний вплив ГАМК на посухостійкість рослин пшениці на ранніх (ювенільних) фазах розвитку. Для оцінки її впливу на більш пізніх етапах онтогенезу, зокрема, на репродуктивній фазі розвитку, необхідні спеціальні дослідження. Проте прояв захисних ефектів ГАМК на ювенільних фазах розвитку може мати практичне значення, оскільки чутливими до нестачі вологи є не тільки фази цвітіння та наливу зерна, але й фази проростання насіння та початкового росту рослин пшениці (Mehrabad Pour-Benab et al., 2019; Salem et al., 2022). При цьому проблема стійкості озимих зернових злаків саме на ювенільних фазах розвитку набуває актуальності для багатьох країн Східної Європи, зокрема для України, через регулярні посухи в першій половині осені (Романенко та ін., 2018). Таким чином, праймінг насіння ГАМК або фоліарна обробка її розчинами рослин пшениці може бути дієвим інструментом для підвищення їх стійкості до посух осіннього періоду. Важливо, що в таких умовах ефективніше впливає на стійкість рослин саме праймінг насіння, який є більш економним та простим способом впливу ГАМК на рослини.

#### Висновки до розділу 4

Індуковане ГАМК підвищення теплостійкості проростків пшениці, ймовірно, відбувається із залученням АФО та іонів кальцію як ключових сигнальних посередників. На це, зокрема, вказує транзиторне підвищення вмісту гідроген пероксиду у коренях проростків із наступним зростанням активності антиоксидантних ферментів — СОД, каталази і гваяколпероксидази. Вказані ефекти ГАМК повністю усувалися попереднім внесенням у середовище інкубації коренів скавенджера гідроген пероксиду диметилтіосечовини та значною мірою пригнічувалися в присутності інгібітора НАДФН-оксидази імідазолу. Антагоністи кальцію (ЕГТА і неоміцин) тією чи іншою мірою модулювали ефекти індукованого ГАМК підвищення вмісту гідроген пероксиду і активності антиоксидантних ферментів. Під впливом ГАМК значно зменшувалися спричинювані тепловим стресом ушкодження мембран клітин коренів та знижувався вміст в них продуктів ПОЛ. При цьому стрес-протекторна дія ГАМК повністю усувалася обробкою ДМТС та змінювалася у присутності кальцієвих антагоністів.

Обробка ГАМК підвищувала стійкість етіольованих проростків пшениці різних сортів до модельної посухи (осмотичного стресу, створюваного ПЕГ 6000). Під впливом ГАМК як у стійкого сорту Тобак, так і у чутливого сорту Досконала знижувалося стрес-індуковане накопичення маркерів окиснювального стресу гідроген пероксиду та МДА. В обох сортів обробка ГАМК запобігала спричинюваному стресом зниженню активності СОД, а також зменшенню вмісту цукрів і антоціанів. У той же час ГАМК сприяла підвищенню активності гваяколпероксидази, проліну та загального вмісту фенольних сполук у чутливого до посухи сорту Досконала і слабо впливала на ці показники у стійкого сорту Тобак. Таким чином, зафіксовано диференційований прояв стрес-протекторної дії ГАМК, залежний від адаптивних стратегій конкретних сортів.

Вперше показано роль ГАМК в регуляції редокс-гомеостазу і накопичення осмолітів у етіюльованих проростків тритикале за умов модельної посухи, сольового стресу і комбінованої дії цих чинників. ГАМК помітно зменшувала генерацію АФО та накопичення продукту ПОЛ МДА у стресових умовах. Встановлено, що протекторна дія ГАМК виявлялася у підвищенні активності антиоксидантних ферментів у фізіологічно нормальних та стресових умовах, посиленні накопичення проліну, стабілізації пулу цукрів та помітному збільшенні вмісту фенольних сполук та антоціанів.

Праймінг насіння, а також фоліарна обробка ГАМК рослин пшениці, які піддавалися посусі у віці 7–12 днів, значно пом'якшували рістінгібувальну дію посухи, сприяли підвищенню ВВВ та збереженню пулу хлорофілу в листках. При цьому екзогенна ГАМК запобігала спричинюваному посухою розвитку окислювального стресу, стабілізуючи активність антиоксидантних ферментів – СОД, каталази і гваяколпероксидази. Також обробка ГАМК викликала підвищення вмісту осмолітів – цукрів і розчинних білків у листках, знижуючи при цьому стрес-індуковане накопичення проліну. Праймінг насіння чинив більш помітний позитивний вплив на ріст рослин та стан стрес-протекторних систем рослин пшениці порівняно з фоліарною обробкою.

Активація за дії ГАМК широкого спектра адаптивних реакцій у рослин пшениці і тритикале при осмотичному та сольовому стресах вказує на ймовірну системну дію ГАМК як молекули, що залучається до функціонування сигнальної мережі рослинних клітин. Однак її функціональна взаємодія з основними сигнальними посередниками потребує спеціальних досліджень. Отримані результати дозволяють розглядати ГАМК як сполуку, перспективну для застосування як біорегулятора адаптивних реакцій рослин (зокрема на ранніх фазах розвитку) на стреси, пов'язані із зневодненням та дією високих температур.

## **РОЗДІЛ 5. МЕХАНІЗМИ ДІЇ ГАМК НА ПРОРОСТАННЯ ЗЕРНІВОК ПШЕНИЦІ І ТРИТИКАЛЕ ЗА НОРМАЛЬНИХ І СТРЕСОВИХ УМОВ**

Дослідження, результати яких викладені у попередніх розділах, дозволили встановити, що екзогенна ГАМК має помітний стрес-протекторний вплив на найбільш ранніх стадіях розвитку рослин, у тому числі підвищує тепло-, осмо- і солестійкість етіюльованих проростків пшениці і тритикале. Крім того, встановлено, що передпосівна обробка (праймінг) насіння ГАМК має більш істотний позитивний вплив на посухостійкість 7–12-денних зелених рослин порівняно з фоліарною обробкою. Таким чином, є підстави припускати, що саме праймінг насіння може бути найбільш ефективним і економним способом застосування ГАМК як індуктора стрес-протекторних реакцій рослин. Потенційно праймінг насіння може також підсилювати його схожість (Afshari, Seyyedi, 2020), особливо за несприятливих умов (Waqas et al., 2019). Крім того, можна очікувати помітних позитивних ефектів при праймуванні насіння, яке має знижені посівні якості. У цьому розділі представлені результати експериментальної перевірки таких робочих гіпотез.

### **5.1. Вплив праймінгу ГАМК на стан антиоксидантної та осмопротекторної систем при проростанні зернівок пшениці за умов осмотичного і сольового стресів**

Праймінг насіння набуває все більшої популярності як інструмент для розкриття потенціалу стресостійкості рослин (Sen, Puthur, 2020). В результаті обробки насіння праймувальними агентами рослини набувають здатності швидко реагувати на наступні впливи стрес-факторів (Farooq et al., 2020; Aswathi et al., 2022). Праймоване насіння характеризується раннім і рівномірним проростанням, а в багатьох випадках позитивний вплив праймінгу проявляється і на пізніших фазах онтогенезу (Khalaki et al., 2020).

Нині відомий досить широкий і доступний арсенал фізіологічних прийомів і сполук, здатних підвищувати схожість насіння (Waqas et al., 2019). Серед сполук, здатних активувати проростання зернівок і ріст проростків за нормальних і особливо стресових умов, класичні фітогормони, наприклад, гібереліни (Kosakivska et al., 2022a) і цитокініни (Vedenicheva et al., 2022), сигнальні посередники, зокрема солі  $\text{Ca}^{2+}$  (Ashraf et al., 2019),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Ellouzi et al., 2017), NO (Bethke et al., 2004),  $\text{H}_2\text{S}$  (Zhou et al., 2018), а також інші молекули, що поєднують у собі властивості стресових метаболітів і ФАР — пролін (Mansour & Salama, 2020), мелатонін (Jiang et al., 2016; Simlat et al., 2018) і ГАМК, яка також належить до «рослинних нейротрансмітерів» (Sheteiwy et al., 2019).

Як засвідчують дані літератури і результати власних досліджень, викладені у попередніх розділах, зернові злаки, зокрема пшениця, належать до видів рослин, чутливих до дії екзогенної ГАМК. Однак, незважаючи на досить широку феноменологію дії екзогенної ГАМК на стійкість рослин до посухи та сольового стресу, поки що мало робіт, в яких би вона застосовувалася для праймінгу насіння. Так, для пшениці лише у роботі Zhao et al., (2023) показано поліпшення проростання насіння за обробки розчинами ГАМК шляхом їх розпилення. В експериментах з *Oryza sativa* показано, що тривала (24 год) обробка насіння ГАМК з подальшим їх висушуванням підвищувала стійкість проростків до модельної посухи, засолення та комбінації цих стресів (Sheteiwy et al., 2019). Така обробка посилювала синтез ендогенної ГАМК, індукувала антиоксидантні ферменти та посилювала синтез вторинних метаболітів.

Відомо, що посуха та сольовий стрес сильно інгібують проростання насіння пшениці (Yu et al., 2024). У зв'язку з цим можна очікувати, що обробка насіння ГАМК у складі «класичної» процедури праймінгу, що включає короткочасне замочування насіння в розчинах і подальше висушування, повинна сприяти активації процесів, важливих для проростання насіння, росту проростків і контролю про-/антиоксидантної

рівноваги в стресових умовах. Перевірка цієї робочої гіпотези стала одним із завдань роботи.

Праймування насіння розчином ГАМК за нормальних умов не дозволяло оцінити її вплив на енергію проростання та схожість, оскільки насіння контрольного варіанта відрізнялося дуже високою схожістю та енергією проростання (рис. 5.1).

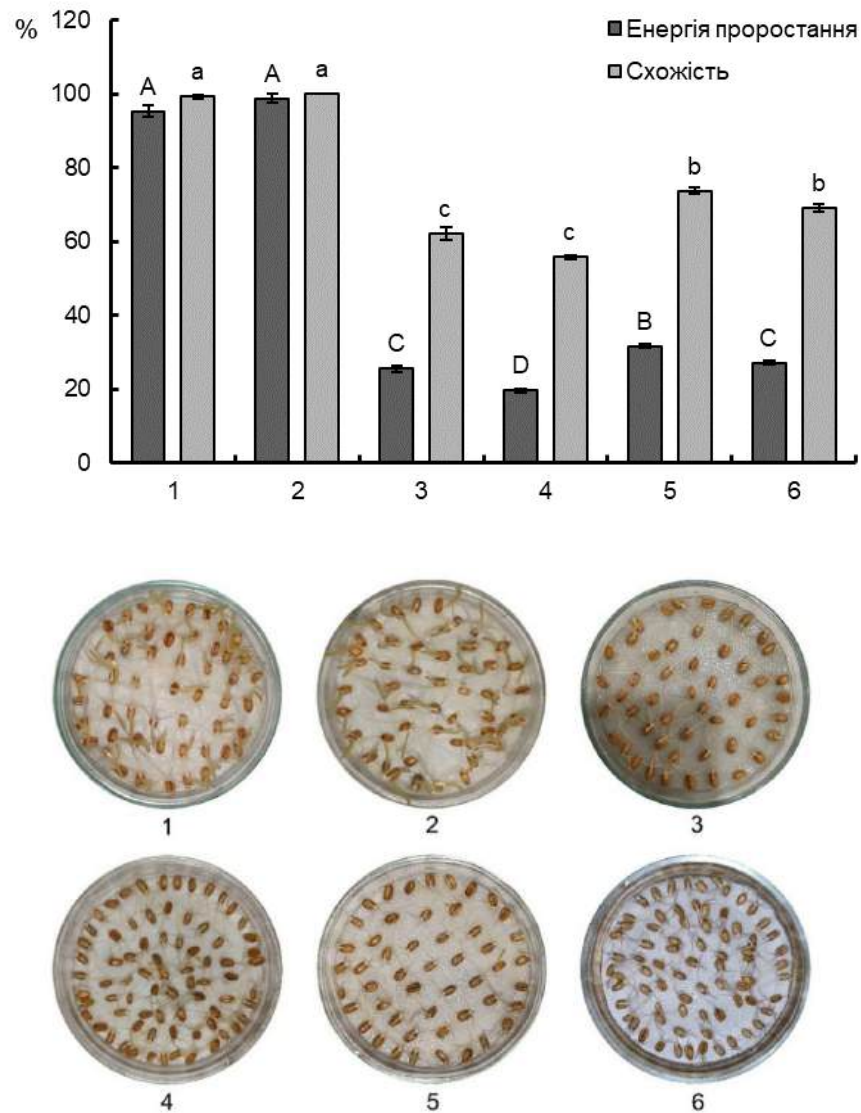


Рис. 5.1 Енергія проростання і схожість насіння пшениці та фото проростків через 3 дні після проростання за дії ГАМК та осмотичного і сольового стресів. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (0,5 мМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – NaCl (150 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ); 6 – NaCl (150 мМ) + ГАМК (0,5 мМ).

Модельна посуха і, особливо, сольовий стрес спричиняли істотне зниження енергії проростання насіння. Попередня обробка насіння ГАМК значно підвищувала енергію проростання насіння, що зазнало осмотичного стресу. Схожість насіння за стресового впливу 15% ПЕГ 6000 та 150 мМ розчину NaCl знижувалася відносно контрольних варіантів до 62 і 56%, відповідно. Праймінг насіння ГАМК підвищував схожість на 11–13%.

Обробка розчинами ГАМК насіння, яке не зазнало впливу стресу суттєво не вплинула на біомасу пагонів пшениці, але збільшила біомасу коренів (рис. 5.2). Осмотичний і сольовий стрес зменшили біомасу пагонів

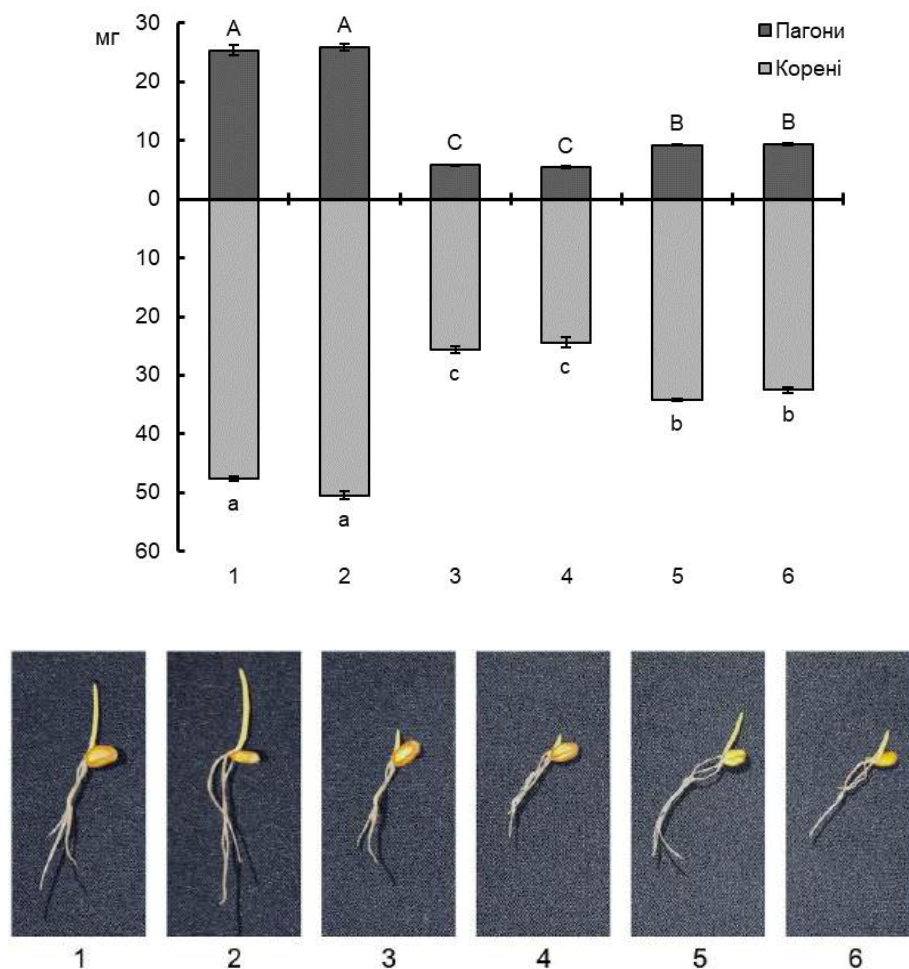


Рис. 5.2 Біомаса органів проростків пшениці та фенотип типових проростків пшениці за дії ГАМК та осмотичного і сольового стресів. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (0,5 мМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – NaCl (150 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ); 6 – NaCl (150 мМ) + ГАМК (0,5 мМ).

більш ніж у 4 рази, а біомасу коренів — приблизно у 2 рази. Праймінг насіння розчином ГАМК значно пом'якшував спричинюване стресом пригнічення росту і пагонів і коренів.

Попередня обробка насіння ГАМК не спричинила змін у гідратації тканин пагонів (рис. 5.3). Осмотичний стрес, спричинюваний розчинами ПЕГ 6000 і, особливо, NaCl, значно знизив вміст води в пагонах проростків пшениці. Праймінг пом'якшував цей ефект, але вплив від ГАМК був більш помітним в умовах модельної посухи, ніж в умовах сольового стресу.

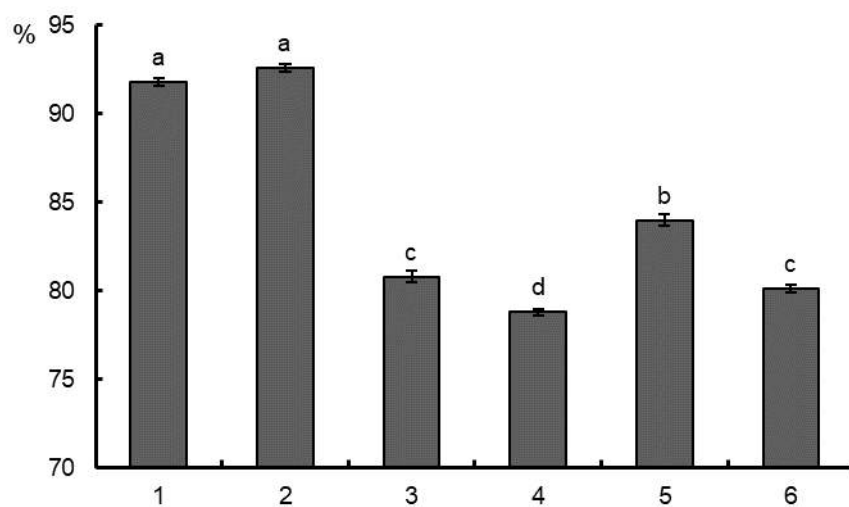


Рис 5.3. Вміст води у пагонах пшениці за дії ГАМК та осмотичного і сольового стресів. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (0,5 мМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – NaCl (150 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ); 6 – NaCl (150 мМ) + ГАМК (0,5 мМ).

За відсутності стресових факторів, обробка зернівок ГАМК не впливала на утворення супероксидних аніонів у пагонах (рис. 5.4, А). Модельна посуха призвела до приблизно 1,5-разового збільшення утворення  $O_2^-$ , а сольовий стрес спричинив різке (майже 4-разове) посилення утворення супероксидних аніон-радикалів у пагонах. Попередня обробка насіння розчином ГАМК значно знижувала прояв окиснювального стресу.

За нормальних умов рівень гідроген пероксиду у пагонах проростків, вирощених з насіння, обробленого ГАМК, був значно нижчим, ніж у

контролі (рис. 5.4, Б). Осмотичний стрес, спричинений дією ПЕГ 6000 і NaCl, призводив до збільшення вмісту  $H_2O_2$  в пагонах. Водночас ці стреси мали менший вплив на вміст гідроген пероксиду в пагонах проростків, вирощених з насіння, обробленого ГАМК.

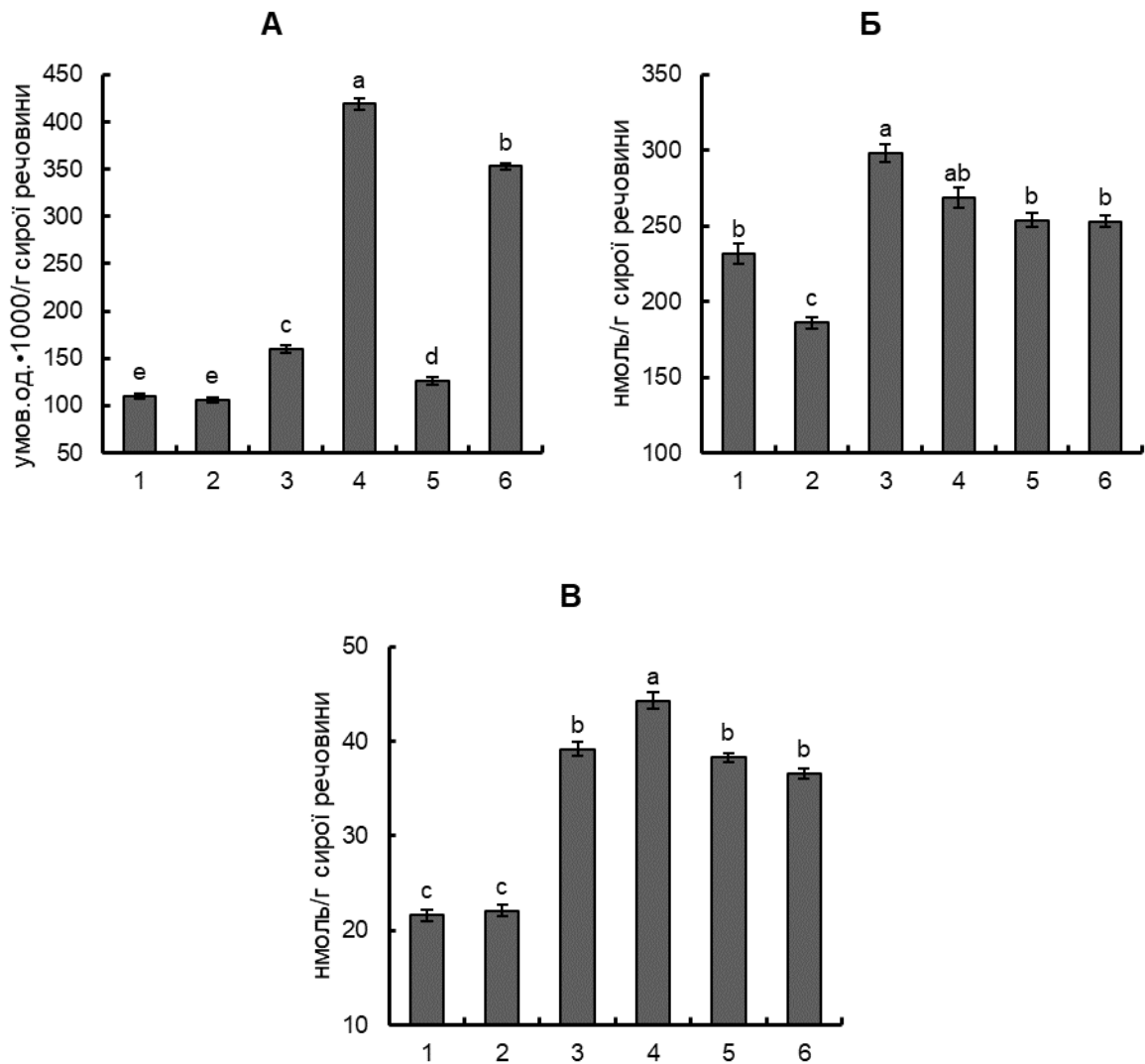


Рис. 5.4. Генерація супероксидного аніон-радикала (А), гідроген пероксиду (Б) та вміст МДА (В) в пагонах проростків пшениці за дії ГАМК та осмотичного і сольового стресів. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (0,5 мМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – NaCl (150 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ); 6 – NaCl (150 мМ) + ГАМК (0,5 мМ).

Обробка насіння, яке не піддавалося стресу, не вплинула на вміст кінцевого продукту ПОЛ МДА, в пагонах (рис. 5.4, В). Осмотичний стрес,

спричинений дією ПЕГ 6000 і особливо NaCl, призвів до значного збільшення вмісту МДА в тканинах. Обробка ГАМК істотно не впливала на цей показник за умов модельної посухи (проростання насіння в присутності ПЕГ 6000). Однак у проростків з насіння, яке було оброблено ГАМК, в умовах сольового стресу вміст МДА був нижчим, ніж у проростків з необробленого насіння, що свідчить про пом'якшення окиснювального стресу.

Обробка насіння ГАМК помітно не вплинула на активність каталази в пагонах за відсутності стресових факторів (рис. 5.5, А). За умов посухи або сольового стресу активність каталази знижувалася (при розрахунку на суху масу пагонів). Обробка ГАМК не мала істотного впливу на активність цього ферменту у варіантах із стресовими факторами.

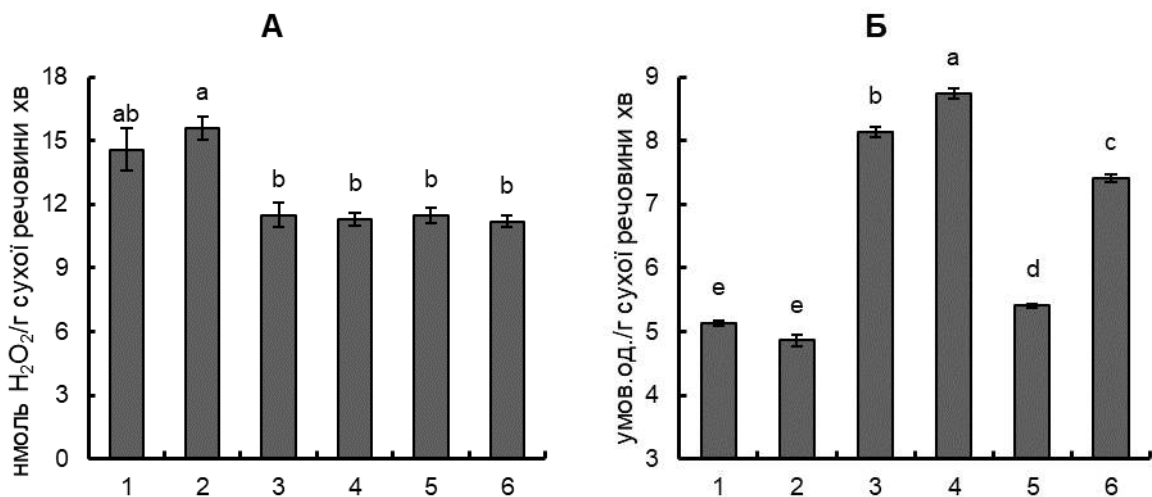


Рис. 5.5. Активність каталази (А) та гваяколпероксидази (Б) в пагонах проростків пшениці за дії ГАМК та осмотичного і сольового стресів. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (0,5 мМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – NaCl (150 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ); 6 – NaCl (150 мМ) + ГАМК (0,5 мМ).

У пагонах проростків, вирощених з насіння, обробленого ГАМК, за фізіологічно нормальних умов активність гваяколпероксидази була дещо нижчою, ніж у контролі, проте ця різниця не була значимою при  $p \leq 0,05$ . Модельна посуха і, особливо, стрес, спричинюваний NaCl, викликали значне

підвищення активності пероксидази (рис. 5.5, Б). В той же час у проростків, вирощених з насіння, обробленого ГАМК, за впливу стресу підвищення активності гваяколпероксидази було значно менш вираженим, ніж у варіантах без обробки.

Вміст цукрів у пагонах проростків, вирощених з насіння, обробленого ГАМК, був вищим, ніж у контролі (рис. 5.6, А). У варіантах з впливом ПЕГ 6000 і особливо NaCl, вміст цукрів в пагонах значно знижувався порівняно з контролем. Водночас обробка насіння розчином ГАМК повністю запобігала зниженню вмісту розчинних вуглеводів у пагонах, спричиненому дією стресорів.

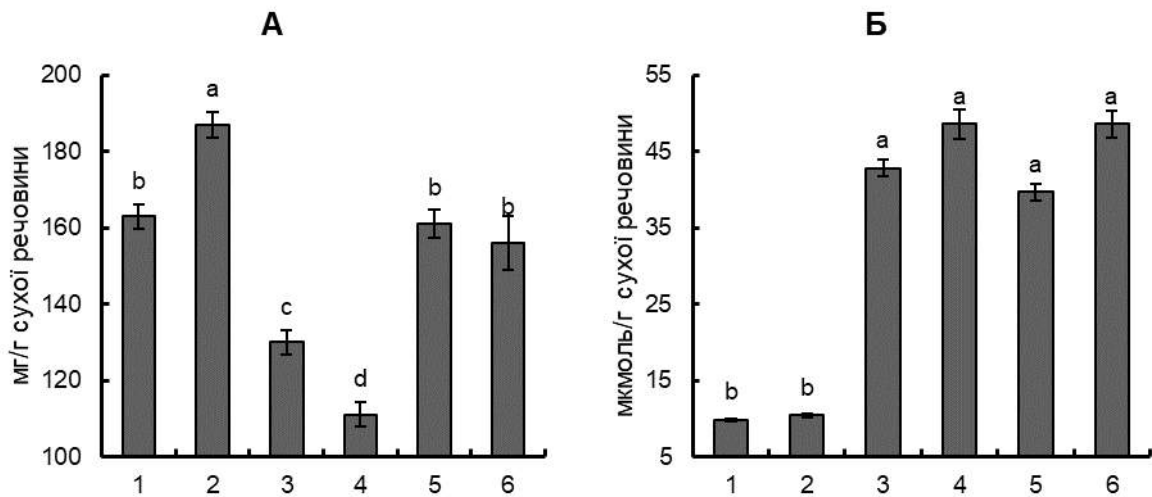


Рис. 5.6. Вміст цукрів (А) та проліну (Б) в пагонах проростків пшениці за дії ГАМК та осмотичного і сольового стресів. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (0,5 мМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – NaCl (150 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (15%) + ГАМК (0,5 мМ); 6 – NaCl (150 мМ) + ГАМК (0,5 мМ).

Праймінг насіння ГАМК не вплинув на вміст проліну в пагонах (рис. 5.6, Б). Стрес, створений дією ПЕГ 6000 або NaCl, спричинив збільшення вмісту проліну приблизно в 4 і 5 разів, відповідно. Обробка насіння ГАМК не мала значного впливу на вміст проліну в пагонах у стресових умовах.

Розрахунки показали сильну позитивну кореляцію ( $r = 0,98$ ) між показниками росту (енергія проростання, схожість, біомаса проростків) та

вмістом води в проростках (рис. 5.7). З іншого боку, спостерігалася дуже сильна зворотна кореляція ( $r = -0,98$ ) між усіма цими показниками росту та

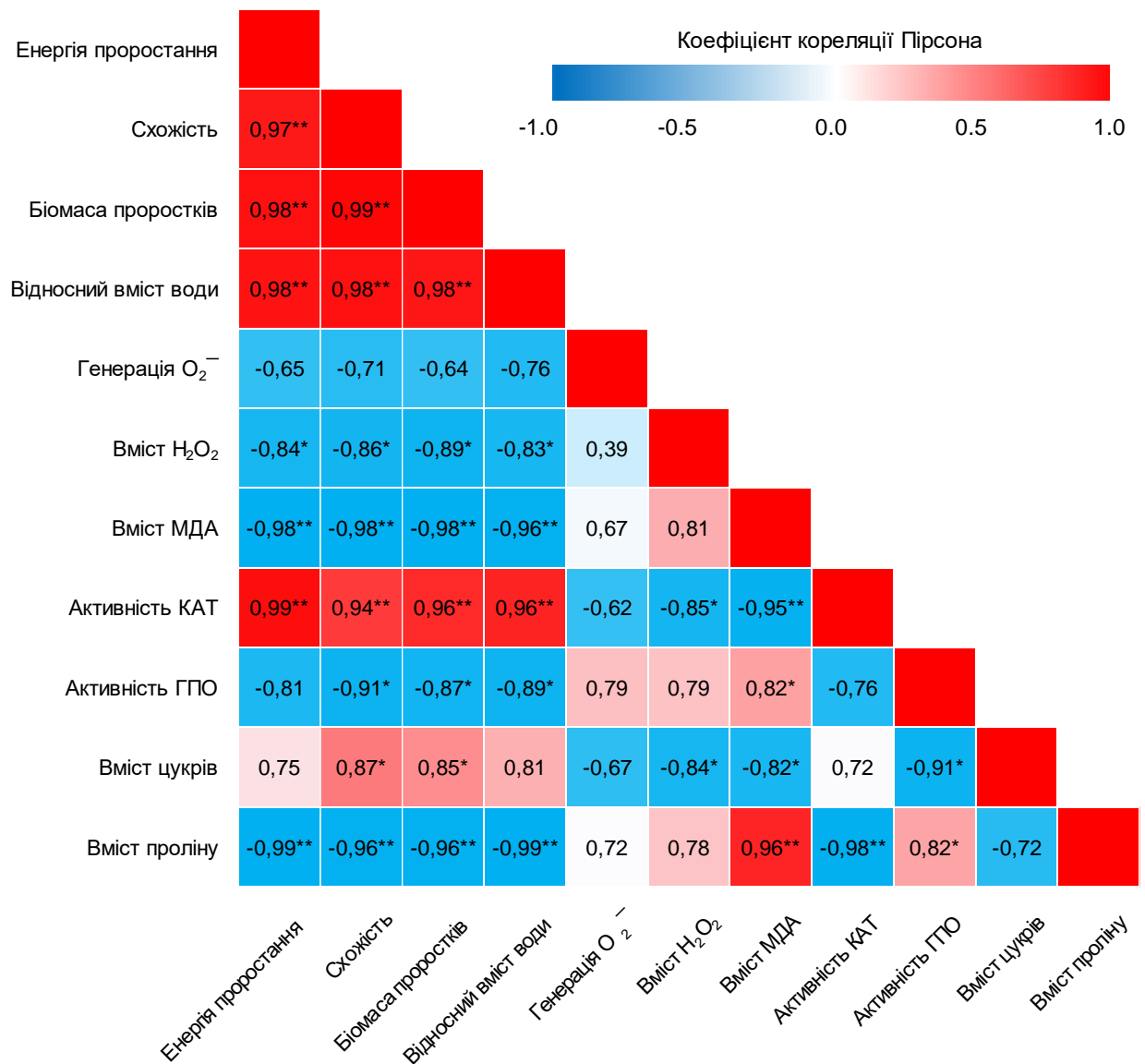


Рис. 5.7. Кореляційний аналіз між фізіологічними та біохімічними показниками за дії ГАМК та осмотичного і сольового стресів.

маркером окиснювального стресу – вмістом МДА. Зворотна кореляція між вмістом МДА та оводненістю тканин також була дуже сильною. Особливу увагу слід звернути на сильну зворотну кореляцію між параметрами росту, оводненістю тканин та вмістом проліну ( $r$  коливався від  $-0,99$  до  $-0,96$ ). Водночас вміст проліну позитивно корелював із вмістом продукту ПОЛ МДА. Інша закономірність була відзначена для вмісту цукрів, котрі, як і

пролін, є важливими осмолітами. Вміст цукрів позитивно корелював зі схожістю насіння та біомасою проростків ( $r = 0,87$  та  $0,85$ , відповідно). Водночас вміст розчинних вуглеводів мав негативну кореляцію з ключовими параметрами окиснювального стресу – рівнями гідроген пероксиду та МДА.

Обговорюючи отримані результати, слід зауважити, що праймінг насіння рису ГАМК знижував вміст проліну в молодих рослинах в умовах сольового та осмотичного стресів, але при цьому запобігав спричинюваному стресами зниженню вмісту цукрів (Sheteiwu et al., 2019), що узгоджується з отриманими нами результатами. У цьому контексті варто звернути увагу на цікавий феномен, відзначений щодо процесів проростання зернівок сорго різних генотипів (Thakur, Sharma, 2005). Автори виявили сильну зворотну кореляцію між схожістю насіння в умовах засолення та накопиченням проліну. Висловлено припущення, що синтез проліну може бути адаптивною стратегією рослин для запобігання проростанню зернівок у несприятливому середовищі (Thakur, Sharma, 2005).

Активність каталази мала позитивний кореляційний зв'язок із показниками росту та вмістом води в проростках і негативний із показниками окиснювального стресу. Однак активність іншого ферменту, що бере участь у метаболізмі гідроген пероксиду, гваяколпероксидази, перебувала у зворотній кореляції з показниками росту та прямо корелювала із вмістом  $H_2O_2$  та МДА (рис. 5.7).

Однозначно трактувати такий ефект складно. Можна припустити, що гваяколпероксидаза за даних експериментальних умов могла виявляти прооксидантну дію, беручи участь не в знешкодженні, а в генерації АФО. Такі феномени зареєстровані на ряді об'єктів і можуть бути зумовлені специфічним субстратним оточенням ферменту (Minibayeva et al., 2009). В цілому ж вплив ГАМК на про/антиоксидантну рівновагу, напевно, є складним і багатогранним. Він може бути пов'язаним з індукуванням окремих (у тому числі не досліджуваних у цій роботі) антиоксидантних

ферментів, а також з активацією ГАМК-шунту, що зменшує утворення АФО у мітохондріях (Vor, Turkan, 2019).

Отже, можна констатувати, що обробка насіння розчином ГАМК мала позитивний вплив на всі досліджувані показники, що характеризують проростання насіння та ріст проростків пшениці у стресових умовах. Стрес-протекторні ефекти ГАМК можна пов'язувати зі зниженням прояву окиснювального стресу та накопиченням за стресових умов в органах проростків цукрів, що виконують осмопротекторні, мембранопротекторні та антиоксидантні функції.

## **5.2. Роль нітроген оксиду як сигнального посередника в індукуванні $\gamma$ -аміномасляною кислотою проростання зернівок пшениці за умов водного дефіциту**

Згідно з сучасними уявленнями, сигнальні ефекти ГАМК значною мірою реалізуються через її взаємодію з іншими внутрішньоклітинними посередниками – кальцієм, активними формами кисню та нітроген оксидом. Як показано в п. 4.1, посилення виживання проростків пшениці під дією екзогенної ГАМК опосередковується кальційзалежним підвищенням генерації активних форм кисню.

Роль нітроген оксиду у механізмах дії ГАМК досі вивчена слабо. Існують лише поодинокі дані, отримані за допомогою інгібіторного аналізу, що свідчать про його участь у формуванні адаптивних реакцій, спричинених ГАМК. Так, обробка ГАМК рослин *Agrostis stolonifera*, яка сприяла підвищенню стійкості до осмотичного стресу, викликала збільшення утворення NO, залежного від нітратредуктази та ферменту, подібного до NO-синтази тварин (Tang et al., 2020). У *Cucumis melo* за умов карбонатного засолення під впливом ГАМК спостерігалось підвищення концентрації NO, а одночасна обробка рослин скавенджером NO (сРТІО) блокувала прояв ефектів ГАМК (Xu et al., 2021). Водночас залучення NO до регуляції проростання зернівок і росту проростків під осмотичним стресом залишалось

невивченим. Проте на прикладі різних видів рослин показано, що донори нітроген оксиду здатні стимулювати проростання насіння і ріст проростків за умов посухи або засолення (Duan et al., 2007; Sepehri, Rouhi, 2016; Yemets et al., 2019).

З урахуванням зазначеного, одним із завдань роботи стало з'ясування участі NO у реалізації захисної дії ГАМК на проростки пшениці за умов посухи, створеної ПЕГ 6000. Для цього оцінювали вплив обробки насіння ГАМК, а також скавенджером нітроген оксиду метиленовим синім (МС) та донором NO нітропрусидом натрію на проростання зернівок, ріст проростків, рівень ендogenousного нітроген оксиду та активність антиоксидантної і осмопротекторної систем.

Насіння пшениці, яке проростало за умов модельної посухи, викликаної ПЕГ 6000, показало значне зниження енергії проростання та схожості порівняно з контролем (рис. 5.8, А). Праймування зернівок ГАМК або донором NO НПН істотно підвищувало ці показники, причому ефекти НПН були близькими до дії ГАМК. Обробка скавенджером NO МС майже не впливала на схожість і енергію проростання, але при сумісній дії з ГАМК позитивний ефект останньої повністю нівелювався (рис. 5.8, А).

Модельна посуха також спричиняла зниження біомаси пагонів проростків пшениці. Попередня обробка розчином ГАМК достовірно підвищувала накопичення біомаси пагонів у стресових умовах. Так само, як і для показників проростання, обробка МС не впливала на біомасу, але нівелювала позитивний ефект ГАМК. При обробці насіння НПН спостерігалася тенденція до пом'якшення негативного впливу посухи, проте зміни не були статистично значимими ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 5.8, Б).

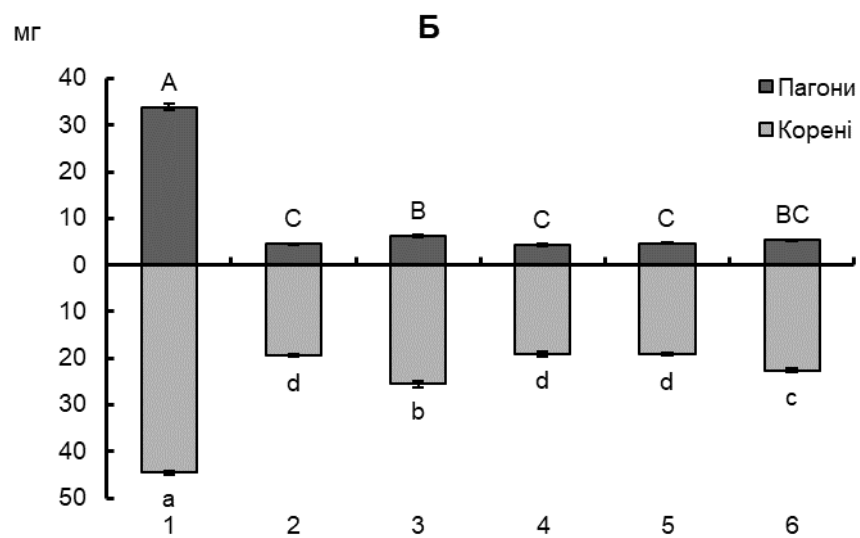
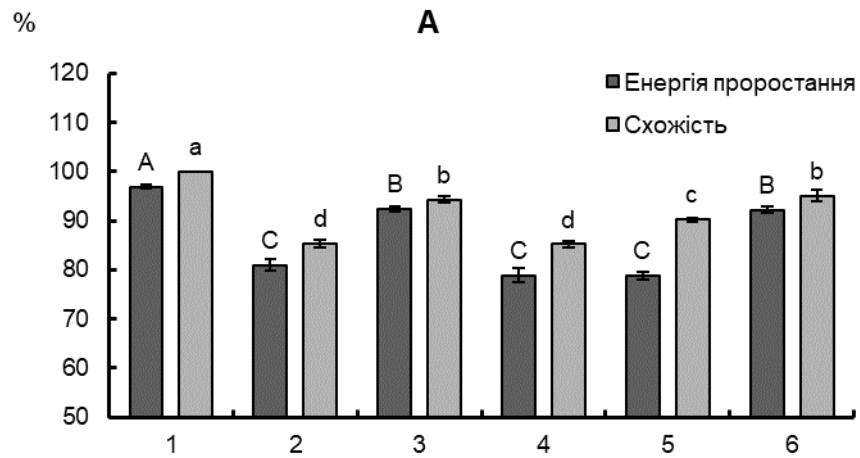


Рис. 5.8. Енергія проростання, схожість зернівки пшениці (А), маса органів проростків (Б) і фото їх типових зразків за дії модельної посухи. 1 – Контроль; 2 – ПЕГ 6000 (13%); 3 – ПЕГ 6000 (13%) + ГАМК (0,5 мМ); 4 – ПЕГ 6000 (13%) + МС (0,1 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (13%) + ГАМК (0,5 мМ) + МС (0,1 мМ); 6 – НПН (0,1 мМ).

Осмотичний стрес спричинив більш ніж дворазове зниження маси коренів проростків пшениці, проте попереднє праймування ГАМК помітно зменшувало негативний вплив стресу (рис. 5.8). Обробка НПН також пом'якшувала пригнічення росту кореневої біомаси, хоча ефект був дещо меншим порівняно з дією ГАМК (рис. 5.8, Б, В). Вплив МС не змінював масу коренів за умов посухи, а при комбінованому застосуванні ГАМК і МС позитивного ефекту ГАМК на ріст коренів не спостерігалося.

За дії модельної посухи відносний вміст води в пагонах знизився майже на 13%. Праймування насіння розчином ГАМК сприяло підтриманню водного статусу близького до контролю (рис. 5.9). Обробка МС самостійно не впливала на зволоження тканин під стресом, але при сумісній дії з ГАМК позитивний ефект останньої зменшувався. Вплив НПН на вміст води у пагонах був подібним до дії ГАМК (рис. 5.9).

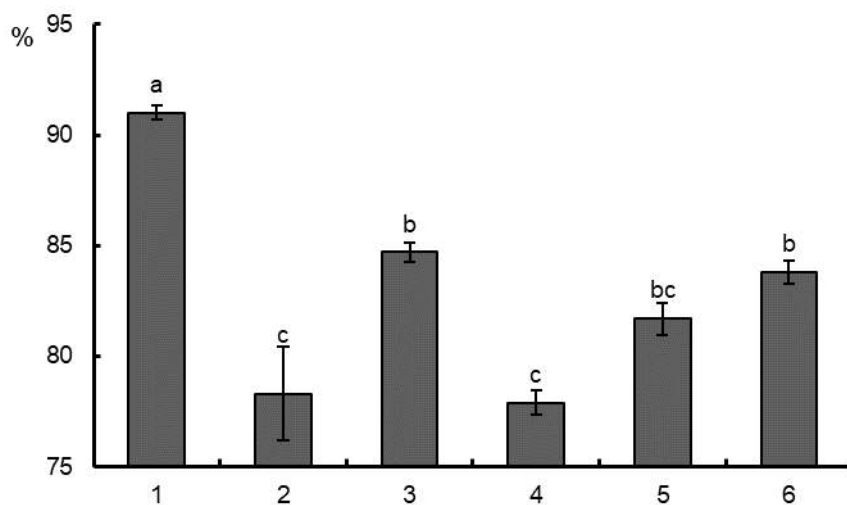


Рис. 5.9. Вміст води у пагонах 72-годинних проростків пшениці за дії модельної посухи. 1 – Контроль; 2 – ПЕГ 6000 (13%); 3 – ПЕГ 6000 (13%) + ГАМК (0,5 мМ); 4 – ПЕГ 6000 (13%) + МС (0,1 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (13%) + ГАМК (0,5 мМ) + МС (0,1 мМ); 6 – НПН (0,1 мМ).

Таким чином, праймування насіння ГАМК сприяло покращенню проростання та росту проростків пшениці, а також підтримувало вміст води в тканинах за умов модельної посухи. Водночас ефект ГАМК значно

знижувався при застосуванні скавенджера NO MC, що свідчить про участь нітроген оксиду як сигнального посередника у реалізації захисної дії ГАМК.

За впливу осмотичного стресу, спричиненого ПЕГ 6000, концентрація нітроген оксиду у пагонах була вищою, ніж у контрольному варіанті ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 5.10). Праймування насіння ГАМК додатково підвищувало вміст NO у пагонах за умов посухи. Обробка MC сама по собі не впливала на рівень NO, але при сумісному застосуванні з ГАМК ефект підвищення концентрації NO не виявлявся. Водночас обробка насіння НПН спричиняла значне підвищення вмісту NO у пагонах (рис. 5.10).

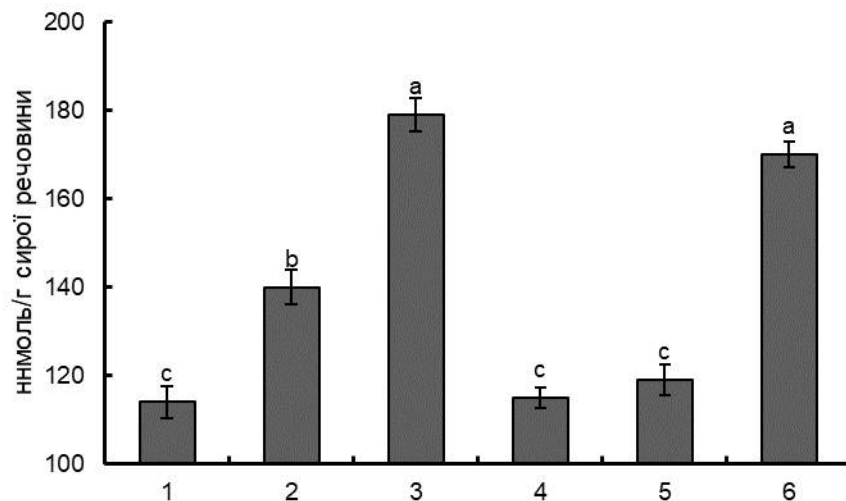


Рис. 5.10 Вміст нітроген оксиду в пагонах 72-годинних проростків пшениці за дії модельної посухи. 1 – Контроль; 2 – ПЕГ 6000 (13%); 3 – ПЕГ 6000 (13%) + ГАМК (0,5 мМ); 4 – ПЕГ 6000 (13%) + MC (0,1 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (13%) + ГАМК (0,5 мМ) + MC (0,1 мМ); 6 – НПН (0,1 мМ).

За впливу осмотичного стресу активність амілази в зернівках пшениці майже не змінювалася (рис. 5.11). Праймування насіння ГАМК суттєво підвищувало активність ферменту. Скавенджер NO MC самостійно не впливав на амілазу, але повністю усував ефект ГАМК, що вказує на можливу роль NO як сигнального посередника у реалізації захисної дії ГАМК. Попередня обробка насіння донором NO НПН спричиняла найвищу

активність амілази серед усіх варіантів, що також підтверджує значення нітроген оксиду у регуляції цього ферменту (рис. 5.11).

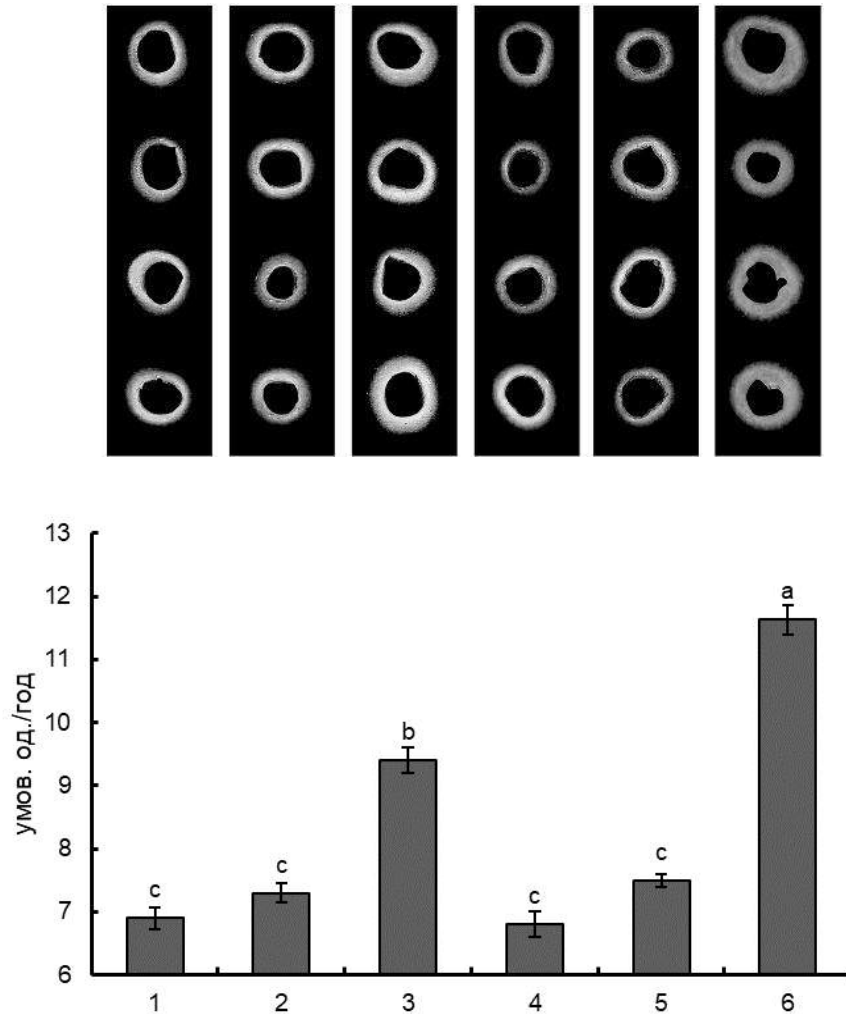


Рис. 5.11. Загальна активність амілази та типовий приклад її візуалізації за дії модельної посухи. 1 – Контроль; 2 – ПЕГ 6000 (13%); 3 – ПЕГ 6000 (13%) + ГАМК (0,5 мМ); 4 – ПЕГ 6000 (13%) + МС (0,1 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (13%) + ГАМК (0,5 мМ) + МС (0,1 мМ); 6 – НПН (0,1 мМ).

Підвищена активність амілази при праймінгу ГАМК могла сприяти збільшенню кількості розчинних вуглеводів у пагонах. Осмотичний стрес значно знижував вміст цукрів, тоді як обробка ГАМК сприяла його відновленню до рівня, близького до контролю. Дія скавенджера NO МС частково зменшувала ефект ГАМК, а НПН забезпечував істотне підвищення вмісту цукрів за умов модельної посухи (рис. 5.12, А).

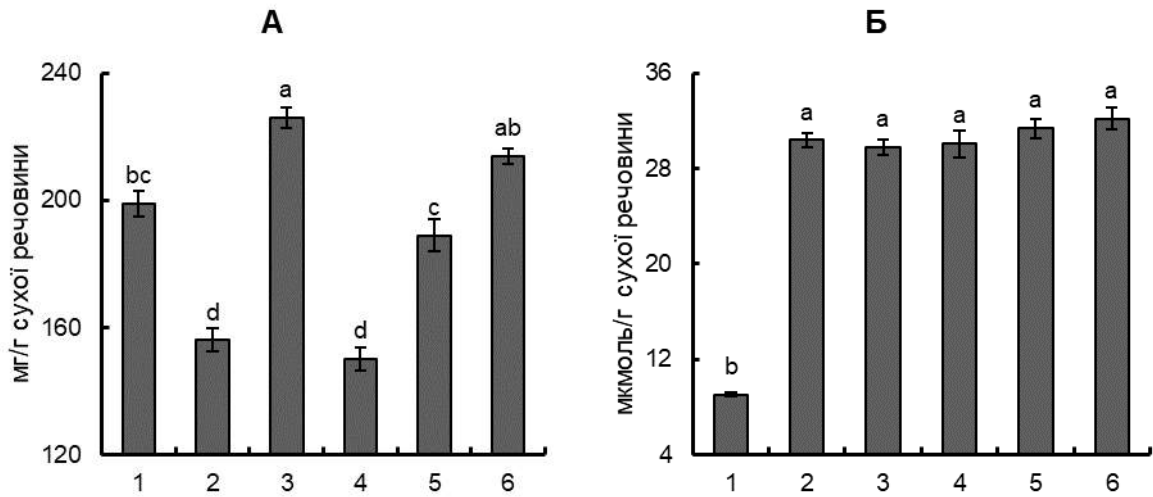


Рис. 5.12 Вміст цукрів (А) і проліну (Б) у пагонах проростків пшениці за дії модельної посухи. 1 – Контроль; 2 – ПЕГ 6000 (13%); 3 – ПЕГ 6000 (13%) + ГАМК (0,5 мМ); 4 – ПЕГ 6000 (13%) + МС (0,1 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (13%) + ГАМК (0,5 мМ) + МС (0,1 мМ); 6 – НПН (0,1 мМ).

Осмотичний стрес, викликаний ПЕГ 6000, призводив до більш ніж триразового підвищення вмісту проліну в пагонах, проте праймінг насіння ГАМК, МС, їх комбінацією або донором NO НПН майже не змінював цей показник за умов посухи (рис. 5.12, Б).

Вміст фенольних сполук у пагонах за дії посухи залишався майже незмінним. Обробка насіння ГАМК суттєво підвищувала накопичення фенолів. Скавенджер NO МС мало впливав на вміст фенольних речовин, але при його поєднанні з ГАМК частково пригнічував ефект останньої. Донор NO НПН сприяв значному зростанню вмісту фенолів, подібно до дії ГАМК (рис. 5.13, А).

Модельна посуха призводила до суттєвого зниження вмісту антоціанів у пагонах. Праймінг насіння ГАМК дозволяв підтримувати їх рівень майже на рівні контролю, тоді як скавенджер NO МС практично повністю усував цей ефект. Донор NO НПН не лише стабілізував вміст антоціанів, а й дещо підвищував його за умов посухи (рис. 5.13, Б).

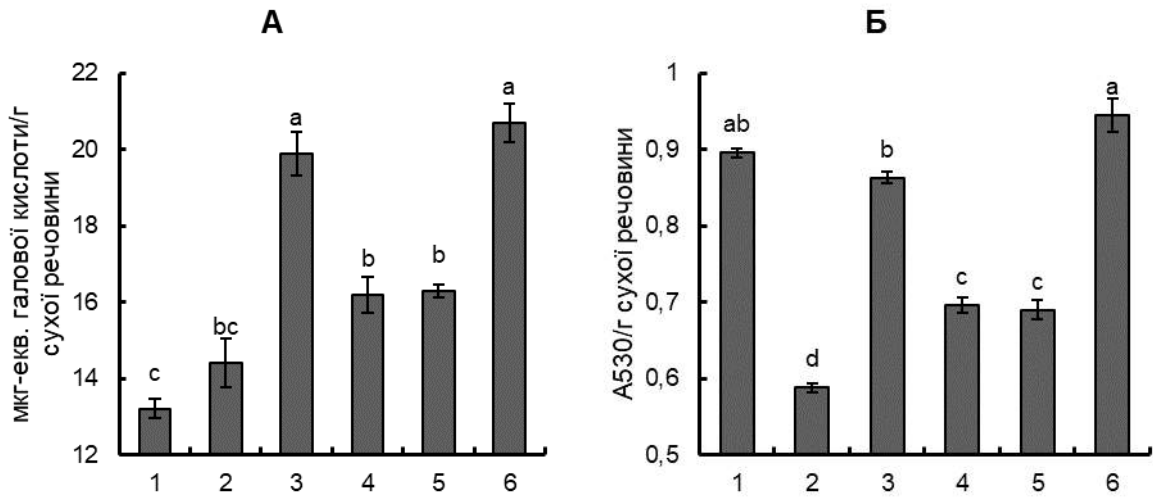


Рис. 5.13 Загальний вміст фенольних сполук (ФС) (А) і кількість антоціанів (Б) у пагонах проростків пшениці за дії модельної посухи. 1 – Контроль; 2 – ПЕГ 6000 (13%); 3 – ПЕГ 6000 (13%) + ГАМК (0,5 мМ); 4 – ПЕГ 6000 (13%) + МС (0,1 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (13%) + ГАМК (0,5 мМ) + МС (0,1 мМ); 6 – НПН (0,1 мМ).

Осмотичний стрес підвищував генерацію супероксидного аніон-радикала  $O_2^{\cdot-}$ . Праймінг ГАМК пом'якшував цей ефект у пагонах проростків. Проте комбінація ГАМК з МС частково знімала позитивний вплив ГАМК та навіть посилювала утворення  $O_2^{\cdot-}$ . Донор NO НПН майже повністю знижував генерацію супероксидного радикала до рівня контролю (рис. 5.14, А).

Вміст  $H_2O_2$  у пагонах також підвищувався за дії посухи. Праймінг ГАМК значно зменшував накопичення гідроген пероксиду. МС, навпаки, підсилював його утворення та повністю усував ефект ГАМК, тоді як НПН, подібно до ГАМК, знижував рівень  $H_2O_2$  до контрольних значень (рис. 5.14, Б).

Осмотичний стрес спричинював підвищення вмісту МДА, як і інших маркерів окиснювального стресу, у пагонах. Праймінг ГАМК значно знижував накопичення цього кінцевого продукту ПОЛ. Присутність скавенджера NO МС, навпаки, посилювала утворення МДА і при комбінованій обробці з ГАМК майже повністю усувала її захисний ефект.

Донор NO НПН за умов посухи, подібно до ГАМК, знижував вміст МДА (рис. 5.14, В).

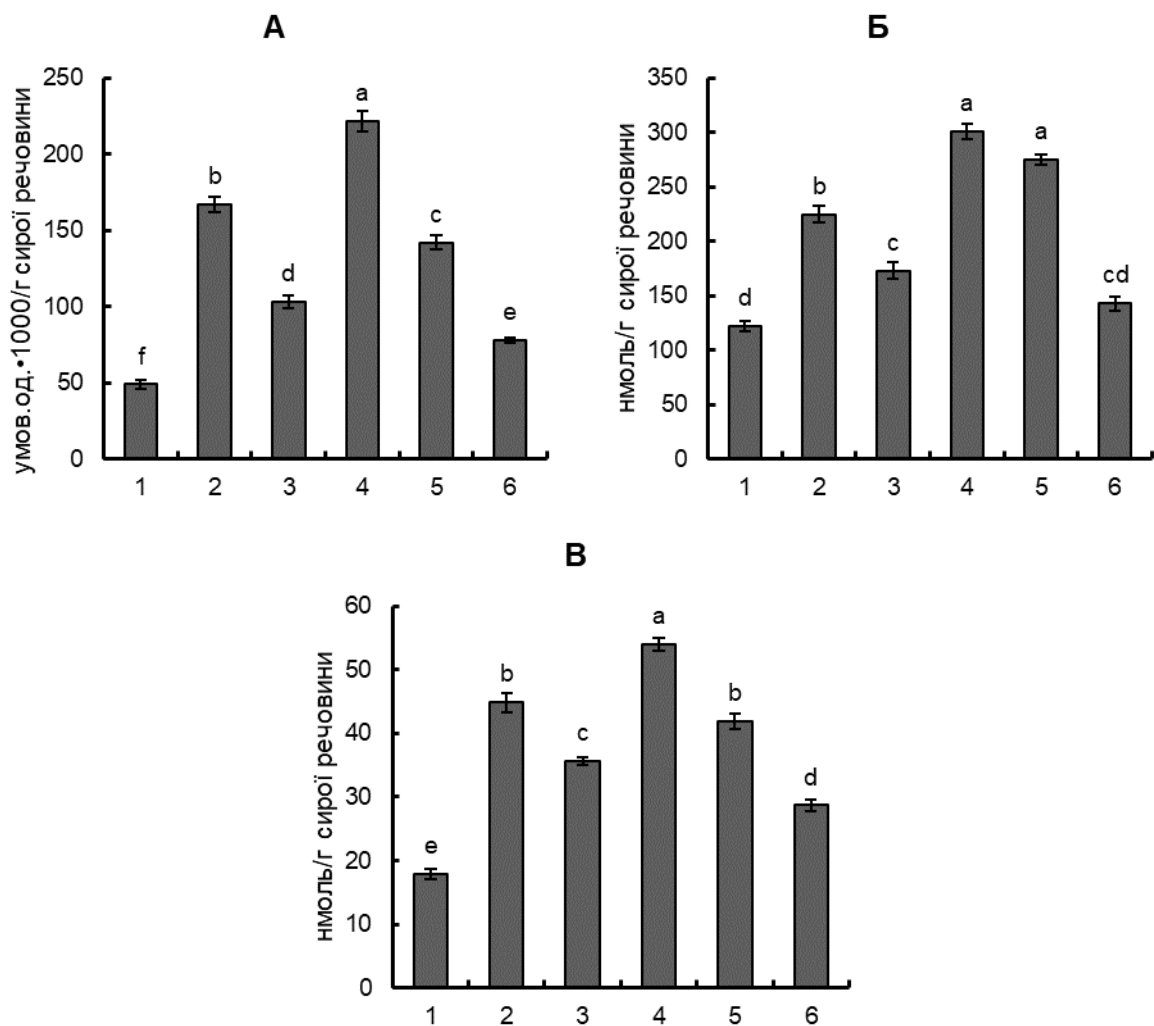


Рис. 5.14 Генерація супероксидного радикала пагонами проростків (А), вміст у них гідроген пероксиду (Б) і МДА (В) за дії модельної посухи. 1 – Контроль; 2 – ПЕГ 6000 (13%); 3 – ПЕГ 6000 (13%) + ГАМК (0,5 мМ); 4 – ПЕГ 6000 (13%) + МС (0,1 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (13%) + ГАМК (0,5 мМ) + МС (0,1 мМ); 6 – НПН (0,1 мМ).

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що праймінг насіння пшениці розчинами ГАМК суттєво підвищував проростання насіння за умов осмотичного стресу та сприяв збільшенню накопичення біомаси проростків, а також забезпечував підтримання оводненості тканин за дії модельної посухи.

В останні роки у ряді досліджень продемонстровано підвищення стійкості зернових культур до посухи та сольового стресу під впливом екзогенної ГАМК (Sheteiwu et al., 2019; Ashraf et al., 2024; Al Ghafri et al., 2025). Новим аспектом нашої роботи стало експериментальне підтвердження того, що нітроген оксид (NO) бере участь у стимулюванні проростання насіння пшениці та у формуванні стійкості проростків до посухи при праймінгу насіння ГАМК. Участь NO була доведена комплексно за допомогою трьох експериментальних підходів: застосування скавенджера нітроген оксиду метиленового синього, шляхом аналізу ендogenous вмісту NO у пагонах проростків, а також відтворенням ряду стрес-протекторних ефектів ГАМК шляхом обробки насіння донором нітроген оксиду нітропрусидом натрію. На сьогодні відоме лише одне дослідження, проведене з використанням рослин пшениці, у якому за допомогою скавенджера NO РТІО було доведено участь нітроген оксиду у підвищенні солестійкості рослин під впливом ГАМК (Khanna et al., 2021). Проте в цьому дослідженні застосовувалася фоліарна обробка ГАМК 30-денних рослин, і тому не розглядалася дія ГАМК на проростання зернівок та формування стійкості рослин на ранніх етапах розвитку.

У нашому дослідженні роль нітроген оксиду як сигнального посередника в реалізації стрес-протекторної дії ГАМК підтверджується тим, що обробка скавенджером NO МС практично повністю усувала позитивний вплив праймінгу насіння ГАМК на проростання зернівок, ріст проростків за стресових умов та збереження водного балансу в тканинах. Було також зафіксовано підвищення ендogenous вмісту NO у пагонах 3-добових проростків під дією ГАМК, тоді як за присутності МС цей ефект не проявлявся. Водночас обробка зернівок донором NO НПН сприяла збільшенню вмісту ендogenous NO у пагонах і відтворювала більшість фізіологічних ефектів, викликаних дією ГАМК.

Мабуть, одним із найбільш ранніх проявів впливу праймінгу насіння ГАМК є збільшення активності амілази у зернівках (рис. 5.11). Подібні

ефекти ГАМК спостерігалися і в інших видів рослин. Наприклад, у ячменю встановлено дозозалежне підвищення активності  $\alpha$ -амілази, посилення експресії її гена та зниження вмісту крохмалю в зернівках під дією ГАМК (Sheng et al., 2018). У цій же роботі показано зв'язок між підвищенням ендогенного вмісту ГАМК у зернівках та активністю амілази. У нашому дослідженні вперше за допомогою інгібиторного підходу продемонстровано, що NO бере участь у підвищенні активності амілази за дії ГАМК на зернівки (рис. 5.11). Екзогенний нітроген оксид також викликав підвищення активності амілази у зернівках, причому навіть більше, ніж ГАМК. Механізми, через які NO опосередковує збільшення активності амілази під дією ГАМК, поки що залишаються не до кінця зрозумілими. Водночас літературні дані підтверджують здатність NO підвищувати активність амілази у зернівках: так, у зернівках пшениці під впливом НПН за сольового стресу відзначалося збільшення активності амілази (Zheng et al., 2009), донор NO НПН також підвищував активність ферменту в насінні кукурудзи (Patel et al., 2017).

Підвищення вмісту розчинних вуглеводів у пагонах під впливом ГАМК, як і зростання активності амілази, залежало від NO-статусу клітин, хоча обробка скавенджером MS лише частково усувала спричинюване ГАМК підвищення рівня цукрів у пагонах (рис. 5.12, А). Це дозволяє припустити, що регуляція вмісту розчинних вуглеводів під дією ГАМК здійснюється через сукупність процесів, частина з яких опосередкована нітроген оксидом, а частина — незалежна від нього. Загалом можна стверджувати, що підвищення рівня розчинних цукрів у тканинах є важливою складовою позитивного впливу ГАМК на стійкість рослин до осмотичних стресів.

Ще одним помітним проявом дії ГАМК виявилось посилення синтезу вторинних метаболітів із залученням NO як сигнального посередника (рис. 5.13, А). У літературі відзначено позитивний зв'язок між ендогенним вмістом ГАМК і концентрацією фенольних сполук у зернівках пшениці під час

проростання (Kim et al., 2018). Також показано, що праймінг насіння рису ГАМК активує ферменти фенольного метаболізму та стимулює накопичення пулу фенольних сполук за умов осмотичного і сольового стресів (Sheteiwu et al., 2019). Вважають, що серед стресових біорегуляторів ГАМК має особливе значення для контролю вмісту фенольних речовин у рослинах (Dabravolski, Isayenkov, 2023).

Проте до цього часу не було відомо про участь нітроген оксиду як посередника у регуляції вмісту фенольних сполук під дією ГАМК у злакових рослин. Водночас показано, що у сої під впливом ГАМК під час сольового стресу посилення синтезу загальних фенольних сполук зменшувалося за наявності інгібіторів ферментів синтезу NO, що може вказувати на роль нітроген оксиду у реалізації стрес-протекторної дії ГАМК (Xie et al., 2021).

Слід зауважити, що в літературі досі відсутні дані, отримані молекулярно-генетичними методами, які б підтверджували участь NO у захисних реакціях рослин під дією ГАМК (Kolupaev et al., 2024a). Разом із тим, метаболомні дослідження свідчать, що NO та ГАМК, проявляючи захисні ефекти, можуть активувати як спільні, так і різні метаболічні шляхи (Kabała, Janicka, 2024). Водночас залишається невивченою можлива взаємодія між NO та іншими ключовими сигнальними посередниками у формуванні NO-опосередкованих адаптивних реакцій рослин під впливом ГАМК.

### **5.3. Індукування проростання зернівок пшениці і тритикале зі зниженою схожістю праймінгом ГАМК**

Зниження життєздатності насіння з віком визначає термін його придатності до використання. Покращення цієї властивості має велике значення не лише для підвищення врожайності сільськогосподарських культур, але й для збереження генетичного різноманіття природних видів (Pirredda et al., 2024). Тривалість підтримки схожості насіння залежить як від видових характеристик, так і від умов зберігання. Відомо, що висока

вологість та підвищена температура прискорюють процеси старіння насіння, що призводить до зниження його схожості (Probert et al., 2007). Одним із способів підвищення схожості є праймінг насіння, який може бути застосований навіть для поліпшення проростання старого матеріалу.

Процеси проростання супроводжуються посиленням генерації АФО, які беруть участь у формуванні редокс-сигналів, необхідних для запуску ростових процесів (Kranner et al., 2010). Проте надмірне утворення АФО в зернівках може прискорювати їх старіння (Zhang et al., 2021). При неправильному зберіганні насіння, яке сприяє його передчасному старінню, активуються процеси ПОЛ, що призводять до ушкодження мембран (Kurek et al., 2019). Окиснювальний стрес також викликає характерне для старіючого насіння карбонілювання білків (Rajjou et al., 2008) і навіть пошкодження ДНК (Kurek et al., 2019; Afzal, 2023).

Беручи до уваги значну роль окиснювальних ушкоджень у процесах старіння насіння, можна припустити, що застосування антиоксидантів або сполук, здатних активувати антиоксидантні механізми, може сприяти нормальному проростанню зернівок. Відомі дані про позитивний вплив відновленого глутатіону, аскорбінової кислоти та їх комбінації на проростання старих зернівок вівса (Xia et al., 2020). Також показано, що обробка насіння мелатоніном, який володіє високою антиоксидантною активністю, стимулювала проростання старих зернівок жита і тритикале (Kolupaev et al., 2024a). Як відзначалося у попередніх розділах, ГАМК здатна активувати різні компоненти антиоксидантної системи рослин. Так, обробка ГАМК насіння гарбуза лікарського (*Cucurbita pepo* subsp. *Pepo*), що зазнавало штучного старіння, перешкоджала зниженню вмісту ненасичених та поліненасичених жирних кислот і сприяла збереженню життєздатності насіння (Afshari, Seyyedi, 2020). Вплив праймінгу ГАМК на проростання старіючих зернівок пшениці, незважаючи на поширеність культури та її продовольчу значимість, на момент проведення нашого дослідження залишався невивченим. Також не було даних щодо впливу праймінгу ГАМК

на проростання зернівок тритикале, що характеризується швидким зниженням схожості при зберіганні в неоптимальних умовах (Kolupaev et al., 2024a).

З урахуванням викладеного, одним із завдань роботи було вивчення впливу праймінгу ГАМК на проростання зернівок пшениці та тритикале, які зазнали природного старіння, а також оцінка дії ГАМК на стан антиоксидантної системи.

Встановлено, що обробка насіння розчинами ГАМК у концентраціях 0,2, 1 та 5 мМ підвищувала енергію проростання і схожість насіння як пшениці, так і тритикале (рис. 5.15, 5.16). Проте статистично достовірне ( $p \leq 0,05$ ) підвищення цих показників спостерігалось лише при концентрації 1 мМ ГАМК, тоді як ефекти 0,2 і 5 мМ проявлялися на рівні стійкої тенденції (рис. 5.16 А).

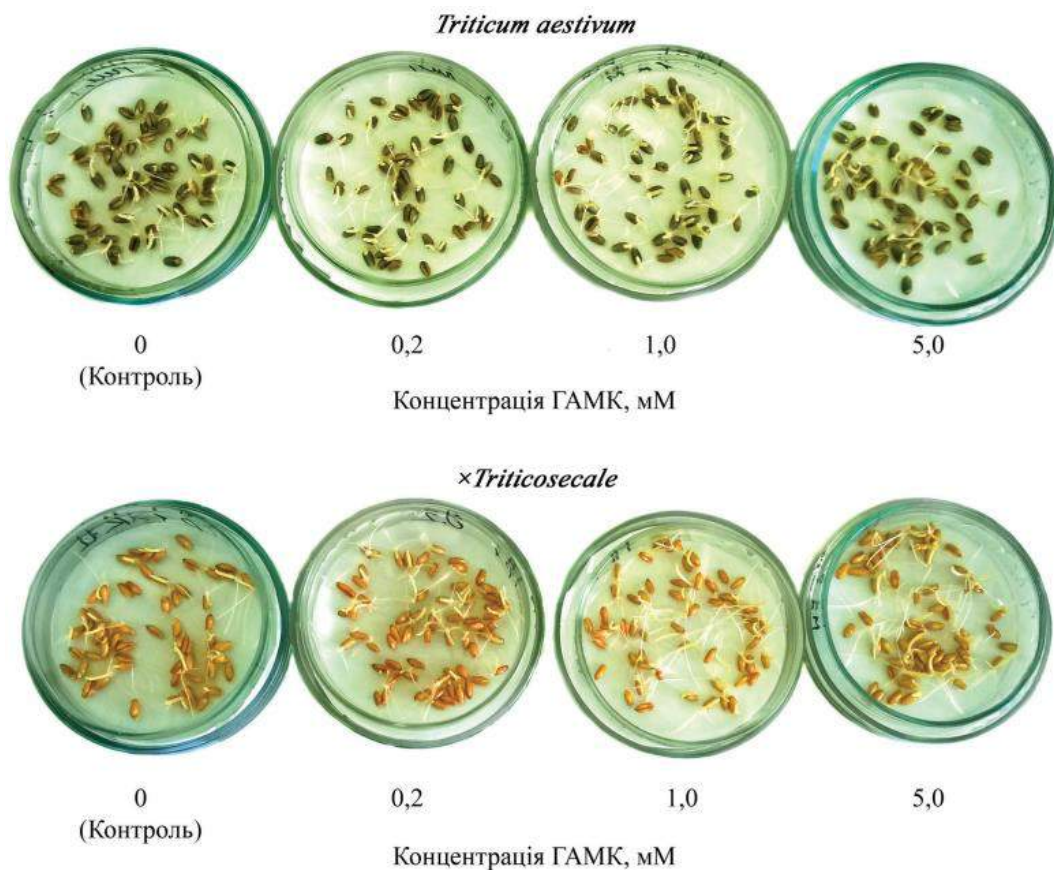


Рис. 5.15. Проростання зернівок пшениці і тритикале через 48 год перебування на вологому папері.

Праймування зернівок пшениці розчинами ГАМК у концентраціях 0,2 та 1 мМ стимулювало збільшення біомаси коренів проростків (рис. 5.16 Б), тоді як при підвищенні концентрації до 5 мМ цей ефект знижувався. Одночасно спостерігалось зростання біомаси пагонів проростків, проте статистично значуще підвищення ( $p \leq 0,05$ ) зафіксовано лише для концентрації 1 мМ. Аналогічні тенденції відзначалися й для загальної біомаси проростків пшениці, яка, вірогідно, зростала при обробці насіння розчинами ГАМК 0,2 та 1 мМ.

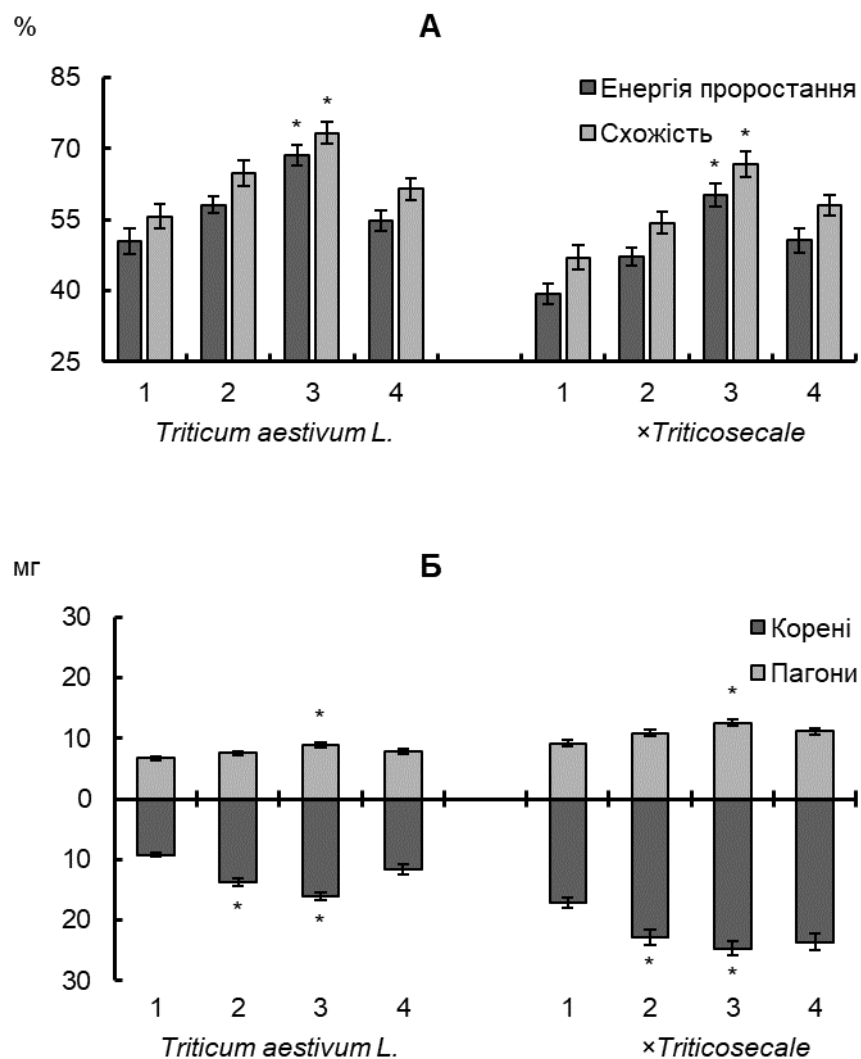


Рис. 5.16. Концентраційна залежність впливу праймінгу ГАМК на енергію проростання, схожість насіння (А) та біомасу органів проростків пшениці і тритикале (Б). 1 – Контроль; 2 – ГАМК (0,2 мМ); 3 – ГАМК (1 мМ); 4 – ГАМК (5 мМ).

У проростків тритикале спостерігалось підвищення накопичення біомаси коренів при обробці насіння ГАМК у концентраціях 1 і 5 мМ (рис. 5.16 Б), тоді як приріст біомаси пагонів був статистично значимим лише за концентрації 1 мМ. Загальна біомаса проростків у всіх трьох концентраціях ГАМК виявилась вірогідно більшою порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ ), проте найбільший ефект спостерігався саме при концентрації 1 мМ.

Для підтвердження специфічної дії ГАМК на проростання старих зернівок проведено порівняльне дослідження впливу 1 мМ ГАМК та альфа-амінокислот — гліцину і валіну в тій самій концентрації (рис. 5.17).

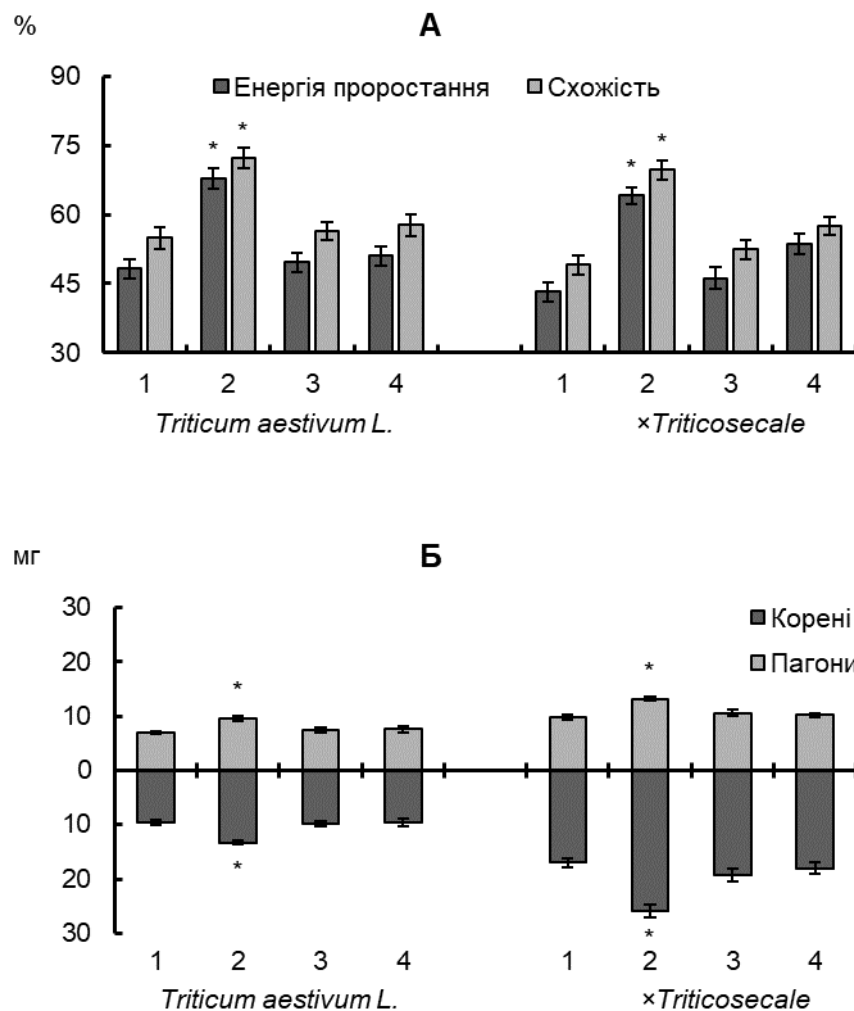


Рис. 5.17. Порівняння впливу праймінгу ГАМК і  $\alpha$ -амінокислотами в концентраціях 1 мМ на енергію проростання (А) та біомасу органів проростків пшениці і тритикале (Б). 1 – Контроль; 2 – ГАМК (1 мМ); 3 – Гліцин (1 мМ); 4 – Валін (1 мМ).

Праймінг зернівок пшениці і тритикале альфа-амінокислотами не викликав істотних змін енергії проростання та схожості насіння (рис. 5.17 А). Аналогічно, обробка гліцином і валіном практично не впливала на накопичення біомаси коренів, пагонів і загальної біомаси проростків (рис. 5.17).

Натомість праймінг насіння розчинами ГАМК зменшував прояви окиснювального стресу: відзначалося зниження генерації супероксидного аніон-радикала у пагонах як пшениці, так і тритикале (рис. 5.18 А), а також зменшувався вміст гідроген пероксиду в пагонах проростків обох видів злаків (рис. 5.18 Б).

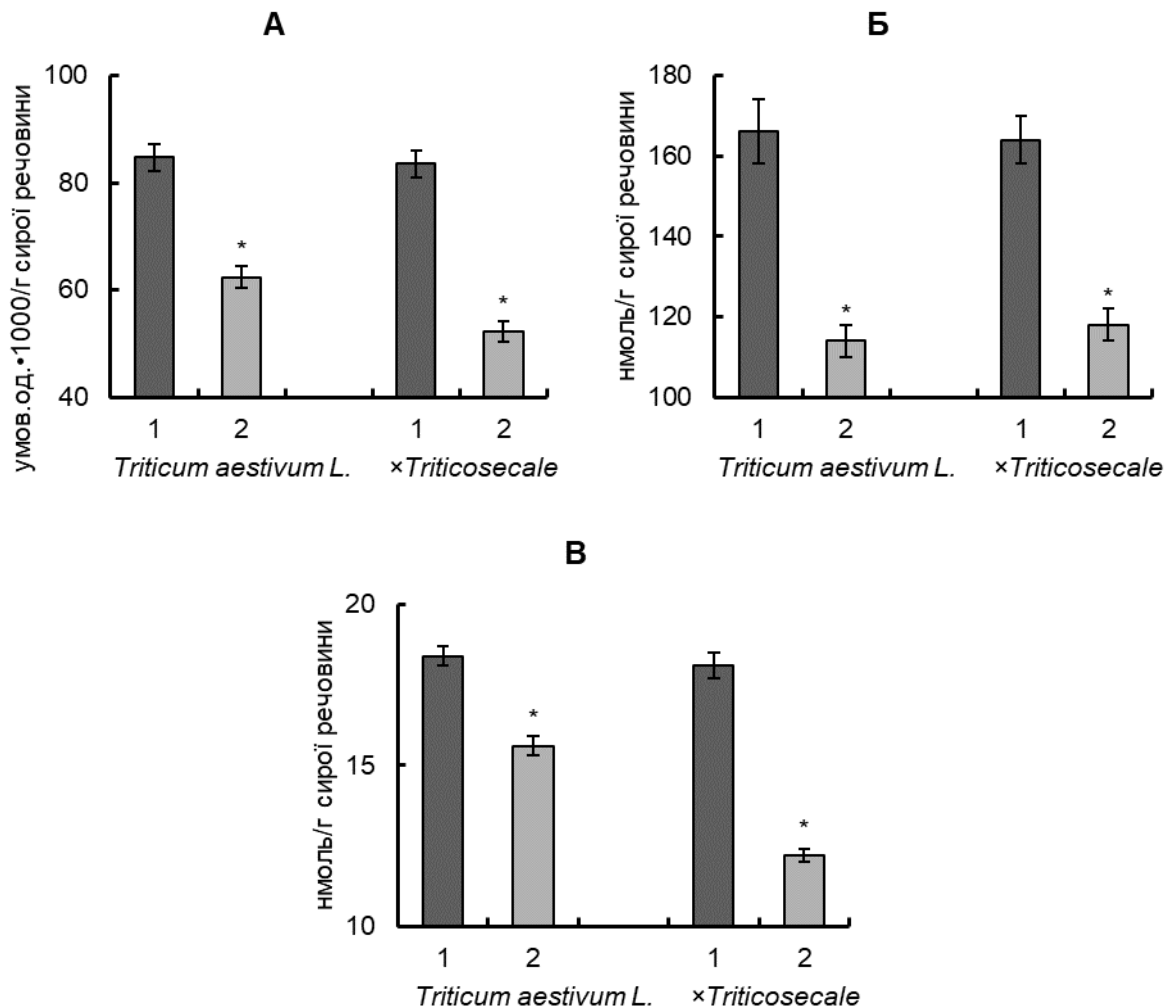


Рис. 5.18 Генерація супероксидного аніон-радикала (А) , вміст гідроген пероксиду (Б) і малонового діальдегіду (В) у пагонах проростків пшениці і тритикале. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (1 мМ).

Крім того, у проростків пшениці і тритикале, вирощених із зернівок, попередньо оброблених ГАМК, відзначалося зниження вмісту продукту ПОЛ МДА (рис. 5.18 В).

Праймінг насіння ГАМК практично не змінював активність СОД у пагонах проростків обох видів, хоча спостерігалася тенденція до невеликого її зниження (рис. 5.19, А). Водночас у пагонах проростків пшениці і тритикале зафіксовано істотне підвищення активності каталази (рис. 5.19, Б).

Активність гваяколпероксидази, ще одного ферменту, який бере участь у регуляції вмісту гідроген пероксиду, після обробки зернівок ГАМК у обох видів злаків залишалася без істотних змін (рис. 5.19, В).

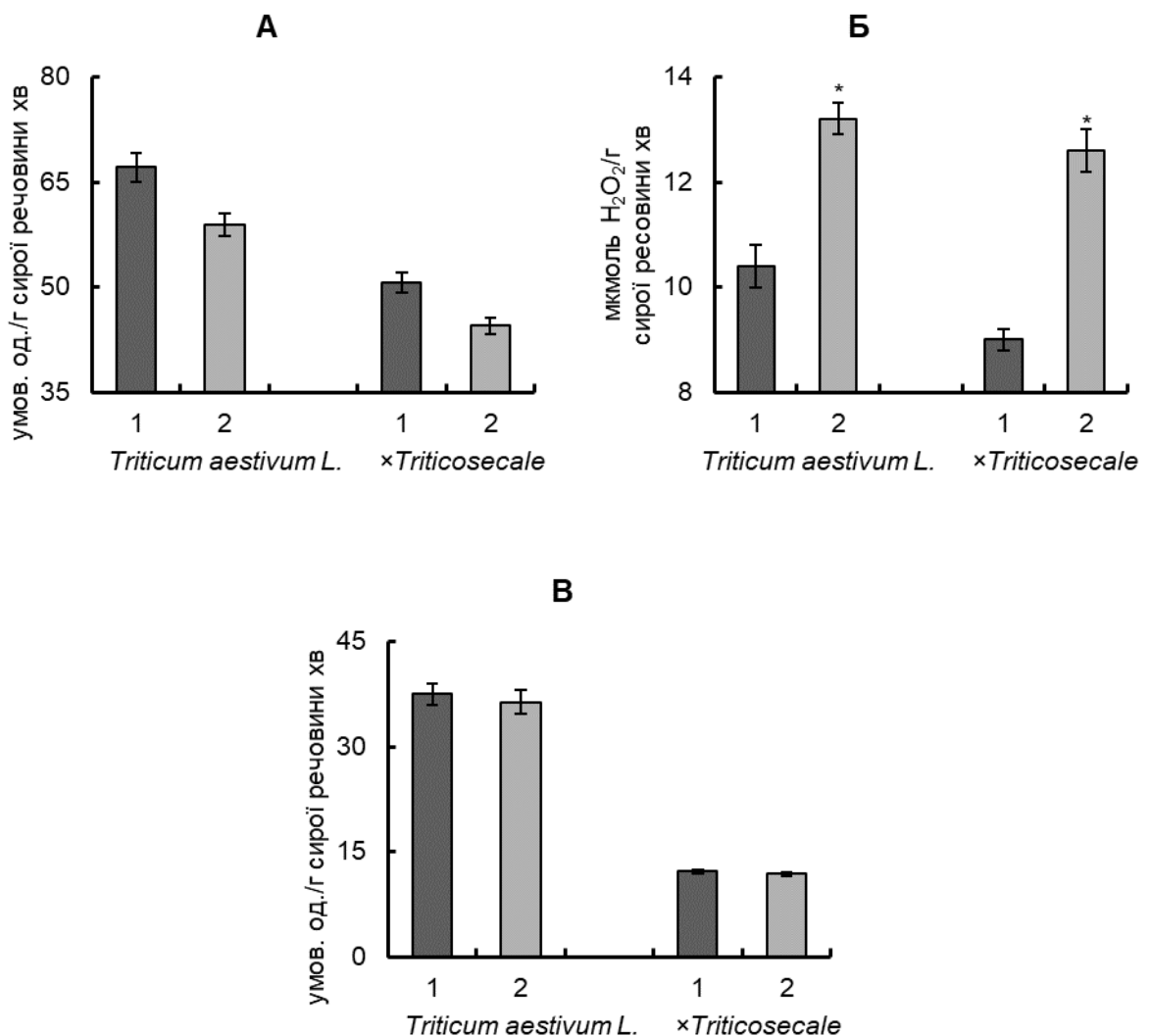


Рис. 5.19 Активність СОД (А) , каталази (Б) і гваяколпероксидази (В) у пагонах проростків пшениці і тритикале. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (1 мМ).

Як вже згадувалося, праймінг зернівок ГАМК, окрім впливу на активність антиоксидантних ферментів, може спричиняти й інші зміни, що підтримують антиоксидантний захист, зокрема стимулювати синтез вторинних метаболітів. У наших дослідях обробка зернівок пшениці ГАМК помітно підвищувала загальний вміст фенольних сполук (рис. 5.20, А). Водночас у тритикале такий ефект не спостерігався. Протилежна тенденція проявлялася у змінах вмісту антоціанів у пагонах проростків після праймінгу 1 мМ ГАМК. Для пшениці обробка насіння не впливала на рівень антоціанів, тоді як у проростках тритикале спостерігалось значне — майже дворазове — збільшення їхнього вмісту (рис. 5.20, Б).

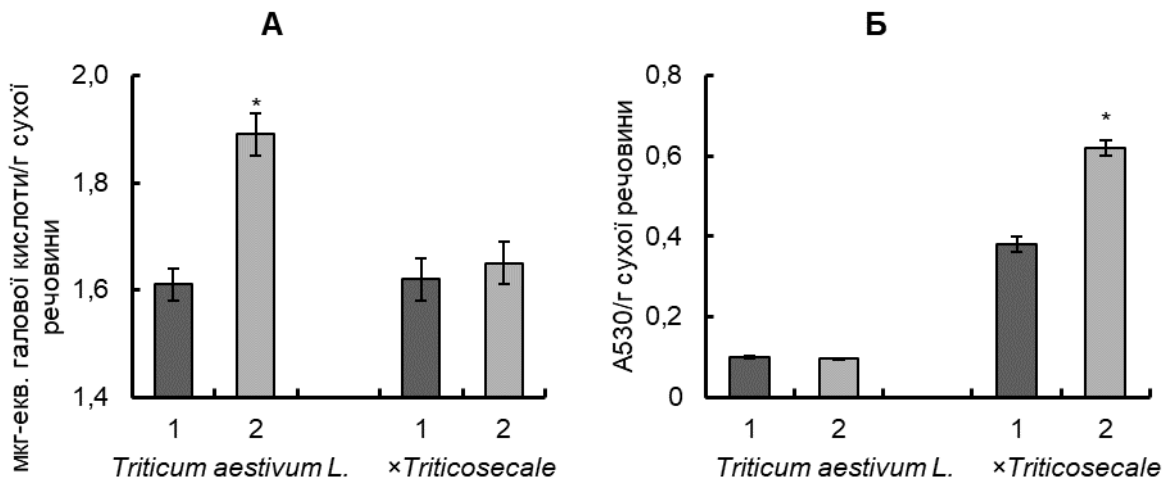


Рис. 5.20 Вміст фенольних сполук (А) і антоціанів (Б) у пагонах проростків пшениці і тритикале. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (1 мМ).

Отримані дані свідчать, що праймінг зернівок пшениці та тритикале, які мали знижені посівні якості через тривале зберігання в несприятливих умовах, підвищує їх схожість і енергію проростання. Крім того, у проростках, вирощених із насіння, обробленого ГАМК, відзначалися більші, ніж у контролі (гідропраймінг), показники біомаси коренів і пагонів.

Оскільки найбільш ефективними виявилися відносно високі концентрації ГАМК (оптимальна — 1 мМ), для підтвердження специфічності її дії порівняли ефекти праймінгу зернівок ГАМК із впливом звичайних L-

форм альфа-амінокислот — гліцину і валіну. Жодна з цих амінокислот істотно не впливала на проростання насіння та накопичення біомаси органами проростків пшениці і тритикале (рис. 5.17). Це дає підстави вважати, що ГАМК чинить специфічний регуляторний ефект, який не пов'язаний із її використанням як додаткового джерела нітрогену під час проростання зернівок.

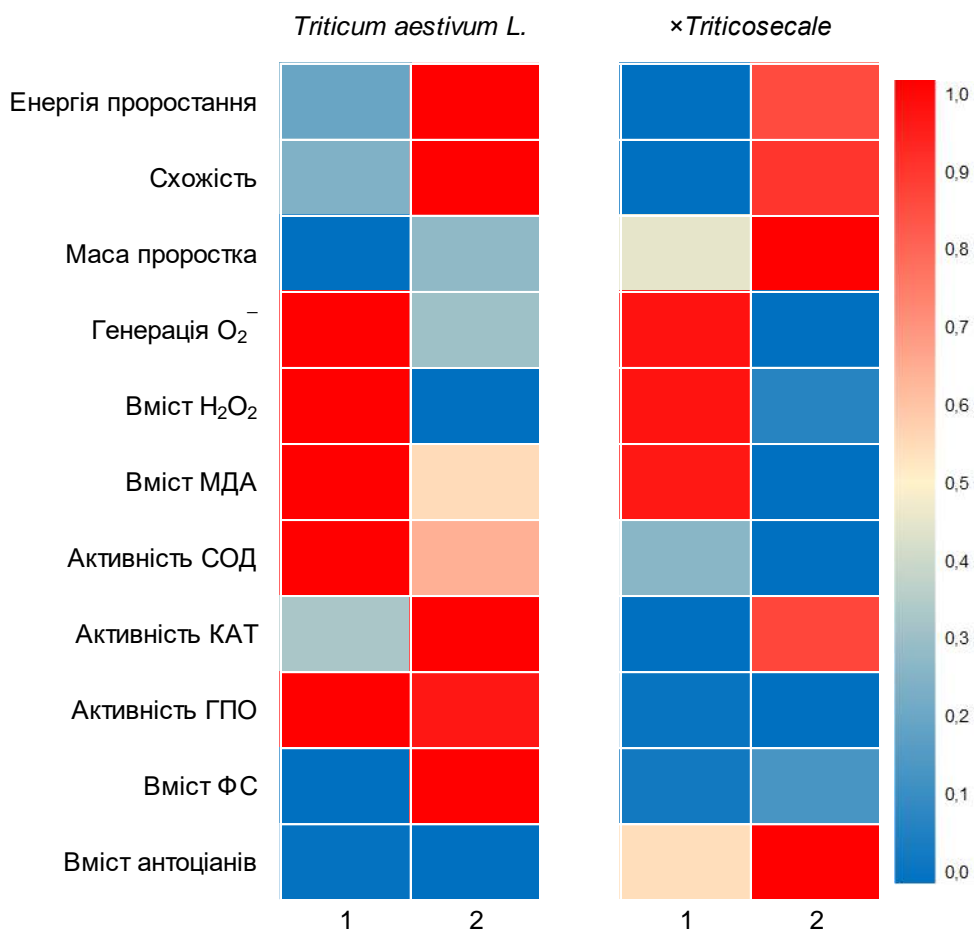


Рис. 5.21 Теплова карта змін ростових показників і стану антиоксидантної системи проростків пшениці і тритикале за дії 1 мМ ГАМК. 1 – Контроль; 2 – ГАМК (1 мМ).

У цілому, одним із ключових чинників, що сприяє підвищенню схожості насіння та накопиченню біомаси проростками під впливом ГАМК, можна вважати зменшення інтенсивності окиснювального стресу, яке зумовлене підвищенням активності каталази та посиленням синтезу вторинних метаболітів із антиоксидантними властивостями.

Інтерпретуючи ці дані, можна припустити, що ГАМК під час поглинання зернівками може діяти й безпосередньо як антиоксидант. Її здатність нейтралізувати агресивні активні форми кисню відома з літератури: ще в системах *in vitro* встановлено, що ГАМК зв'язує один із найреактивніших радикалів — гідроксильний (Smirnoff, Cumbes, 1989), що зазвичай знешкоджується лише дією неферментативних антиоксидантів.

Ще один шлях, через який ГАМК може зменшувати окиснювальний стрес, пов'язаний із активацією ГАМК-шунту. За стресових умов цикл трикарбонових кислот може пригнічуватися, що порушує дихання і підвищує генерацію АФО (Bouche et al., 2003). ГАМК-шунт здатний постачати відновники НАДН або сукцинат, компенсуючи стресові порушення циклу і підтримуючи функціонування дихального ланцюга, одночасно зменшуючи надмірну генерацію АФО (Kolupaev et al., 2024c).

Таким чином, праймінг зернівок ГАМК активує широкий спектр фізіолого-біохімічних процесів: він посилює ГАМК-шунт у мітохондріях, підтримує редокс-гомеостаз, стимулює утворення відновників, синтез низькомолекулярних антиоксидантів та експресію генів антиоксидантних ферментів.

## **Висновки до розділу 5**

Праймінг насіння пшениці ГАМК сприяє його проростанню в умовах модельної посухи та сольового стресу. Такий ефект пов'язаний з пом'якшенням під впливом ГАМК проявів окислювального стресу та збільшенням обводнення тканин.

Вперше встановлено, 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. Усі перелічені захисні ефекти ГАМК не проявлялися в присутності скавенджера NO метиленового синього. Водночас за дії ГАМК відбувалося зростання ендогенного вмісту NO у пагонах, а обробка насіння донором нітроген оксиду НПН призводила до фізіологічних ефектів, схожих на спричинювані дією ГАМК.

Праймінг старих зернівок пшениці і тритикале ГАМК істотно підвищував енергію проростання, схожість насіння та ріст проростків. Однією з причин підвищення схожості насіння досліджуваних злаків під впливом ГАМК може бути пом'якшення окиснювального стресу, що розвивається при проростанні старіючого насіння. На це вказує зменшення генерації супероксидного аніон-радикала та вмісту пероксиду водню і МДА у проростках. Ймовірно, цей ефект зумовлений менш інтенсивним стохастичним утворенням АФО за обробки ГАМК та посиленням під її впливом функціонування окремих складових антиоксидантної системи, зокрема, підвищенням активності каталази у обох видів злаків, зростанням загального вмісту фенольних речовин у пшениці і антоціанів у тритикале. Отже, праймінг зернівок злаків ГАМК може бути ефективним біотехнологічним прийомом для посилення їх проростання.

## ВИСНОВКИ

Встановлено ефекти підвищення стійкості зернових злаків – пшениці і тритикале – до основних абіотичних стресорів (високих температур, посухи і сольового стресу) під впливом екзогенної ГАМК. Стрес-протекторна дія ГАМК пов'язана з її впливом на сигнальні процеси, до яких залучаються АФО, іони кальцію і нітроген оксид, і, як наслідок, активацією основних клітинних захисних систем – антиоксидантної та осмопротекторної. Особливо помітно стрес-протекторні ефекти ГАМК виявлялися за праймінгу насіння її розчинами. При цьому ГАМК сприяла проростанню насіння і росту рослин за стресових умов, а також поліпшувала схожість старого насіння культурних злаків.

1. Обробка проростків пшениці ГАМК в концентрації 0,5 та 1 мМ підвищувала їх виживаність після ушкоджувального нагрівання у водяному термостаті (45 °С, 10 хв) та істотно зменшувала інгібування росту проростків за дії модельної посухи (інкубація на 15% розчині ПЕГ 6000). Водночас обробка ГАМК сприяла підвищенню відносного вмісту води у тканинах за стресових умов. Більш помітний стрес-протекторний вплив ГАМК виявлено на чутливому до посухи сорті пшениці.

2. Під впливом екзогенної 0,5 мМ ГАМК зменшувалося інгібування росту органів проростків тритикале за модельної посухи (вплив 15% ПЕГ 6000), сольового стресу (100 мМ NaCl) та комбінованої дії цих чинників. Обробка ГАМК зменшувала ефект втрати води органами проростків за вказаних стресів та їх комбінації.

3. Встановлено залучення АФО та іонів кальцію як сигнальних посередників в індуковане ГАМК підвищення теплостійкості проростків пшениці. Про це свідчить транзиторне підвищення вмісту гідроген пероксиду у коренях проростків із наступним зростанням активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази і гваяколпероксидази) та усунення цих ефектів дією скавенджера гідроген пероксиду ДМТС та інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом. Також встановлено, що антагоністи кальцію (ЕГТА і неоміцин) модулювали ефекти індукованого ГАМК підвищення вмісту гідроген пероксиду і активності антиоксидантних ферментів. При цьому стрес-протекторна дія ГАМК, що визначалася за рівнем розвитку окиснювального стресу, ушкодженням мембран та виживаністю проростків, повністю усувалася обробкою ДМТС та змінювалася у присутності кальцієвих антагоністів.

4. За умов модельної посухи у проростках стійкого і чутливого сортів пшениці під впливом 0,5 мМ ГАМК зменшувався прояв окиснювального стресу, стабілізувалися показники активності СОД, вмісту розчинних вуглеводів та антоціанів. У той же час ГАМК сприяла підвищенню активності гваяколпероксидази, вмісту проліну та фенольних сполук у чутливого до посухи сорту і слабо впливала на ці показники у стійкого сорту, що вказує на диференційований прояв стрес-протекторної дії ГАМК, залежний від адаптивних стратегій сортів.

5. Під впливом екзогенної 0,5 мМ ГАМК у етіюльованих проростків тритикале за умов модельної посухи, сольового стресу і комбінованої дії цих чинників зменшувалися генерація АФО та накопичення МДА. Водночас за дії ГАМК зростала активність антиоксидантних ферментів у фізіологічно нормальних та стресових умовах, посилювалося накопичення проліну, фенольних сполук та антоціанів, а також стабілізувався пул розчинних вуглеводів на фоні осмотичних стресів.

6. Праймінг насіння та фоліарна обробка ГАМК у діапазоні концентрацій 0,1-2,5 мМ рослин пшениці, що зазнавали впливу посухи (30% від повної вологоємності) у віці 7–12 днів, значно зменшували інгібування росту, сприяли підвищенню відносного вмісту води та збереженню пулу фотосинтетичних пігментів в листках. Екзогенна ГАМК запобігала розвитку окислювального стресу, стабілізуючи активність антиоксидантних ферментів – СОД, каталази і гваяколпероксидази. Також обробка ГАМК викликала підвищення вмісту осмолітів – цукрів і розчинних білків у листках, водночас знижуючи накопичення проліну. Праймінг насіння чинив більш помітний позитивний вплив на ріст рослин і стан стрес-протекторних систем рослин пшениці порівняно з фоліарною обробкою.

7. Праймінг зернівок пшениці 0,5 мМ ГАМК підвищував схожість та енергію проростання насіння в умовах осмотичного (15% ПЕГ 6000) та сольового (150 мМ NaCl) стресів. Такий ефект пов'язаний зі зменшенням під впливом ГАМК розвитку окислювального стресу, стабілізацією вмісту розчинних вуглеводів та збільшенням обводненості тканин.

8. Показано, що індукування праймінгом ГАМК проростання насіння і росту проростків пшениці за умов осмотичного стресу опосередковане нітроген оксидом. Такі ефекти зумовлені залежним від NO зростанням під впливом ГАМК активності амілази у зернівках і накопиченням цукрів у пагонах проростків та підвищенням вмісту вторинних метаболітів. Вказані захисні ефекти ГАМК не проявлялися в присутності скавенджера NO метиленового синього. Водночас за дії ГАМК відбувалося зростання ендогенного вмісту NO у пагонах, а обробка насіння донором нітроген оксиду НПН призводила до фізіологічних ефектів, схожих на спричинювані дією ГАМК.

9. Праймінг старих зернівок пшениці і тритикале 1 мМ ГАМК підвищував енергію проростання, схожість насіння та ріст проростків, що може бути пов'язане з пом'якшенням окиснювального стресу, який розвивається при проростанні старіючого насіння. Такі ефекти ГАМК ймовірно зумовлені посиленням під її впливом функціонування антиоксидантної системи, зокрема, підвищенням активності каталази у обох видів злаків, зростанням загального вмісту фенольних речовин у пшениці і антоціанів у тритикале.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Abbasi Khalaki, M., Moameri, M., Asgari Lajayer, B., & Astatkie, T. (2021). Influence of nano-priming on seed germination and plant growth of forage and medicinal plants. *Plant Growth Regulation*, 93(1), 13–28. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00670-9>
- Abd El-Gawad, H. G., Mukherjee, S., Farag, R., Abd Elbar, O. H., Hikal, M., Abou El-Yazied, A., Abd Elhady, S. A., Helal, N., ElKelish, A., el Nahhas, N., Azab, E., Ismail, I. A., Mbarki, S., & Ibrahim, M. F. M. (2021). Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-induced signaling events and field performance associated with mitigation of drought stress in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Signaling & Behavior*, 16(2), 1853384. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1853384>
- Abdel Razik, E. S., Alharbi, B. M., Pirzadah, T. B., Alnusairi, G. S. H., Soliman, M. H., & Hakeem, K. R. (2021).  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) mitigates drought and heat stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by regulating its physiological, biochemical and molecular pathways. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 505–527. <https://doi.org/10.1111/ppl.13216>
- Abobatta, W. F. (2020). *Plant Responses and Tolerance to Combined Salt and Drought Stress* (pp. 17–52). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-40277-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-40277-8_2)
- Afzal., I. (2023). Seed priming: what's next? *Seed Science and Technology*, 51(3), 379–405. <https://doi.org/10.15258/sst.2023.51.3.10>
- Ahanger, M. A., Aziz, U., Alsahli, A. A., Alyemeni, M. N., & Ahmad, P. (2019). Influence of Exogenous Salicylic Acid and Nitric Oxide on Growth, Photosynthesis, and Ascorbate-Glutathione Cycle in Salt Stressed *Vigna angularis*. *Biomolecules*, 10(1), 42. <https://doi.org/10.3390/biom10010042>
- Akula, R., & Mukherjee, S. (2020). New insights on neurotransmitters signaling mechanisms in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 15(6), 1737450. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1737450>

- Al Ghafri, S. H., Al-Busaidi, W. M., & Farooq, M. (2025). Enhancing Drought Tolerance in Bread Wheat Through GABA Seed Priming and Optimized Storage Temperatures. *Journal of Plant Growth Regulation*, *44*(7), 3536–3544. <https://doi.org/10.1007/s00344-025-11634-6>
- AL-Hakeem, H. F. H., & Khan, M. (2025). The role of statistics in advancing nitric oxide research in plant biology: from data analysis to mechanistic insights. *Frontiers in Plant Science*, *16*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1597030>
- Alvarez, M. E., Savouré, A., & Szabados, L. (2022). Proline metabolism as regulatory hub. *Trends in Plant Science*, *27*(1), 39–55. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.07.009>
- Ansari, M. I., Jalil, S. U., Ansari, S. A., & Hasanuzzaman, M. (2021). GABA shunt: a key-player in mitigation of ROS during stress. *Plant Growth Regulation*, *94*(2), 131–149. <https://doi.org/10.1007/s10725-021-00710-y>
- Arora, D., Jain, P., Singh, N., Kaur, H., & Bhatla, S. C. (2016). Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants. *Free Radical Research*, *50*(3), 291–303. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1118473>
- Ashraf, M. A., Rasheed, R., Hussain, I., Iqbal., M., Riaz, M., & Arif, M. S. (2019). Chemical Priming for Multiple Stress Tolerance. In *Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings* (pp. 385–415). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8625-1\\_19](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8625-1_19)
- Ashraf, U., Anjum, S. A., Naseer, S., Abbas, A., Abrar, M., Nawaz, M., & Luo, K. (2024). Gamma amino butyric acid (GABA) application modulated the morpho-physiological and yield traits of fragrant rice under well-watered and drought conditions. *BMC Plant Biology*, *24*(1), 569. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05272-5>
- Astier, J., Gross, I., & Durner, J. (2018). Nitric oxide production in plants: an update. *Journal of Experimental Botany*, *69*(14), 3401–3411. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx420>

- Aswathi, K. P. R., Kalaji, H. M., & Puthur, J. T. (2022). Seed priming of plants aiding in drought stress tolerance and faster recovery: a review. *Plant Growth Regulation*, *97*(2), 235–253. <https://doi.org/10.1007/s10725-021-00755-z>
- Atak, M., Ertekin, İ., & Atış, İ. (2023). Screening For Salt Tolerance of 12 Turkish Triticale Cultivars during Germination and Early Seedling Stage. *Black Sea Journal of Agriculture*, *6*(5), 500–510. <https://doi.org/10.47115/bsagriculture.1304836>
- Badr, A., Basuoni, M. M., Ibrahim, M., Salama, Y. E., Abd-Ellatif, S., Abdel Razek, E. S., Amer, K. E., Ibrahim, A. A., & Zayed, E. M. (2024). 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 Biology*, *24*(1), 605. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05264-5>
- Bai, X., Yang, L., Tian, M., Chen, J., Shi, J., Yang, Y., & Hu, X. (2011). Nitric Oxide Enhances Desiccation Tolerance of Recalcitrant *Antiaris toxicaria* Seeds via Protein S-Nitrosylation and Carbonylation. *PLoS ONE*, *6*(6), e20714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020714>
- Bakhoun, G. Sh., Sadak, M. Sh., & Thabet, M. S. (2023). Induction of Tolerance in Groundnut Plants Against Drought Stress and *Cercospora* Leaf Spot Disease with Exogenous Application of Arginine and Sodium Nitroprusside Under Field Conditions. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *23*(4), 6612–6631. <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01514-x>
- Bashir, K., Todaka, D., Sako, K., Ueda, M., Aziz, F., & Seki, M. (2025). Chemical application improves stress resilience in plants. *Plant Molecular Biology*, *115*(2), 47. <https://doi.org/10.1007/s11103-025-01566-w>
- Basit, F., Alyafei, M., Hayat, F., Al-Zayadneh, W., El-Keblawy, A., Sulieman, S., & Sheteiwy, M. S. (2025). Deciphering the role of glycine betaine in enhancing plant performance and defense mechanisms against environmental stresses. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 16). <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1582332>

- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1229–1240. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert375>
- Begara-Morales, J. C., Chaki, M., Sánchez-Calvo, B., Mata-Pérez, C., Leterrier, M., Palma, J. M., Barroso, J. B., & Corpas, F. J. (2013). Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence. *Journal of Experimental Botany*, 64(4), 1121–1134. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert006>
- Ben Rejeb, K., Lefebvre-De Vos, D., le Disquet, I., Leprince, A., Bordenave, M., Maldiney, R., Jdey, A., Abdelly, C., & Savouré, A. (2015). Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 208(4), 1138–1148. <https://doi.org/10.1111/nph.13550>
- Bethke, Paul C., Gubler, F., Jacobsen, John V., & Jones, Russell L. (2004). Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta*, 219(5). <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1282-x>
- Bhardwaj, A., Sita, K., Sehgal, A., Bhandari, K., Kumar, S., Prasad, P. V. V., Jha, U., Kumar, J., Siddique, K. H. M., & Nayyar, H. (2021). Heat Priming of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Seeds and Foliar Treatment with  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA), Confers Protection to Reproductive Function and Yield Traits under High-Temperature Stress Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5825. <https://doi.org/10.3390/ijms22115825>
- Blum, A. (2014). The abiotic stress response and adaptation of triticale — A review. *Cereal Research Communications*, 42(3), 359–375. <https://doi.org/10.1556/CRC.42.2014.3.1>

- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírveda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Bor, M., & Turkan, I. (2019). Is there a room for GABA in ROS and RNS signalling? *Environmental and Experimental Botany*, 161, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.015>
- Bouché, N., Fait, A., Bouchez, D., Møller, S. G., & Fromm, H. (2003). Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the  $\gamma$ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), 6843–6848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1037532100>
- Chae, L., Sudat, S., Dudoit, S., Zhu, T., & Luan, S. (2009). Diverse Transcriptional Programs Associated with Environmental Stress and Hormones in the Arabidopsis Receptor-Like Kinase Gene Family. *Molecular Plant*, 2(1), 84–107. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn083>
- Cheng, B., Li, Z., Liang, L., Cao, Y., Zeng, W., Zhang, X., Ma, X., Huang, L., Nie, G., Liu, W., & Peng, Y. (2018). 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. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2520. <https://doi.org/10.3390/ijms19092520>
- Che-Othman, M. H., Jacoby, R. P., Millar, A. H., & Taylor, N. L. (2020). Wheat mitochondrial respiration shifts from the tricarboxylic acid cycle to the  $\gamma$ -aminobutyrate shunt under salt stress. *New Phytologist*, 225(3), 1166–1180. <https://doi.org/10.1111/nph.15713>

- Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J.-K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, *12*(10), 444–451. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.07.002>
- Clark, D., Durner, J., Navarre, D. A., & Klessig, D. F. (2000). Nitric Oxide Inhibition of Tobacco Catalase and Ascorbate Peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interactions*<sup>®</sup>, *13*(12), 1380–1384. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.12.1380>
- Correa-Aragunde, N., Foresi, N., & Lamattina, L. (2015). Nitric oxide is a ubiquitous signal for maintaining redox balance in plant cells: regulation of ascorbate peroxidase as a case study. *Journal of Experimental Botany*, *66*(10), 2913–2921. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv073>
- Dabravolski, S. A., & Isayenkov, S. v. (2023). The Role of the  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) in Plant Salt Stress Tolerance. *Horticulturae*, *9*(2), 230. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9020230>
- Dehghanian, Z., Ahmadabadi, M., Asgari Lajayer, B., Bagheri, N., Chamani, M., Gougerdchi, V., Hamedpour-Darabi, M., Shu, W., Price, G. W., & Dell, B. (2024). Role of Neurotransmitters (Biomediators) in Plant Responses to Stress. In *Plants* (Vol. 13, Issue 22). <https://doi.org/10.3390/plants13223134>
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., & Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, *394*(6693), 585–588. <https://doi.org/10.1038/29087>
- Dong, Q., Wallrad, L., Almutairi, B. O., & Kudla, J. (2022). Ca<sup>2+</sup> signaling in plant responses to abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, *64*(2), 287–300. <https://doi.org/10.1111/jipb.13228>
- Duan, P., Ding, F., Wang, F., & Wang, B. S. (2007). Priming of seeds with nitric oxide donor sodium nitroprusside (SNP) alleviates the inhibition on wheat seed germination by salt stress. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, *33*(3), 244–250.

- Durner, J., Wendehenne, D., & Klessig, D. F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 10328–10333. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.10328>
- Ellouzi, H., Sghayar, S., & Abdelly, C. (2017). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seed priming improves tolerance to salinity; drought and their combined effect more than mannitol in *Cakile maritima* when compared to *Eutrema salsugineum*. *Journal of Plant Physiology*, 210, 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.11.014>
- Farnese, F. S., Menezes-Silva, P. E., Gusman, G. S., & Oliveira, J. A. (2016). When Bad Guys Become Good Ones: The Key Role of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in the Plant Responses to Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00471>
- Farooq, M., Nawaz, A., Chaudhry, M. A. M., Indrasti, R., & Rehman, A. (2017). Improving resistance against terminal drought in bread wheat by exogenous application of proline and gamma-aminobutyric acid. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 203(6), 464–472. <https://doi.org/10.1111/jac.12222>
- Farooq, M., Romdhane, L., al Sulti, M. K. R. A., Rehman, A., Al-Busaidi, W. M., & Lee, D. (2020). Morphological., physiological and biochemical aspects of osmopriming-induced drought tolerance in lentil. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 206(2), 176–186. <https://doi.org/10.1111/jac.12384>
- 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 and Chaperones*, 19(1), 83–90. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0436-9>
- Flores, H. E., & Filner, P. (1985). Polyamine catabolism in higher plants: Characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Regulation*, 3(3–4), 277–291. <https://doi.org/10.1007/BF00117586>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2016). Stress-triggered redox signalling: what's in pROSpect? *Plant, Cell & Environment*, 39(5), 951–964. <https://doi.org/10.1111/pce.12621>

- Foyer, C. H., & Shigeoka, S. (2011). Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. *Plant Physiology*, *155*(1), 93–100. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166181>
- Fraudentali, I., Rodrigues-Pousada, R. A., Angelini, R., Ghuge, S. A., & Cona, A. (2021). Plant Copper Amine Oxidases: Key Players in Hormone Signaling Leading to Stress-Induced Phenotypic Plasticity. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(10), 5136. <https://doi.org/10.3390/ijms22105136>
- Giesguth, M., Sahm, A., Simon, S., & Dietz, K.-J. (2015). Redox-dependent translocation of the heat shock transcription factor AtHSFA8 from the cytosol to the nucleus in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, *589*(6), 718–725. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.01.039>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Goharrizi, K. J., Hamblin, M. R., Karami, S., & Nazari, M. (2021). Physiological., biochemical., and metabolic responses of abiotic plant stress: salinity and drought. *TURKISH JOURNAL OF BOTANY*, *45*(SI-1), 623–642. <https://doi.org/10.3906/bot-2108-30>
- Gong, B., & Shi, Q. (2019). Identifying S-nitrosylated proteins and unraveling S-nitrosoglutathione reductase-modulated sodic alkaline stress tolerance in *Solanum lycopersicum* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, *142*, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.06.020>
- Gupta, K. J., Kaladhar, V. C., Fitzpatrick, T. B., Fernie, A. R., Møller, I. M., & Loake, G. J. (2022). Nitric oxide regulation of plant metabolism. *Molecular Plant*, *15*(2), 228–242. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.12.012>
- Gupta, K. J., Kumari, A., Florez-Sarasa, I., Fernie, A. R., & Iqambariev, A. U. (2018). Interaction of nitric oxide with the components of the plant mitochondrial electron transport chain. *Journal of Experimental Botany*, *69*(14), 3413–3424. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery119>

- Hancock, J. T., & Neill, S. J. (2019). Nitric Oxide: Its Generation and Interactions with Other Reactive Signaling Compounds. *Plants*, 8(2), 41. <https://doi.org/10.3390/plants8020041>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Parvin, K., Bhuiyan, T. F., Anee, T. I., Nahar, K., Hossen, Md. S., Zulfiqar, F., Alam, Md. M., & Fujita, M. (2020). Regulation of ROS Metabolism in Plants under Environmental Stress: A Review of Recent Experimental Evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8695. <https://doi.org/10.3390/ijms21228695>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S., Mahmud, J., Fujita, M., & Fotopoulos, V. (2020). Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
- Hossain, A., Skalicky, M., Brestic, M., Maitra, S., Ashraful Alam, M., Syed, M. A., Hossain, J., Sarkar, S., Saha, S., Bhadra, P., Shankar, T., Bhatt, R., Kumar Chaki, A., el Sabagh, A., & Islam, T. (2021). Consequences and Mitigation Strategies of Abiotic Stresses in Wheat (*Triticum aestivum* L.) under the Changing Climate. *Agronomy*, 11(2), 241. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020241>
- Jalil, S. U., & Ansari, M. I. (2020). *Physiological Role of Gamma-Aminobutyric Acid in Salt Stress Tolerance* (pp. 337–350). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-40277-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-40277-8_13)
- Jalil, S. U., Ansari, S. A., & Ansari, M. I. (2025). GABA as a Modulator of the Defense System Under Oxidative Stress. In *GABA Signaling System and Abiotic Stress Tolerance in Plants* (pp. 107–128). Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-95-0437-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-95-0437-4_5)
- Jeandroz, S., Wipf, D., Stuehr, D. J., Lamattina, L., Melkonian, M., Tian, Z., Zhu, Y., Carpenter, E. J., Wong, G. K.-S., & Wendehenne, D. (2016). Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Science Signaling*, 9(417). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad4403>

- Jiang, M., & Zhang, J. (2002). Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta*, *215*(6), 1022–1030. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0829-y>
- Jiang, X., Li, H., & Song, X. (2016). Seed priming with melatonin effects on seed germination and seedling growth in maize under salinity stress. *Pakistan Journal of Botany*. *Pakistan Journal of Botany*, *48*(4), 1345–1352.
- Jin, X., Liu, T., Xu, J., Gao, Z., & Hu, X. (2019). Exogenous GABA enhances muskmelon tolerance to salinity-alkalinity stress by regulating redox balance and chlorophyll biosynthesis. *BMC Plant Biology*, *19*(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1660-y>
- Jurkonienė, S., Gavelienė, V., Mockevičiūtė, R., Jankovska-Bortkevič, E., Šveikauskas, V., Jankauskienė, J., Žalnierius, T., & Kozeko, L. (2025). GABA and Proline Application Induce Drought Resistance in Oilseed Rape. *Plants*, *14*(6), 860. <https://doi.org/10.3390/plants14060860>
- Kabała, K., & Janicka, M. (2024). Relationship between the GABA Pathway and Signaling of Other Regulatory Molecules. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(19), 10749. <https://doi.org/10.3390/ijms251910749>
- Kankarla, V., Shukla, M. K., Picchioni, G. A., VanLeeuwen, D., & Schutte, B. J. (2020). Germination and Emergence Responses of Alfalfa, Triticale and Quinoa Irrigated with Brackish Groundwater and Desalination Concentrate. *Agronomy*, *10*(4), 549. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040549>
- Karle, S. B., Guru, A., Dwivedi, P., & Kumar, K. (2021). Insights into the Role of Gasotransmitters Mediating Salt Stress Responses in Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, *40*(6), 2259–2275. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10293-z>
- Karpets, Yu. v., Kolupaev, Yu. E., & Yastreb, T. O. (2015). Signal mediators at induction of heat resistance of wheat plantlets by short-term heating. *The Ukrainian Biochemical Journal*, *87*(6), 104–112. <https://doi.org/10.15407/ubj87.06.104>

- Karpets, Yu. v., Kolupaev, Yu. E., Yastreb, T. O., & Dmitriev, O. P. (2012). Possible pathways of heat resistance induction in plant cells by exogenous nitrogen oxide. *Cytology and Genetics*, 46(6), 354–359. <https://doi.org/10.3103/S0095452712060059>
- Khalid, S., Amanullah, al Tawaha, A. R. M., Nadia, Gunal., H., Al-Tawaha, A. R., Qotb, M. A., Karnwal., A., Nesterova, N., Singh, A., Rajput, V. D., Ghazaryan, K., Minkina, T., Ali, I., Shawaqfeh, S., Husaini, A. M., & Rashid, R. (2025). Impacts of climate change and drought stress on plant metabolome. In *Sustainable Agriculture under Drought Stress* (pp. 105–113). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-23956-4.00009-0>
- Khan, M., Ali, S., al Azzawi, T. N. I., & Yun, B.-W. (2023). Nitric Oxide Acts as a Key Signaling Molecule in Plant Development under Stressful Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4782. <https://doi.org/10.3390/ijms24054782>
- Khanna, R. R., Jahan, B., Iqbal., N., Khan, N. A., AlAjmi, M. F., Tabish Rehman, M., & Khan, M. I. R. (2021). GABA reverses salt-inhibited photosynthetic and growth responses through its influence on NO-mediated nitrogen-sulfur assimilation and antioxidant system in wheat. *Journal of Biotechnology*, 325, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.11.015>
- Kim, M. E., & Lee, J. S. (2025). Advances in the Regulation of Inflammatory Mediators in Nitric Oxide Synthase: Implications for Disease Modulation and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(3), 1204. <https://doi.org/10.3390/ijms26031204>
- Kim, M. J., Kwak, H. S., & Kim, S. S. (2018). Effects of Germination on Protein,  $\gamma$ -Aminobutyric Acid, Phenolic Acids, and Antioxidant Capacity in Wheat. *Molecules*, 23(9), 2244. <https://doi.org/10.3390/molecules23092244>
- Kim, S.-C., Guo, L., & Wang, X. (2020). Nuclear moonlighting of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates Arabidopsis response to heat stress. *Nature Communications*, 11(1), 3439. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17311-4>

- Klomsiri, C., Karplus, P. A., & Poole, L. B. (2011). Cysteine-Based Redox Switches in Enzymes. *Antioxidants & Redox Signaling*, *14*(6), 1065–1077. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3376>
- Kohli, S. K., Khanna, K., Bhardwaj, R., Abd\_Allah, E. F., Ahmad, P., & Corpas, F. J. (2019). Assessment of Subcellular ROS and NO Metabolism in Higher Plants: Multifunctional Signaling Molecules. *Antioxidants*, *8*(12), 641. <https://doi.org/10.3390/antiox8120641>
- Kolbert, Z., Barroso, J. B., Brouquisse, R., Corpas, F. J., Gupta, K. J., Lindermayr, C., Loake, G. J., Palma, J. M., Petřivalský, M., Wendehenne, D., & Hancock, J. T. (2019). A forty year journey: The generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide*, *93*, 53–70. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.09.006>
- Kolupaev, Y. E., & Karpets, Y. V. (2013). Participation of reactive oxygen species in formation of induced resistances of plants to abiotic stressors. In *Handbook on Reactive Oxygen Species (ROS): Formation Mechanisms, Physiological Roles and Common Harmful Effects*.
- Kolupaev, Y. E., Firsova, E. N., Yastreb, T. O., & Lugovaya, A. A. (2017). The Participation of calcium ions and reactive oxygen species in the induction of antioxidant enzymes and heat resistance in plant cells by hydrogen sulfide donor. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *53*(5). <https://doi.org/10.1134/S0003683817050088>
- Kolupaev, Y. E., Kokorev, O. I., Shevchenko, M. V., Marenych, M. M., & Kolomatska, V. P. (2024a). Participation of  $\gamma$ -aminobutyric acid in cell signaling processes and plant adaptation to abiotic stressors. *Studia Biologica*, *18*(1), 125–154. <https://doi.org/10.30970/sbi.1801.752>
- Kolupaev, Y. E., Ryabchun, N. I., Leonov, O. Yu., Kokorev, A. I., Taraban, D. A., Shakhov, I. v., Shkliarevskiy, M. A., & Yastreb, T. O. (2024b). Functioning of the antioxidant and osmoprotective systems of *Triticum aestivum* cultivars growing under soil drought conditions. *Botanica*, 102–116. <https://doi.org/10.35513/Botlit.2024.3.1>

- Kolupaev, Y. E., Taraban, D. A., Kokorev, A. I., Yastreb, T. O., Pysarenko, V. M., Sherstiuk, E., & Karpets, Y. V. (2024c). Effect of melatonin and hydropriming on germination of aged triticale and rye seeds. *Botanica*, 1–13. <https://doi.org/10.35513/Botlit.2024.1.1>
- Kolupaev, Y. E., Yastreb, T. O., Sali, A. M., Kokorev, A. I., Ryabchun, N. I., Zmiievska, O. A., & Shkliarevskyi, M. A. (2022a). State of antioxidant and osmoprotective systems in etiolated winter wheat seedlings of different cultivars due to their drought tolerance. *Zemdirbyste-Agriculture*, 109(4), 313–322. <https://doi.org/10.13080/z-a.2022.109.040>
- Kolupaev, Y. E., Yastreb, T. O., Yemets, A., & Blume, Y. (2025a). Nitric oxide functional relationships with nitrogen-containing stress metabolites: Role in plant adaptation to adverse abiotic factors. *Nitric Oxide*, 159, 126–146. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2025.10.003>
- Kolupaev, Y. E., Yastreb, T., Ryabchun, N., Kuzmyshyna, N., Shkliarevskyi, M., Barabolia, O., & Pysarenko, V. (2023). Response of triticum aestivum seedlings of different ecological and geographical origin to heat and drought: relationship with resistance to oxidative stress and osmolyte accumulation. *The Journal "Agriculture and Forestry,"* 69(2). <https://doi.org/10.17707/AgricultForest.69.2.07>
- Kolupaev, Y., Shakhov, I. V., Kokorev, A. I., Relina, L. I., Dyachenko, A. I., & Dmitriev, A. P. (2024d). Gamma-aminobutyric acid induction of triticale protective systems under drought, salt stress or a combination of the two. *Turkish Journal of Botany*, 48(5), 235–248. <https://doi.org/10.55730/1300-008X.2812>
- Kolupaev, Y.E., Kokorev, A.I., Kobyzeva, L.N., Sakhno, T.V., Barabolia, O., & Yastreb, T.O. (2025b). Priming with no donor sodium nitroprusside to activate germination and reduce oxidative damage in aged wheat and triticale seeds. *The Journal "Agriculture and Forestry,"* 71(1). <https://doi.org/10.17707/AgricultForest.71.1.01>

- Kolupaev, Y.E., Makaova, B.E., Ryabchun, N.I., Kokorev, A.I., Sakhno, T.V., Yastreb, T.O., & Marenych, M.M. (2022b). Adaptation of cereal seedlings to oxidative stress induced by hyperthermia. *The Journal "Agriculture and Forestry,"* 68(4). <https://doi.org/10.17707/AgricultForest.68.4.01>
- Kolupaev, Yu. E., Horielova, E. I., Yastreb, T. O., & Ryabchun, N. I. (2020). State of antioxidant system in triticale seedlings at cold hardening of varieties of different frost resistance. *Cereal Research Communications,* 48(2), 165–171. <https://doi.org/10.1007/s42976-020-00022-3>
- Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. v., & Dmitriev, A. P. (2015). Signal mediators in plants in response to abiotic stress: Calcium, reactive oxygen and nitrogen species. *Cytology and Genetics,* 49(5), 338–348. <https://doi.org/10.3103/S0095452715050047>
- Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. v., Beschasniy, S. P., & Dmitriev, A. P. (2019a). Gasotransmitters and Their Role in Adaptive Reactions of Plant Cells. *Cytology and Genetics,* 53(5), 392–406. <https://doi.org/10.3103/S0095452719050098>
- Kolupaev, Yu. E., Kokorev, A. I., & Dmitriev, A. P. (2022c). Polyamines: Involvement in Cellular Signaling and Plant Adaptation to the Effect of Abiotic Stressors. *Cytology and Genetics,* 56(2), 148–163. <https://doi.org/10.3103/S0095452722020062>
- Kolupaev, Yu. E., Kokorev, A. I., Yastreb, T. O., & Horielova, E. I. (2019b). Hydrogen peroxide as a signal mediator at inducing heat resistance in wheat seedlings by putrescine. *The Ukrainian Biochemical Journal.,* 91(6), 103–111. <https://doi.org/10.15407/ubj91.06.103>
- Kolupaev, Yu. E., Relina, L. I., Oboznyi, A. I., Ryabchun, N. I., Vasko, N. I., Kolomatska, V. P., & Leonov, O. Yu. (2025c). Stress metabolites in wheat: role in adaptation to drought. *The Ukrainian Biochemical Journal.,* 97(3), 13–41. <https://doi.org/10.15407/ubj97.03.013>

- Kosakivska, I. v., Vedenicheva, N. P., Babenko, L. M., Voytenko, L. v., Romanenko, K. O., & Vasyuk, V. A. (2022). Exogenous phytohormones in the regulation of growth and development of cereals under abiotic stresses. *Molecular Biology Reports*, *49*(1), 617–628. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06802-2>
- Kozeko, L. Y. (2019). The Role of HSP90 Chaperones in Stability and Plasticity of Ontogenesis of Plants under Normal and Stressful Conditions (*Arabidopsis thaliana*). *Cytology and Genetics*, *53*(2), 143–161. <https://doi.org/10.3103/S0095452719020063>
- Kozeko, L., Jurkoniene, S., & Jankovska-Bortkevič, E. (2024). GABA as a regulator of plant growth and stress tolerance. In *Regulation of Adaptive Responses in Plants* (pp. 259–284). Nova Science Publishers, Inc.
- Kranner, I., Minibayeva, F. v., Beckett, R. P., & Seal, C. E. (2010). What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist*, *188*(3), 655–673. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x>
- Kryzhanovsky, V. (2019). Household and biological peculiarities of wheat winds winters at Mankovsky variety testing station. *Naukovì Dopovidì Nacional'nogo Unìversitetu Bioresursiv ì Prirodokoristuvannâ Ukraïni*, (6(82)). <https://doi.org/10.31548/dopovidi2019.06.015>
- Kumar, A., Choudhary, A., Kaur, H., Javed, M., & Mehta, S. (2021). Plant Performance and Defensive Role of  $\gamma$ -Gamma Amino Butyric Acid Under Environmental Stress. In *Plant Performance Under Environmental Stress* (pp. 277–299). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-78521-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-78521-5_11)
- Kurek, K., Plitta-Michalak, B., & Ratajczak, E. (2019). Reactive Oxygen Species as Potential Drivers of the Seed Aging Process. *Plants*, *8*(6), 174. <https://doi.org/10.3390/plants8060174>
- Lee, Y., & Lee, Y. (2008). Roles of phosphoinositides in regulation of stomatal movements. *Plant Signaling & Behavior*, *3*(4), 211–213. <https://doi.org/10.4161/psb.3.4.5557>

- Li, M. F., Guo, S. J., Yang, X. H., Meng, Q. W., & Wei, X. J. (2016). Exogenous gamma-aminobutyric acid increases salt tolerance of wheat by improving photosynthesis and enhancing activities of antioxidant enzymes. *Biologia Plantarum*, *60*(1), 123–131. <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0559-1>
- Li, X., Dou, N., Zhang, H., & Wu, C. (2021). The versatile GABA in plants. *Plant Signaling & Behavior*, *16*(3), 1862565. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1862565>
- Li, X., Song, W., Cao, S., Mo, Y., Du, M., & He, Z. (2024). The impact of multidimensional urbanization on sustainable development goals (SDGs): A long-term analysis of the 31 provinces in China. *Ecological Indicators*, *169*, 112822. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2024.112822>
- Li, Z., Burgess, P., Peng, Y., & Huang, B. (2022). Regulation of nutrient accumulation by  $\gamma$ -aminobutyric acid associated with GABA priming-enhanced heat tolerance in creeping bentgrass. *Grass Research*, *2*(1), 1–8. <https://doi.org/10.48130/GR-2022-0005>
- Li, Z., Tang, M., Hassan, M. J., Zhang, Y., Han, L., & Peng, Y. (2021). Adaptability to High Temperature and Stay-Green Genotypes Associated With Variations in Antioxidant, Chlorophyll Metabolism, and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Accumulation in Creeping Bentgrass Species. *Frontiers in Plant Science*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.750728>
- Li, Z., Yong, B., Cheng, B., Wu, X., Zhang, Y., Zhang, X., & Peng, Y. (2019). Nitric oxide,  $\gamma$ -aminobutyric acid, and mannose pretreatment influence metabolic profiles in white clover under water stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, *61*(12), 1255–1273. <https://doi.org/10.1111/jipb.12770>
- Li, Z., Yu, J., Peng, Y., & Huang, B. (2017). Metabolic pathways regulated by abscisic acid, salicylic acid and  $\gamma$ -aminobutyric acid in association with improved drought tolerance in creeping bentgrass ( *Agrostis stolonifera* ). *Physiologia Plantarum*, *159*(1), 42–58. <https://doi.org/10.1111/ppl.12483>

- Liu, H.-T., Huang, W.-D., Pan, Q.-H., Weng, F.-H., Zhan, J.-C., Liu, Y., Wan, S.-B., & Liu, Y.-Y. (2006). Contributions of PIP2-specific-phospholipase C and free salicylic acid to heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves. *Journal of Plant Physiology*, *163*(4), 405–416. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.04.027>
- Liu, X., Quan, W., & Bartels, D. (2022). Stress memory responses and seed priming correlate with drought tolerance in plants: an overview. *Planta*, *255*(2), 45. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03828-z>
- Lv, X., Li, H., Chen, X., Xiang, X., Guo, Z., Yu, J., & Zhou, Y. (2018). The role of calcium-dependent protein kinase in hydrogen peroxide, nitric oxide and ABA-dependent cold acclimation. *Journal of Experimental Botany*, *69*(16), 4127–4139. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery212>
- Malakar, P., Gupta, S. K., & Chattopadhyay, D. (2024). Role of plant neurotransmitters in salt stress: A critical review. In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 211). <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108601>
- Manasa S, L., Panigrahy, M., Panigrahi, K. C. S., & Rout, G. R. (2022). Overview of Cold Stress Regulation in Plants. *The Botanical Review*, *88*(3), 359–387. <https://doi.org/10.1007/s12229-021-09267-x>
- Mansour, M. M. F., & Salama, K. H. A. (2020). Proline and Abiotic Stresses: Responses and Adaptation. In *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives II* (pp. 357–397). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-2172-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2172-0_12)
- Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., & Pauly, N. (2012). A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in Plant Science*, *17*(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.10.001>
- Martinek, P., ŠKORPÍK, M., CHRPOVÁ, J., FUČÍK, P., & SCHWEIGER, J. (2013). Development of the new winter wheat variety Skorpion with blue grain. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, *49*(2), 90–94. <https://doi.org/10.17221/7/2013-CJGPB>

- Mehrabad Pour-Benab, S., Fabriki-Ourang, S., & Mehrabi, A.-A. (2019). Expression of dehydrin and antioxidant genes and enzymatic antioxidant defense under drought stress in wild relatives of wheat. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 1063–1073. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1638300>
- Michal Johnson, J., Reichelt, M., Vadassery, J., Gershenzon, J., & Oelmüller, R. (2014). An Arabidopsis mutant impaired in intracellular calcium elevation is sensitive to biotic and abiotic stress. *BMC Plant Biology*, 14(1), 162. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-162>
- Minibayeva, F., Kolesnikov, O., Chasov, A., Beckett, R. P., Lüthje, S., Vylegzhanina, N., Buck, F., & Böttger, M. (2009). Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species. *Plant, Cell & Environment*, 32(5), 497–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01944.x>
- Mir, B. A., Taziun, T., Mir, M. R., Mir, T. ul G., Kumari, R., Wani, A. K., & Akhtar, N. (2024). Reactive Oxygen, Nitrogen, and Sulfur Species Under Abiotic Stress in Plants. In *Plant Secondary Metabolites and Abiotic Stress* (pp. 213–242). Wiley. <https://doi.org/10.1002/97811394186457.ch9>
- Mishra, V., & Sarkar, A. K. (2023). Serotonin: A frontline player in plant growth and stress responses. *Physiologia Plantarum*, 175(4). <https://doi.org/10.1111/ppl.13968>
- Mishra, V., Singh, P., Tripathi, D. K., Corpas, F. J., & Singh, V. P. (2021). Nitric oxide and hydrogen sulfide: an indispensable combination for plant functioning. *Trends in Plant Science*, 26(12), 1270–1285. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.07.016>
- Mittler, R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., & van Breusegem, F. (2022). Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(10), 663–679. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00499-2>

- Mohammadi Alagoz, S., Hadi, H., Toorchi, M., Pawłowski, T. A., Asgari Lajayer, B., Price, G. W., Farooq, M., & Astatkie, T. (2023). Morpho-physiological responses and growth indices of triticale to drought and salt stresses. *Scientific Reports*, *13*(1), 8896. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36119-y>
- Mori, I. C., & Schroeder, J. I. (2004). Reactive Oxygen Species Activation of Plant Ca<sup>2+</sup> Channels. A Signaling Mechanism in Polar Growth, Hormone Transduction, Stress Signaling, and Hypothetically Mechanotransduction. *Plant Physiology*, *135*(2), 702–708. <https://doi.org/10.1104/pp.104.042069>
- Mukherjee, S., & Corpas, F. J. (2023). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO, and H<sub>2</sub>S networks during root development and signalling under physiological and challenging environments: Beneficial or toxic? *Plant, Cell & Environment*, *46*(3), 688–717. <https://doi.org/10.1111/pce.14531>
- Nasirzadeh, L., Sorkhilaleloo, B., Majidi Hervan, E., & Fatehi, F. (2021). Changes in antioxidant enzyme activities and gene expression profiles under drought stress in tolerant, intermediate, and susceptible wheat genotypes. *Cereal Research Communications*, *49*(1), 83–89. <https://doi.org/10.1007/s42976-020-00085-2>
- Nayyar, H., Kaur, R., Kaur, S., & Singh, R. (2014).  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) Imparts Partial Protection from Heat Stress Injury to Rice Seedlings by Improving Leaf Turgor and Upregulating Osmoprotectants and Antioxidants. *Journal of Plant Growth Regulation*, *33*(2), 408–419. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9389-6>
- Nidhi, Iqbal., N., & Khan, N. A. (2025). Polyamines Interaction with Gaseous Signaling Molecules for Resilience Against Drought and Heat Stress in Plants. In *Plants* (Vol. 14, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/plants14020273>
- Nogués, S., & Baker, N. R. (2000). Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal of Experimental Botany*, *51*(348), 1309–1317. <https://doi.org/10.1093/jxb/51.348.1309>

- Oda, T., Hashimoto, H., Kuwabara, N., Akashi, S., Hayashi, K., Kojima, C., Wong, H. L., Kawasaki, T., Shimamoto, K., Sato, M., & Shimizu, T. (2010). Structure of the N-terminal Regulatory Domain of a Plant NADPH Oxidase and Its Functional Implications. *Journal of Biological Chemistry*, 285(2), 1435–1445. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058909>
- Pagano, A., Macovei, A., & Balestrazzi, A. (2023). Molecular dynamics of seed priming at the crossroads between basic and applied research. *Plant Cell Reports*, 42(4), 657–688. <https://doi.org/10.1007/s00299-023-02988-w>
- Pál, M., Szalai, G., & Janda, T. (2015). Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. In *Plant Science* (Vol. 237). <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.003>
- Pál, M., Tajti, J., Szalai, G., Peeva, V., Végh, B., & Janda, T. (2018). Interaction of polyamines, abscisic acid and proline under osmotic stress in the leaves of wheat plants. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31297-6>
- Patel, P., Kadur Narayanaswamy, G., Kataria, S., & Baghel, L. (2017). Involvement of nitric oxide in enhanced germination and seedling growth of magnetoprimered maize seeds. *Plant Signaling & Behavior*, 12(12), e1293217. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1293217>
- Pirredda, M., Fañanás-Pueyo, I., Oñate-Sánchez, L., & Mira, S. (2023). Seed Longevity and Ageing: A Review on Physiological and Genetic Factors with an Emphasis on Hormonal Regulation. *Plants*, 13(1), 41. <https://doi.org/10.3390/plants13010041>
- Praveen, A., Dubey, S., Singh, S., & Sharma, V. K. (2023). Abiotic stress tolerance in plants: a fascinating action of defense mechanisms. *3 Biotech*, 13(3), 102. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03519-w>
- Probert, R., Adams, J., Coneybeer, J., Crawford, A., & Hay, F. (2007). Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. *Australian Journal of Botany*, 55(3), 326–335. <https://doi.org/10.1071/BT06046>

- Rajjou, L., Lovigny, Y., Groot, S. P. C., Belghazi, M., Job, C., & Job, D. (2008). Proteome-Wide Characterization of Seed Aging in Arabidopsis: A Comparison between Artificial and Natural Aging Protocols. *Plant Physiology*, *148*(1), 620–641. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123141>
- Ramesh, S. A., Tyerman, S. D., Gilliam, M., & Xu, B. (2017).  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*(9), 1577–1603. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2415-7>
- Ramzan, M., Shah, A. A., Ahmed, M. Z., Bukhari, M. A., Ali, L., Casini, R., & Elansary, H. O. (2023). Exogenous application of glutathione and gamma amino-butyrlic acid alleviates salt stress through improvement in antioxidative defense system and modulation of CaXTHs stress-related genes. *South African Journal of Botany*, *157*, 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.04.008>
- Raza, A., Anas, M., Bhardwaj, S., Mir, R. A., Charagh, S., Elahi, M., Zhang, X., Mir, R. R., Weckwerth, W., Fernie, A. R., Siddique, K. H. M., Hu, Z., & Varshney, R. K. (2025). Harnessing metabolomics for enhanced crop drought tolerance. *The Crop Journal.*, *13*(2), 311–327. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2025.01.001>
- Razzaq, A., Wani, S. H., Saleem, F., Yu, M., Zhou, M., & Shabala, S. (2021). Rewilding crops for climate resilience: economic analysis and de novo domestication strategies. *Journal of Experimental Botany*, *72*(18), 6123–6139. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab276>
- Roe, J. H. (1954). The determination of dextran in blood and urine with anthrone reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *208*(2), 889–896. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65614-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65614-5)
- Sadak, M. S., & Dawood, M. G. (2023). Biofertilizer Role in Alleviating the Deleterious Effects of Salinity on Wheat Growth and Productivity. *Gesunde Pflanzen*, *75*(4), 1207–1219. <https://doi.org/10.1007/s10343-022-00783-3>

- Sadak, M. S., Hanafy, R. S., Elkady, F. M. A. M., Mogazy, A. M., & Abdelhamid, M. T. (2023). Exogenous Calcium Reinforces Photosynthetic Pigment Content and Osmolyte, Enzymatic, and Non-Enzymatic Antioxidants Abundance and Alleviates Salt Stress in Bread Wheat. *Plants*, *12*(7), 1532. <https://doi.org/10.3390/plants12071532>
- Sagisaka, S. (1976). The Occurrence of Peroxide in a Perennial Plant, *Populus gelrica*. *Plant Physiology*, *57*(2), 308–309. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.308>
- Saha, J., Brauer, E. K., Sengupta, A., Popescu, S. C., Gupta, K., & Gupta, B. (2015). Polyamines as redox homeostasis regulators during salt stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00021>
- Sahoo, L., Swain, B., & Yadav, D. (2025). A review on different priming strategies to mitigate abiotic stress in plants. *Discover Applied Sciences*, *7*(6), 618. <https://doi.org/10.1007/s42452-025-07009-x>
- Sako, K., Nguyen, H. M., & Seki, M. (2021). Advances in Chemical Priming to Enhance Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Plant and Cell Physiology*, *61*(12), 1995–2003. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa119>
- Salah, A., Zhan, M., Cao, C., Han, Y., Ling, L., Liu, Z., Li, P., Ye, M., & Jiang, Y. (2019).  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Promotes Chloroplast Ultrastructure, Antioxidant Capacity, and Growth of Waterlogged Maize Seedlings. *Scientific Reports*, *9*(1), 484. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36334-y>
- Salam, U., Ullah, S., Tang, Z.-H., Elateeq, A. A., Khan, Y., Khan, J., Khan, A., & Ali, S. (2023). Plant Metabolomics: An Overview of the Role of Primary and Secondary Metabolites against Different Environmental Stress Factors. *Life*, *13*(3), 706. <https://doi.org/10.3390/life13030706>
- Salem, E. M. M., Kenawey, M. K. M., Saady, H. S., & Mubarak, M. (2022). Influence of Silicon Forms on Nutrients Accumulation and Grain Yield of Wheat Under Water Deficit Conditions. *Gesunde Pflanzen*, *74*(3), 539–548. <https://doi.org/10.1007/s10343-022-00629-y>

- Sears, S. M., & Hewett, S. J. (2021). Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance. *Experimental Biology and Medicine*, 246(9), 1069–1083. <https://doi.org/10.1177/1535370221989263>
- Sehrawat, A., & Deswal., R. (2014). S-Nitrosylation Analysis in Brassica juncea Apoplast Highlights the Importance of Nitric Oxide in Cold-Stress Signaling. *Journal of Proteome Research*, 13(5), 2599–2619. <https://doi.org/10.1021/pr500082u>
- Sehrawat, A., Abat, J. K., & Deswal., R. (2013). RuBisCO depletion improved proteome coverage of cold responsive S-nitrosylated targets in Brassica juncea. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00342>
- Seifikalhor, M., Aliniaiefard, S., Hassani, B., Niknam, V., & Lastochkina, O. (2019). Diverse role of  $\gamma$ -aminobutyric acid in dynamic plant cell responses. *Plant Cell Reports*, 38(8), 847–867. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02396-z>
- Seifikalhor, M., Niknam, V., Aliniaiefard, S., Didaran, F., Tsaniklidis, G., Fanourakis, D., Teymoorzadeh, M., Mousavi, S. H., Bosacchi, M., & Li, T. (2022). The regulatory role of  $\gamma$ -aminobutyric acid in chickpea plants depends on drought tolerance and water scarcity level. *Scientific Reports*, 12(1), 7034. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10571-8>
- Sen, A., & Puthur, J. T. (2020). Influence of different seed priming techniques on oxidative and antioxidative responses during the germination of *Oryza sativa* varieties. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(3), 551–565. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00750-9>
- Sepehri, A., & Rouhi, H. R. (2016). Enhancement of Seed Vigor Performance in Aged Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Seeds by Sodium Nitroprusside under Drought Stress. *The Philippine Agricultural Scientist*, 99(4), 339–347. <https://doi.org/10.62550/AS339347>

- Shakhov, I. v., Relina, L. I., Pyschalenko, M. A., & Kolupaev, Y. E. (2025). Activation of wheat seed germination under drought and salt stresses by  $\gamma$ -aminobutyric acid priming: Relationship with changes in ROS generation and osmolyte content. *Notulae Scientia Biologicae*, 17(2), 12366. <https://doi.org/10.55779/nsb17212366>
- Shelp, B. J., Aghdam, M. S., & Flaherty, E. J. (2021).  $\gamma$ -Aminobutyrate (GABA) Regulated Plant Defense: Mechanisms and Opportunities. *Plants*, 10(9), 1939. <https://doi.org/10.3390/plants10091939>
- Sheng, Y., Xiao, H., Guo, C., Wu, H., & Wang, X. (2018). Effects of exogenous gamma-aminobutyric acid on  $\alpha$ -amylase activity in the aleurone of barley seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 127, 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., & Tang, B. (2019). GABA-Alleviated Oxidative Injury Induced by Salinity, Osmotic Stress and their Combination by Regulating Cellular and Molecular Signals in Rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5709. <https://doi.org/10.3390/ijms20225709>
- Shi, S., Shi, Z., Jiang, Z., Qi, L., Sun, X., Li, C., Liu, J., Xiao, W., & Zhang, S. (2010). Effects of exogenous GABA on gene expression of Caragana intermedia roots under NaCl stress: regulatory roles for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ethylene production. *Plant, Cell & Environment*, 33(2), 149–162. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02065.x>
- Shkliarevskiy, M. A., Karpets, Yu. v., Kolupaev, Yu. E., Lugovaya, A. A., & Dmitriev, A. P. (2020). Calcium-Dependent Changes in Cellular Redox Homeostasis and Heat Resistance of Wheat Plantlets under Influence of Hemin (Carbon Monoxide Donor). *Cytology and Genetics*, 54(6), 522–530. <https://doi.org/10.3103/S0095452720060109>

- Shomali, A., Aliniaiefard, S., Didaran, F., Lotfi, M., Mohammadian, M., Seif, M., Strobel, W. R., Sierka, E., & Kalaji, H. M. (2021). Synergistic Effects of Melatonin and Gamma-Aminobutyric Acid on Protection of Photosynthesis System in Response to Multiple Abiotic Stressors. *Cells*, *10*(7), 1631. <https://doi.org/10.3390/cells10071631>
- Sierla, M., Waszczak, C., Vahisalu, T., & Kangasjärvi, J. (2016). Reactive Oxygen Species in the Regulation of Stomatal Movements. *Plant Physiology*, *171*(3), 1569–1580. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00328>
- Signorelli, S., Dans, P. D., Coitiño, E. L., Borsani, O., & Monza, J. (2015). Connecting Proline and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid in Stressed Plants through Non-Enzymatic Reactions. *PLOS ONE*, *10*(3), e0115349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115349>
- Simlat, M., Ptak, A., Skrzypek, E., Warchoń, M., Morańska, E., & Piórkowska, E. (2018). Melatonin significantly influences seed germination and seedling growth of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *PeerJ*, *6*, e5009. <https://doi.org/10.7717/peerj.5009>
- Singh, N., & Kaur, H. (2016). Does N-Nitrosomelatonin Compete with S-Nitrosothiols as a Long Distance Nitric Oxide Carrier in Plants? *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, *s3*. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000262>
- Singh, P., Basu, S., & Kumar, G. (2018). Polyamines Metabolism: A Way Ahead for Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. In *Biochemical., Physiological and Molecular Avenues for Combating Abiotic Stress Tolerance in Plants* (pp. 39–55). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813066-7.00003-6>
- Sita, K., & Kumar, V. (2020). Role of Gamma Amino Butyric Acid (GABA) against abiotic stress tolerance in legumes: a review. *Plant Physiology Reports*, *25*(4), 654–663. <https://doi.org/10.1007/s40502-020-00553-1>
- Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, *28*(4), 1057–1060. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80182-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80182-7)

- Soliman, M., Alhaithloul, H. A., Hakeem, K. R., Alharbi, B. M., El-Esawi, M., & Elkelish, A. (2019). Exogenous Nitric Oxide Mitigates Nickel-Induced Oxidative Damage in Eggplant by Upregulating Antioxidants, Osmolyte Metabolism, and Glyoxalase Systems. *Plants*, 8(12), 562. <https://doi.org/10.3390/plants8120562>
- Steward, F., Thompson, J., & Dent, C. (1949).  $\gamma$ -Aminobutyric acid: A constituent of the potato tuber? *Science*, 110, 439–440.
- Suhel, M., Husain, T., Pandey, A., Singh, S., Dubey, N. K., Prasad, S. M., & Singh, V. P. (2023). An Appraisal of Ancient Molecule GABA in Abiotic Stress Tolerance in Plants, and Its Crosstalk with Other Signaling Molecules. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(2), 614–629. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10610-8>
- Suhel, M., Husain, T., Prasad, S. M., & Singh, V. P. (2023). GABA Requires Nitric Oxide for Alleviating Arsenate Stress in Tomato and Brinjal Seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(2), 670–683. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10576-7>
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M. A., & Mittler, R. (2011). Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(6), 691–699. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.07.014>
- Syed, S., & Mishra, A. (2025). Multi-modal priming for plant stress resilience: Emerging agents and applications. *Current Plant Biology*, 44, 100548. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2025.100548>
- Tambussi, E. A., Nogués, S., & Araus, J. L. (2005). Ear of durum wheat under water stress: water relations and photosynthetic metabolism. *Planta*, 221(3), 446–458. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1455-7>

- Tang, M., Li, Z., Luo, L., Cheng, B., Zhang, Y., Zeng, W., & Peng, Y. (2020). 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. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(20), 7460. <https://doi.org/10.3390/ijms21207460>
- Tao, Q., Lv, Y., Mo, Q., Bai, M., Han, Y., & Wang, Y. (2018). Impacts of priming on seed germination and seedling emergence of *Cleistogenes songorica* under drought stress. *Seed Science and Technology*, *46*(2), 239–257. <https://doi.org/10.15258/sst.2018.46.2.06>
- Tavakkol Afshari, R., & Seyyedi, S. M. (2020). Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid can alleviate the adverse effects of seed aging on fatty acids composition and heterotrophic seedling growth in medicinal pumpkin. *Industrial Crops and Products*, *153*, 112605. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112605>
- Teshome, D. T., Zharare, G. E., & Naidoo, S. (2020). The Threat of the Combined Effect of Biotic and Abiotic Stress Factors in Forestry Under a Changing Climate. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.601009>
- Thakur, M., & Sharma, A. D. (2005). Salt-stress-induced proline accumulation in germinating embryos: Evidence suggesting a role of proline in seed germination. *Journal of Arid Environments*, *62*(3), 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2005.01.005>
- Tor, M., Lotze, M. T., & Holton, N. (2009). Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *Journal of Experimental Botany*, *60*(13), 3645–3654. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp233>
- Ul Mushtaq, N., Saleem, S., Rasool, A., Hafiz Shah, W., Rehman Hakeem, K., & Ul Rehman, R. (2021). Salt Stress Threshold in Millets: Perspective on Cultivation on Marginal Lands for Biomass. *Phyton*, *90*(1), 51–64. <https://doi.org/10.32604/phyton.2020.012163>

- Ullah, A., Ali, I., Noor, J., Zeng, F., Bawazeer, S., Eldin, S. M., Asghar, M. A., Javed, H. H., Saleem, K., Ullah, S., & Ali, H. (2023). Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) mitigated salinity-induced impairments in mungbean plants by regulating their nitrogen metabolism and antioxidant potential., *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1081188>
- Umbreen, S., Lubega, J., Cui, B., Pan, Q., Jiang, J., & Loake, G. J. (2018). Specificity in nitric oxide signalling. *Journal of Experimental Botany*, 69(14), 3439–3448. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery184>
- Urban, O., Hlaváčová, M., Klem, K., Novotná, K., Rapantová, B., Smutná, P., Horáková, V., Hlavinka, P., Škarpa, P., & Trnka, M. (2018). Combined effects of drought and high temperature on photosynthetic characteristics in four winter wheat genotypes. *Field Crops Research*, 223, 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2018.02.029>
- Valderrama, R., Begara-Morales, J. C., Chaki, M., Mata-Pérez, C., Padilla, M. N., & Barroso, J. B. (2019). Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)- and Nitric Oxide (NO)-Derived Posttranslational Modifications. In *Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Signaling in Higher Plants* (pp. 37–67). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-11129-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11129-8_3)
- Vedenicheva, N., Futorna, O., Shcherbatyuk, M., & Kosakivska, I. (2022). Effect of seed priming with zeatin on *Secale cereale* L. growth and cytokinins homeostasis under hyperthermia. *Journal of Crop Improvement*, 36(5), 656–674. <https://doi.org/10.1080/15427528.2021.2000909>
- Wang, P., Liu, W., Han, C., Wang, S., Bai, M., & Song, C. (2024). Reactive oxygen species: Multidimensional regulators of plant adaptation to abiotic stress and development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 66(3), 330–367. <https://doi.org/10.1111/jipb.13601>

- Wang, W., Liu, S., & Yan, M. (2022). Synthesis of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid-Modified Chitooligosaccharide Derivative and Enhancing Salt Resistance of Wheat Seedlings. *Molecules*, 27(10), 3068. <https://doi.org/10.3390/molecules27103068>
- Wang, Y., Luo, Z., Mao, L., & Ying, T. (2016). Contribution of polyamines metabolism and GABA shunt to chilling tolerance induced by nitric oxide in cold-stored banana fruit. *Food Chemistry*, 197, 333–339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.118>
- Wang, Y., Xiong, F., Nong, S., Liao, J., Xing, A., Shen, Q., Ma, Y., Fang, W., & Zhu, X. (2020). Effects of nitric oxide on the GABA, polyamines, and proline in tea (*Camellia sinensis*) roots under cold stress. *Scientific Reports*, 10(1), 12240. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69253-y>
- Waqas, M., Korres, N. E., Khan, M. D., Nizami, A.-S., Deeba, F., Ali, I., & Hussain, H. (2019). Advances in the Concept and Methods of Seed Priming. In *Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings* (pp. 11–41). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8625-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8625-1_2)
- Waszczak, C., Carmody, M., & Kangasjärvi, J. (2018). Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), 209–236. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040322>
- Xia, F., Cheng, H., Chen, L., Zhu, H., Mao, P., & Wang, M. (2020). Influence of exogenous ascorbic acid and glutathione priming on mitochondrial structural and functional systems to alleviate aging damage in oat seeds. *BMC Plant Biology*, 20(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2321-x>
- Xie, C., Wang, P., Sun, M., Gu, Z., & Yang, R. (2021). Nitric oxide mediates  $\gamma$ -aminobutyric acid signaling to regulate phenolic compounds biosynthesis in soybean sprouts under NaCl stress. *Food Bioscience*, 44, 101356. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101356>

- Xu, B., Long, Y., Feng, X., Zhu, X., Sai, N., Chirkova, L., Betts, A., Herrmann, J., Edwards, E. J., Okamoto, M., Hedrich, R., & Gilliam, M. (2021). GABA signalling modulates stomatal opening to enhance plant water use efficiency and drought resilience. *Nature Communications*, *12*(1), 1952. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21694-3>
- Xu, B., Sai, N., & Gilliam, M. (2021). The emerging role of GABA as a transport regulator and physiological signal., *Plant Physiology*, *187*(4), 2005–2016. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab347>
- Xu, J., Liu, T., Qu, F., Jin, X., Huang, N., Wang, J., & Hu, X. (2021). Nitric oxide mediates  $\gamma$ -aminobutyric acid-enhanced muskmelon tolerance to salinity–alkalinity stress conditions. *Scientia Horticulturae*, *286*, 110229. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110229>
- Yang, H., Mu, J., Chen, L., Feng, J., Hu, J., Li, L., Zhou, J.-M., & Zuo, J. (2015). S-Nitrosylation Positively Regulates Ascorbate Peroxidase Activity during Plant Stress Responses. *Plant Physiology*, *167*(4), 1604–1615. <https://doi.org/10.1104/pp.114.255216>
- Yang, J., Gupta, V., Carroll, K. S., & Liebler, D. C. (2014). Site-specific mapping and quantification of protein S-sulphenylation in cells. *Nature Communications*, *5*(1), 4776. <https://doi.org/10.1038/ncomms5776>
- Yao, Y., Yang, Y., Li, C., Huang, D., Zhang, J., Wang, C., Li, W., Wang, N., Deng, Y., & Liao, W. (2019). Research Progress on the Functions of Gasotransmitters in Plant Responses to Abiotic Stresses. *Plants*, *8*(12), 605. <https://doi.org/10.3390/plants8120605>
- Yastreba, T. O., Kolupaev, Y. E., Yemets, A. I., & Blume, Y. B. (Eds.). (2024). *Regulation of Adaptive Responses in Plants*. Nova Science Publishers. <https://doi.org/10.52305/TXQB2084>
- Yastreba, T. O., Shkliarevskiy, M. A., & Kolupaev, Y. E. (2025). Quantitative determination of amylase activity in germinating cereal grains using agar plates and ImageJ software. *Botanica*, 54–63. <https://doi.org/10.35513/Botlit.2025.2.1>

- Yemets, A. I., Karpets, Y. v., Kolupaev, Y. E., & Blume, Y. B. (2019). Emerging Technologies for Enhancing ROS/RNS Homeostasis. In *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants* (pp. 873–922). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119468677.ch39>
- Yong, B., Xie, H., Li, Z., Li, Y.-P., Zhang, Y., Nie, G., Zhang, X.-Q., Ma, X., Huang, L.-K., Yan, Y.-H., & Peng, Y. (2017). Exogenous Application of GABA Improves PEG-Induced Drought Tolerance Positively Associated with GABA-Shunt, Polyamines, and Proline Metabolism in White Clover. *Frontiers in Physiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01107>
- Yu, S., Lian, Z., Yu, L., Guo, W., Zhang, C., & Zhang, Y. (2024). Gamma-aminobutyric acid elicits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signalling and promotes wheat seed germination under combined salt and heat stress. *PeerJ*, 12, e17907. <https://doi.org/10.7717/peerj.17907>
- Zeng, W., Hassan, M. J., Kang, D., Peng, Y., & Li, Z. (2021). Photosynthetic maintenance and heat shock protein accumulation relating to  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-regulated heat tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *South African Journal of Botany*, 141, 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.05.028>
- Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., & Zhu, J.-K. (2022). Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics*, 23(2), 104–119. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00413-0>
- Zhang, K., Zhang, Y., Sun, J., Meng, J., & Tao, J. (2021). Deterioration of orthodox seeds during ageing: Influencing factors, physiological alterations and the role of reactive oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 158, 475–485. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.031>
- Zhang, Y., Wang, L., Liu, Y., Zhang, Q., Wei, Q., & Zhang, W. (2006). Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in the tonoplast. *Planta*, 224(3), 545–555. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0242-z>

- Zhang, Y., XM, L., Y, Z., WY, D., & Kong LA. (2023). Physiological mechanism of exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid regulating grain-filling in wheat. *Journal of Triticeae Crops*, 43(2), 233–240.
- Zhang, Y., Xu, J., Li, R., Ge, Y., Li, Y., & Li, R. (2023). Plants' Response to Abiotic Stress: Mechanisms and Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10915. <https://doi.org/10.3390/ijms241310915>
- Zhang, Y., Zhu, H., Zhang, Q., Li, M., Yan, M., Wang, R., Wang, L., Welti, R., Zhang, W., & Wang, X. (2009). Phospholipase D $\alpha$ 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in arabidopsis. *Plant Cell*, 21(8). <https://doi.org/10.1105/tpc.108.062992>
- Zhao, F., Liu, W., & Zhang, S. (2009). Different Responses of Plant Growth and Antioxidant System to the Combination of Cadmium and Heat Stress in Transgenic and Non-transgenic Rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(10), 942–950. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2009.00865.x>
- Zhao, Q., Ma, Y., Huang, X., Song, L., Li, N., Qiao, M., Li, T., Hai, D., & Cheng, Y. (2023). GABA Application Enhances Drought Stress Tolerance in Wheat Seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Plants*, 12(13), 2495. <https://doi.org/10.3390/plants12132495>
- Zheng, C., Jiang, D., Liu, F., Dai, T., Liu, W., Jing, Q., & Cao, W. (2009). Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 222–227. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.05.002>
- Zhou, B., Guo, Z., Xing, J., & Huang, B. (2005). Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*, *J. Exp. Bot.*, 56, 3223–3228. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri319>

- Zhou, C., Dong, W., Jin, S., Liu, Q., Shi, L., Cao, S., Li, S., Chen, W., & Yang, Z. (2022).  $\gamma$ -Aminobutyric acid treatment induced chilling tolerance in postharvest peach fruit by upregulating ascorbic acid and glutathione contents at the molecular level. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1059979>
- Zhou, M., Hassan, M. J., Peng, Y., Liu, L., Liu, W., Zhang, Y., & Li, Z. (2021).  $\gamma$ -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. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.776939>
- Zhou, Z.-H., Wang, Y., Ye, X.-Y., & Li, Z.-G. (2018). Signaling Molecule Hydrogen Sulfide Improves Seed Germination and Seedling Growth of Maize (*Zea mays* L.) Under High Temperature by Inducing Antioxidant System and Osmolyte Biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01288>
- Вайнер, А. О., Колупаев, Ю. Е., Ястреб, Т. О. (2013). Участие пероксида водорода в индуцировании накопления пролина в растениях проса при действии NaCl. *Вісник Харківського Національного Аграрного Університету. Серія Біологія*, 29(2), 32–38.
- Колупаев, Ю. Е., Карпец, Ю. В. (2019). *Активные формы кислорода, антиоксиданты и устойчивость растений к действию стрессоров*. Киев: Логос.
- Романенко, О. Л., Куш, І. С., Заєць, С. О., Солодушко, М. М. (2018). Вплив посушливих умов Степу на життєздатність насіння та проростків озимих зернових культур. *Агроекологічний Журнал*, (1), 87–95. <https://doi.org/10.33730/2077-4893.1.2018.160584>