

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ КИСЛОРОДА НА ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *GAD1* ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ

П.П. Москвина, Г.Б. Анохина, А.Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию: 21.02.2024 г.

Аннотация. Неблагоприятные условия среды наносят непоправимый ущерб сельскохозяйственным угодьям. Растения за миллионы лет эволюции выработали собственную стратегию адаптации к неблагоприятным факторам внешней среды – это изменение метаболических путей, обеспечивающих клетки энергией и субстратами.

Повышение содержания воды в окружающей среде может быть как естественным процессом – усиленные дожди, так и искусственным – чрезмерный полив. Известно, что снижение содержания кислорода в среде приводит к уменьшению интенсивности функционирования цикла трикарбоновых кислот – центрального звена энергетического обмена, а также к сопряженными с фотосинтезом процессами, ассимиляцией азота, изменению окислительно-восстановительного баланса. В связи с этими изменениями активируется шунт γ -аминомасляной кислоты. К сожалению, в настоящее время механизмы регуляции данного метаболического пути в процессе адаптации к внешним стрессовым факторам еще мало изучены. Кроме того, недостаточно информации о механизмах связи цикла Кребса с ГАМК-шунтом. Более детальные исследования помогут выявить особенности функционирования ферментов при стрессовых условиях, благодаря чему станет возможным создание более устойчивых сортов кукурузы.

Исходя из этого, целесообразным представляется изучение путей регуляции метаболических путей, ответственных за адаптацию к гипоксическим условиям. Целью работы являлось изучение характера функционирования гена *GAD1*, кодирующего глутаматдекарбоксилазу в геноме кукурузы, в гипоксических условиях. Статья содержит данные исследования изменения ферментативной активности глутаматдекарбоксилазы в первые двадцать четыре часа инкубации проростков кукурузы в гипоксических условиях. Показано, что снижение кислорода в окружающей среде приводит к активации глутаматдекарбоксилазной активности на третий час стрессового воздействия. Использование метода ПЦР-real time позволило оценить динамику транскрипционной активности гена *GAD1* – одного из генов семейства *GAD*, кодирующего в геноме *Zea mays* L. один из изоферментов глутаматдекарбоксилазы. Полученные данные динамики относительного уровня транскриптов исследуемого гена демонстрируют увеличение уровня мРНК гена *GAD1* на третий час эксперимента, что указывает на значительную роль данного гена в обеспечении глутаматдекарбоксилазной активности в процессе адаптации растительной клетки к гипоксическим условиям.

Ключевые слова: глутаматдекарбоксилаза, гипоксия, ферментативная активность, экспрессия, *Zea mays* L.

Растения достаточно хорошо приспособляются к изменяющимся условиям среды благодаря пластичности адаптационных процессов. Эта особенность крайне важна для того, чтобы растение могло пережить неблагоприятные изменения климата, например, экстремальные температуры или обильные осадки. Растения могут преодолевать временные стрессовые условия с низким содержанием кислорода (гипоксию), вызванные затоплением почвы. В это

время в клетках организма происходят различные физиологические и молекулярные перестройки, затрагивающие метаболические пути и геном и мобилизирующие ресурсы растения для выживания [1].

Одной из таких адаптаций является активация ГАМК-шунта – метаболического пути, протекающего в обход двух реакций цикла трикарбоновых кислот. Данный путь состоит из трех реакций, первую из них катализирует фермент глутаматдекарбоксилаза, осуществляющая превращение глутамата в γ -аминомасляную кислоту и углекислый газ [2].

В растениях ГАМК образуется главным образом посредством H^+ -потребляющего α -декарбоксилирования глутамата в ходе необратимой реакции, катализируемой локализованной в цитозоле глутаматдекарбоксилазой (ГДК, КФ 4.1.1.15), которая протекает в условиях низких значений pH при участии в качестве кофактора пиридоксальфосфата. По имеющимся данным ГДК имеет цитоплазматическую локализацию [2-4].

Растительная ГДК представляет собой гексамер ~340 кДа, регулируемый за счёт изменения pH и связывания Ca^{2+} /кальмодулина (CaM) с C-концевым доменом. Кальмодулин активирует глутаматдекарбоксилазную активность уникальным способом, освобождая два C-концевых домена аутоингибирования соседних активных центров, образуя комплекс глутаматдекарбоксилаза-CaM с молекулярной массой около 393 кДа с необычной стехиометрией 1:3. Комплекс упакован рыхло: благодаря гибким линкерам, соединяющим ядро фермента с шестью C-концевыми регуляторными доменами, молекулы CaM сохраняют значительную позиционную и ориентационную свободу по отношению к ГДК. Благодаря двум уровням регуляции, оба из которых нацелены на C-концевой домен, ГДК может гибко реагировать на различные виды клеточного стресса, возникающие при разных значениях pH [5]. Кристаллическая структура первой изоформы ГДК из *Arabidopsis thaliana*, кодируемой геном *AtGAD1* показываает, что фермент представляет собой гексамер, состоящий из тримера димеров. «Сборка» димеров в гексамеры обеспечивается за счёт ряда условий, среди которых высокие концентрации белка и низкий уровень pH [5, 6].

Растительные клетки регулируют широкий спектр процессов за счёт передачи сигналов с использованием кальция и, по-видимому, обладают уникальными сигнальными сетями, опосредованными Ca^{2+} /CaM, которые регулируют специфичные для растений процессы, такие как реакция на абиотический и биотический стресс, рост и развитие, прорастание семян и созревание [6]. Показано, что глутаматдекарбоксилаза, полученная из ячменя имеет две различные формы. ГДК, выделенный из зародыша ячменя, демонстрирует высокое значение K_m - 22 мМ для L-глутамата, тогда как фермент, очищенный из корня демонстрирует $K_m = 3,1$ мМ [6].

Регуляция активности ГДК с помощью кальция осуществляется через кальмодулин-связывающий домен. Связывание Ca^{2+} /CaM1 устраня-

ет диссоциацию олигомера, кодируемого геном *AtGAD1*. N-концевой домен данного белка играет ключевую роль в поддержании олигомерной формы, поскольку удаление первых двадцати четырёх N-концевых остатков существенно влияет на олигомеризацию за счёт образования димерной формы фермента [3].

Регуляция ГДК с помощью Ca^{2+} /Кальмодулин-связанной системы растений может отражать потребность в быстрой модуляции ГАД в ответ на внешние сигналы, хотя роль ГАМК как нейромедиатора хорошо известна у животных, за последние несколько десятилетий было предложено несколько функций ГАМК в метаболизме растений. Кроме того, ГАМК считается сигнальной молекулой, уровень которой контролирует экспрессию регуляторных генов.

Также известно, что экспрессия генов семейства *GAD* в листьях, цветах и прорастающих семенах регулируется в процессе развития посредством транскрипционных и/или посттранскрипционных процессов.

Глутаматдекарбоксилаза у растительных организмов достаточно часто представлена несколькими генами, которые демонстрируют разные профили экспрессии, включая тканевую специфичность и реакцию на стресс. Это позволяет предположить, что для семейства генов *GAD* характерно явление специализации.

Ряд исследований выявили множественные гены семейства *GAD* у петунии, томата, табака, арабидопсиса и риса, а также дифференциальную органную локализацию двух изоформ как у арабидопсиса, так и у табака [5]. Ген *GAD1* преимущественно экспрессируется в корнях, тогда как экспрессия *GAD2* отмечалась во всех органах; экспрессия трех других генов *GAD* достаточно низкая [7]. У мутантов *A. thaliana* по гену *gad1* с потерей функции показал, что уровни ГАМК в корнях значительно ниже, чем в корнях дикого типа, и что индуцированное высокой температурой накопление ГАМК у мутантов по гену *gad1* прекращается [5]. Более того, антисмысловая супрессия *GAD* приводит к накоплению глутамата в плодах трансгенных томатов [8]. Индукция транскрипции одной или нескольких форм ГДК часто наблюдается в ответ на низкий уровень кислорода, дефицит воды, засоление [7, 9-11].

В геноме кукурузы ГДК кодируется тремя генами: *GAD1* (LOC100284394, Gene ID: 100284394), локализованный в 1 хромосоме, ген *GAD2* (LOC100284551, Gene ID: 100284551), ло-

кализованный во второй хромосоме и ген *GAD3* (LOC100381655, Gene ID: 100381655), чья локализация находится в 9 хромосоме (дата обращения 22.09.22).

Исходя из всего вышесказанного, целью нашего исследования было изучить характер функционирования гена *GAD1*, кодирующего глутаматдекарбоксилазу в геноме кукурузы, в гипоксических условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования влияния низких концентраций кислорода 10-12 дневные проростки кукурузы (*Zea mays L.*, сорт Воронежская 76), выращенные гидропонным способом при 25°C, были разделены на 2 группы и помещены в разные вакуум-экзикаторы при температуре 25 °С. В первый (контрольная группа) непрерывно осуществлялся приток кислорода воздуха. Во второй (опытная группа) в течение суток подавался азот со средней скоростью 17 см³/сек (содержание кислорода в баллоне с азотом составляло ≤0,5%) [12].

Экстракцию глутаматдекарбоксилазы осуществляли путем гомогенизации растительного материала в 20 мМ ацетатном буфере (рН 4,8) с добавлением 10 мМ пиридоксальфосфата, после чего центрифугировали при 12000g в течении 30 минут. Надосадочная жидкость использовалась для определения ГДК-активности [4].

Измерение активности глутаматдекарбоксилазы из листьев кукурузы осуществляли спектрофотометрически путем измерения оптической плотности раствора, содержащего: 20 мМ ацетатный буфер (рН 4,8), 70 мкМ бромкрезола зеленого, 10 мМ перидоксаль-5-фосфата, 2 мМ глутаминового кислого натрия. Измерение проводили при λ= 620 нм в течение 3 минут [4].

Расчет активности проводили по росту оптической плотности среды спектрофотометрирования согласно формуле:

$$E = (\Delta D \cdot k \cdot V_{\text{общ}}) / (V_{\text{внес}} \cdot t)$$

где, ΔD – изменение оптической плотности при длине волны 620 нм, k – поправочный коэффициент, V_{общ} – общий объем ферментативной вытяжки (мкл), V_{внес} – объем внесения (мкл), t – время (мин).

Выделение суммарной РНК проводилось путем фенол-хлороформной экстракции. Доде-

цилсульфат натрия использовался как основной компонент лизирующего буфера на стадии гомогенизации растительного материала [13].

Для анализа транскрипционной активности генов проводили количественную ПЦР в реальном времени проводили на приборе LightCycler96 («Roche», Швеция) с применением Taq-полимеразы (ЗАО «Евроген») согласно рекомендациям производителя.

Аmplифицированную кДНК использовали для проведения ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами (Табл. 1) на приборе LightCycler96 («Roche», Швеция) с применением Taq-полимеразы (ЗАО «Евроген») согласно рекомендациям производителя. В качестве интеркалирующего красителя использовали SYBR Green I. Амплификация осуществлялась по следующим параметрам: предварительная денатурация – 95°C, 10 мин; проведение 35 циклов, включающих стадии: 95°C – 20 сек; 58°C – 20 сек; 72°C – 20 сек. В завершении проводили 10 минутную финальную элонгацию при 72°C. Количественный контроль матрицы проводили с использованием ген-специфических праймеров к генам домашнего хозяйства (факторы элонгации Ef-1α). В качестве отрицательного контроля использовалась суммарная РНК, без стадии ОТ-ПЦР. Расчёт значений относительного уровня транскриптов исследуемых генов осуществляли с применением 2-ΔΔCt [15]. В качестве праймеров к генам глутаматдекарбоксилазы были использованы специфические праймеры к *GAD1*, подобранные ранее в ходе исследований (Таблица 1) [16].

Статистическая обработка данных. Опыты проводили в 3-кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы STATISTICA 12.0. Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка. Результаты на графиках выражали как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (SEM). Различия анализировали на статистическую значимость с использованием критерия Стьюдента. Дополнительно применялся однофакторный дисперсион-

Таблица 1

Олигонуклеотиды для гена *GAD1*

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °C
GAD1	Прямой	CCGGATCTGTGGTCGTC	58
	Обратный	CACTACTCCATTAGTACCAGCG	

ный анализ ANOVA. Представленные в работе различия статистически достоверны ($p \leq 0,05$) [17].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ динамики каталитической активности глутаматдекарбоксилазы позволил выявить активацию ферментативной системы с первого часа инкубации проростков кукурузы в условиях низкой концентрации кислорода (Рис. 1).

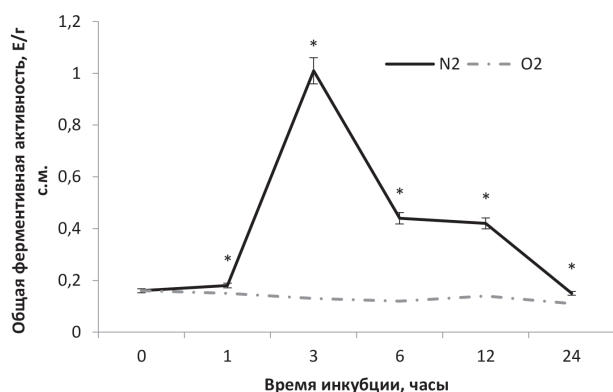


Рис. 1. Изменение общей ферментативной активности ГДК в проростках кукурузы при гипоксии

Максимальный пик активности исследуемой ферментной системы отмечается на 3 час эксперимента и превышает контрольные значения более чем в 5 раз. В последующие часы эксперимента в растениях, подверженных гипоксическому воздействию отмечалось постепенное снижение каталитической активности ГДК. Спустя сутки эксперимента показатели общей ферментативной активности были практически сопоставимы с данным показателем, полученным для контрольной группы растений.

Полученные данные указывают на возможную активацию пути декарбоксилирования глутамата в ГАМК. Таким образом, вероятно в условиях гипоксии активируется шунт ГАМК, который обеспечивает обход двух реакций ЦТК в условиях, когда 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс инактивируется [12, 15].

Анализ относительного уровня транскриптов гена *GAD1* в листьях кукурузы показал, что инкубация проростков кукурузы в гипоксических условиях вызывает увеличение уровня мРНК исследуемого гена начиная с первого часа стрессового воздействия (Рис. 2). Максимум концентрации мРНК зарегистрирован на 3 час эксперимента, и превышает контрольные значения в 1,6 раз. Однако, на 6 час эксперимента было отмечено снижение относительного уровня транскриптов исследуемого гена. Спустя сутки эксперимента уровень

транскриптов исследуемого гена был ниже контрольных значений более чем в 1,6 раза.

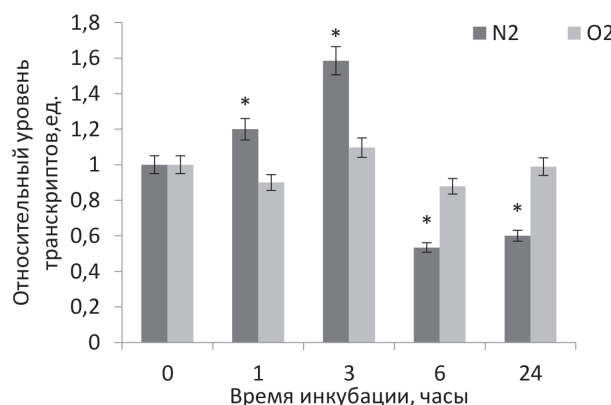


Рис. 2. Изменение относительного уровня транскриптов гена *GAD1* в листьях кукурузы в условиях низкого содержания кислорода ($n=3$). Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы можем говорить о том, что в условиях гипоксии увеличение ферментативной активности ГДК в первые часы эксперимента связаны с увеличением транскрипционной активности гена *GAD1*. Возможно, в регуляции ферментативной активности данного энзима в дальнейшем принимают участие другие гены семейства *GAD*. Кроме того, не исключено, что регуляция ГДК-активности после 24 часов осуществляется на биохимическом уровне за счёт изменения уровня метаболитов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023–2025 г., проект № FZGU-2023-0009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Leon J. The hypoxia-reoxygenation stress in plants / J. Leon, M. C. Castillo, B. Gayubas // J. of experimental botany. – 2021. – Vol. 72. – №. 16. – P. 5841-5856.
2. Сухарева Б.С. Глутаматдекарбоксилаза: структура и каталитические свойства / Б.С. Сухарева, Е.Л. Дарий, Р.Р. Христофоров // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 131-162.
3. Astegno A. Functional roles of the hexamer organization of plant glutamate decarboxylase / A. Astegno, G. Capitani, P. Dominici // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. – 2015. – Vol. 1854. – №. 9. – P. 1229-1237.
4. Yu K. A high-throughput colorimetric assay to measure the activity of glutamate decarboxylase / K.

Yu, S. Hu, J. Huang, L. Mei // Enzyme and microbial technology. – 2011. – Vol. 49. – №. 3. – P. 272-276.

5. Shelp B.J. Role of g-aminobutyrate and g-hydroxybutyrate in plant communication / B.J. Shelp, W.L. Allan, D. Faure // Plant-Environment Interactions: From Sensory Plant Biology to Active Plant Behavior. – 2009. – P. 73-84.

6. Ueno H. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase / H. Ueno // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2000. – Vol. 10. – №. 1-3. – P. 67-79.

7. Pasentsis K. Identification and expression profiling of low oxygen regulated genes from Citrus flavedo tissues using RT-PCR differential display / K. Pasentsis, V. Falara, I. Pateraki, D. Gerasopoulos, A.K. Kanellis // Journal of Experimental Botany. – 2007. – Vol. 58. – №. 8. – P. 2203-2216.

8. Kisaka H. Antisense suppression of glutamate decarboxylase in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) results in accumulation of glutamate in transgenic tomato fruits / H. Kisaka, T. Hiroaki, T. Miwa // Plant Biotechnology. – 2006. – Vol. 23. – №. 3. – P. 267-274.

9. Klok E. J. Expression profile analysis of the low-oxygen response in Arabidopsis root cultures / E.J. Klok, I.W. Wilson, D. Wilson, S.C. Chapman, R.M. Ewing, S.C. Somerville, W.J. Peacock, R. Dolferus, E.S. Dennis // The Plant Cell. – 2002. – Vol. 14. – №. 10. – P. 2481-2494.

10. Deeken R. An integrated view of gene expression and solute profiles of Arabidopsis tumors: a genome-wide approach / R. Deeken, J.C. Engelmann, M. Efetova, T. Czirjak, T. Muller, W.M. Kaiser, O. Tietz, M. Kruschke, M.J. Mueller, K. Palme, T. Dandekar, R. Hedrich // The Plant Cell. – 2006. – Vol. 18. – №. 12. – P. 3617-3634.

11. Cramer G.R. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles / G.R. Cramer, A. Ergul, J. Grimplet, R.L. Tillett, E.A.R. Tattersall, M.C. Bohlman, D. Vincent, J. Sonderegger, J. Evans, C. Osborne, D. Quilici, K.A. Schlauch, D.A. Schooley, J.C. Cushman // Functional & integrative genomics. – 2007. – Vol. 7. – P. 111-134.

12. Плотникова Е.В. Регуляция активности гидроксibuтиратдегидрогеназы в зеленых листьях кукурузы (*Zea mays* L.) в гипоксических условиях / Е.В. Плотникова, Г.Б. Анохина, А.Т. Епринцев, Д.Ю. Вандышев // Вестник ВГУ. Химия. Биология. Фармация. – 2023. – №3. – С.25-30.

13. Matz M. V. Green Fluorescent Protein. Humana Press / M.V. Matz. – Colorado, 2002. – p. 3-18.

14. Frank R.A.W. Crystal structure of the E1 component of the Escherichia coli 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex / R.A.W. Frank, A.J. Price, F.D. Northrop, R.N. Perham, B.F. Luisi // Journal of molecular biology. – 2007. – Vol. 368. – №. 3. – P. 639-651.

15. Епринцев А.Т. Роль метилирования промоторов генов глутаматдегидрогеназы (GDH1 и GDH2) в регуляции их экспрессии в листьях кукурузы при гипоксии / А.Т. Епринцев, Г.Б. Анохина // Физиология растений. – 2023. – Т.70. – №2. – С. 192-201.

16. Москвина П.П. Подбор специфических праймеров к генам глутаматдекарбоксилазы кукурузы / П.П. Москвина, Г.Б. Анохина, Д.Е. Бородкина // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрегиональный сборник научных работ. – 2023. – Вып. 25. – С. 148-151.

17. Лакин Г.Ф. Биометрия. / Г. Ф. Лакин – Москва: Высшая школа, 1990. – 351с.

*Воронежский государственный университет
Москвина Полина Павловна, Студент кафедры биохимии и физиологии клетки
E-mail: polinamoskvina2001@gmail.com*

*Анохина Галина Борисовна, к.б.н., ассистент кафедры биохимии и физиологии клетки,
E-mail: dowi2009@mail.ru*

*Епринцев Александр Трофимович, профессор, доктор биологических наук, заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

*Voronezh State University
Moskvina Polina P., Student of Biochemistry and Cell Physiology Department
E-mail: polinamoskvina2001@gmail.com*

*Anokhina Galina B., PhD., assistant of Biochemistry and Cell Physiology Department
E-mail: dowi2009@mail.ru*

*Eprintsev Alexander T., PhD., DSci., head of the Biochemistry and Cell Physiology Department
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

INFLUENCE OF LOW OXYGEN CONCENTRATIONS ON CHANGES IN THE EXPRESSION LEVEL OF THE GAD1 GLUTAMATE DECARBOXYLASE GENE IN CORN LEAVES

P.P. Moskvina, G.B. Anokhina, A.T. Eprintsev

Voronezh State University

Abstract. Unfavorable environmental conditions cause irreparable damage to agricultural land. Over millions of years of evolution, plants have developed their own strategy of adaptation to unfavorable environmental factors - this is a change in metabolic pathways that provide cells with energy and substrates.

An increase in water content in the environment can be either a natural process - increased rainfall, or an artificial process - excessive watering. It is known that a decrease in oxygen content in the environment leads to a decrease in the intensity of functioning of the tricarboxylic acid cycle, the central link of energy metabolism, as well as to processes associated with photosynthesis, nitrogen assimilation, and changes in the redox balance. Due to these changes, the γ -aminobutyric acid shunt is activated. Unfortunately, at present, the mechanisms of regulation of this metabolic pathway in the process of adaptation to external stress factors are still poorly understood. In addition, there is insufficient information about the mechanisms of connection between the Krebs cycle and the GABA shunt. More detailed studies will help to identify the peculiarities of enzyme functioning under stressful conditions, which will make it possible to create more resistant varieties of corn.

Based on this, it seems appropriate to study the regulation of metabolic pathways responsible for adaptation to hypoxic conditions. The goal of the work was to study the nature of the functioning of the GAD1 gene, encoding glutamate decarboxylase in the maize genome, under hypoxic conditions. The article contains data from a study of changes in the enzymatic activity of glutamate decarboxylase in the first twenty-four hours of incubation of corn seedlings under hypoxic conditions. It has been shown that a decrease in oxygen in the environment leads to activation of glutamate decarboxylase activity in the third hour of stress exposure. The use of the real-time PCR method made it possible to evaluate the dynamics of the transcriptional activity of the GAD1 gene, one of the genes of the GAD family, which encodes one of the glutamate decarboxylase isoenzymes in the *Zea mays* L. genome. The obtained data on the dynamics of the relative level of transcripts of the gene under study demonstrate an increase in the level of GAD1 gene mRNA in the third hour of the experiment, which indicates a significant role of this gene in providing glutamate decarboxylase activity during the adaptation of the plant cell to hypoxic conditions.

Keywords: glutamate decarboxylase, hypoxia, enzymatic activity, expression, *Zea mays* L.

REFERENCES

1. Leon J. The hypoxia-reoxygenation stress in plants / J. Leon, M.C. Castillo, B. Gayubas // *Journal of experimental botany*. – 2021. – Vol. 72. – №. 16. – P. 5841-5856.
2. Sukhareva B.S. Glutamate decarboxylase: structure and catalytic properties / B.S. Sukhareva, E.L. Darius, R.R. Khristoforov // *Advances in biological chemistry*. – 2001. – Vol. 41. – P. 131-162.
3. Astegno A. Functional roles of the hexamer organization of plant glutamate decarboxylase / A. Astegno, G. Capitani, P. Dominici // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2015. – Vol. 1854. – №. 9. – P. 1229-1237.
4. Yu K. A high-throughput colorimetric assay to measure the activity of glutamate decarboxylase / K. Yu, S. Hu, J. Huang, L. Mei // *Enzyme and microbial technology*. – 2011. – Vol. 49. – №. 3. – P. 272-276.
5. Shelp B.J. Role of γ -aminobutyrate and γ -hydroxybutyrate in plant communication / B.J. Shelp, W.L. Allan, D. Faure // *Plant-Environment Interactions: From Sensory Plant Biology to Active Plant Behavior*. – 2009. – p. 73-84.
6. Ueno H. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase / H. Ueno // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2000. – Vol. 10. – №. 1-3. – P. 67-79.
7. Pasentsis K. Identification and expression profiling of low oxygen regulated genes from Citrus flavedo tissues using RT-PCR differential display / K. Pasentsis, V. Falara, I. Pateraki, D. Gerasopoulos, A.K. Kanellis // *Journal of Experimental Botany*. – 2007. – Vol. 58. – №. 8. – P. 2203-2216.
8. Kisaka H. Antisense suppression of glutamate decarboxylase in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) results in accumulation of glutamate in transgenic

tomato fruits / H. Kisaka, T. Hiroaki, T. Miwa // Plant Biotechnology. – 2006. – Vol. 23. – №. 3. – P. 267-274.

9. Klok E. J. Expression profile analysis of the low-oxygen response in Arabidopsis root cultures / E.J. Klok, I.W. Wilson, D. Wilson, S.C. Chapman, R.M. Ewing, S.C. Somerville, W.J. Peacock, R. Dolferus, E.S. Dennis // The Plant Cell. – 2002. – Vol. 14. – №. 10. – P. 2481-2494.

10. Deeken R. An integrated view of gene expression and solute profiles of Arabidopsis tumors: a genome-wide approach / R. Deeken, J.C. Engelmann, M. Efetova, T. Czirjak, T. Muller, W.M. Kaiser, O. Tietz, M. Krischke, M.J. Mueller, K. Palme, T. Dandekar, R. Hedrich // The Plant Cell. – 2006. – Vol. 18. – №. 12. – P. 3617-3634.

11. Cramer G. R. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles / G.R. Cramer, A. Ergul, J. Grimplet, R.L. Tillett, E.A.R. Tattersall, M.C. Bohlman, D. Vincent, J. Sonderegger, J. Evans, C. Osborne, D. Quilici, K.A. Schlauch, D.A. Schooley, J.C. Cushman // Functional & integrative genomics. – 2007. – Vol. 7. – P. 111-134.

12. Plotnikova E.V., Anokhina G.B., Eprintsev A.T., Vandyshev D.Yu. Regulation of hydroxybutyrate dehydrogenase activity in green leaves of corn (*Zea mays L.*) under hypoxic conditions // Bulletin of

VSU. Chemistry. Biology. Pharmacy. – 2023. – No. 3. – P.25-30.

13. Matz M. V. Green Fluorescent Protein. Humana Press / M.V. Matz. – Colorado, 2002. – p. 3-18.

14. Frank R.A.W. Crystal structure of the E1 component of the Escherichia coli 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex / R.A.W. Frank, A.J. Price, F.D. Northrop, R.N. Perham, B.F. Luisi // Journal of molecular biology. – 2007. – Vol. 368. – №. 3. – P. 639-651.

15. Eprintsev A.T. The Role of Methylation of Glutamate Dehydrogenase Gene Promoters (GDH1 and GDH2) in the Regulation of Their Expression in Corn Leaves under Hypoxia / A.T. Eprintsev, G.B. Anokhina // Russian Journal of Plant Physiology . - 2023. - Vol.70. – №. 2. – P. 192-201.

16. Moskvina P.P. Selection of specific primers for maize glutamate decarboxylase genes / P. P. Moskvina, G. B. Anokhina, D. E. Borodkina // Organization and regulation of physiological and biochemical processes: Interregional collection of scientific works. – 2023. – Vol. 25. – pp. 148-151.

17. Lakin G.F. Biometrics. / G.F. Lakin - Moscow: Higher School, 1990. - 351 s.