

ВЛИЯНИЕ КИНЕТИНА И ЭПИБРАССИНОЛИДА НА СОДЕРЖАНИЕ ГАМК И СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ, СВЯЗАННЫХ С ЦИКЛОМ КРЕБСА, И КОЛЕБАНИЕ ИХ УРОВНЯ В РАСТЕНИЯХ ГОРОХА РАЗНЫХ СОРТОВ

А.Н. Ершова, Т.С. Чичиль

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный педагогический университет»

Поступила в редакцию 09.09.2024 г.

Аннотация. Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) является одной из важнейших непротеиногенных свободных аминокислот, которая играет метаболическую и сигнальную роль в растениях. Высокая растворимость и свойства амфолита позволяют ГАМК накапливаться в значительных количествах в клетках растений при стрессах, что повышает их устойчивость. Исследовали влияние фитогормонов кинетина и эпибрасинолида (ЭБ) на содержание ГАМК и свободных аминокислот α -аланина, аспартата и глутамата, образование которых связано с функционированием цикла Кребса. Содержание аминокислот анализировали методом тонкослойной хроматографии на пластинках "Silufol" ("Chemapol", Чехия) или методом бумажной хроматографии в ее микромодификации. После проявления нингидрином, оптическую плотность растворов измеряли при 500 нм (СФ-56, Россия). Содержание аминокислот рассчитывали по калибровочным кривым и выражали в мкмоль g^{-1} сырой массы. Было показано, что при введении растворов кинетина и ЭБ (10 мг/л) с транспирационным током (12 час.) в проростки гороха сорта «Рамонский 77» содержание свободных аминокислот, включая ГАМК, возрастало на 15-30%. Однако увеличение срока введения вызывало их снижение. В условиях полевого опыта при опрыскивании растворами фитогормонов растений гороха в стадию бутонизации было обнаружено, что под влиянием кинетина содержания ГАМК через 7 и 14 дней возрастало на 10-28%, а ЭБ вызывал увеличение до 158-160%. Таким образом нами было установлено, что обработка растений кинетином и ЭБ влияет на содержание свободных аминокислот, включая ГАМК. При этом эффект действия фитогормонов определялся как способом введения, так и возрастом обрабатываемых растений. При анализе проростков 14-и сортов гороха была выявлена группа сортов, в которых отмечалось высокое держание ГАМК до $4,26 \pm 0,01$ и глутамата до $10,70 \pm 0,07$ мкмоль g^{-1} сырой массы. Однако обнаружены сорта с низким содержанием ГАМК и высоким количеством глутамата в проростках. Полученные результаты можно использовать как в селекции, так и при подборе сортов гороха с повышенным содержанием аминокислоты ГАМК в проростках для питания. При этом использование фитогормонов кинетина и ЭБ позволяет увеличивать содержание ГАМК в клетках растений гороха, что важно и для повышения их устойчивости.

Ключевые слова: ГАМК, свободные белковые аминокислоты, влияние фитогормонов, сортовая специфичность содержания, растения гороха

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) является одной из важнейших непротеиногенных свободных аминокислот, которая встречается в клетках как прокариот, так и эукариот. Известно, что ГАМК играет важную метаболическую и даже сигнальную роль в растениях [1]. Высокая растворимость в сочетании со свойствами амфолита

позволяют ГАМК накапливаться в клетках растений в высоких концентрациях без значительных изменений pH и участвовать в регуляции осмотического давления в клетке [2]. Содержание ГАМК значительно, иногда на несколько порядков, возрастает в клетках растений при действии неблагоприятных условий среды, превышая уровень отдельных белковых аминокислот [3]. Показано, что высокие концентрации ГАМК в клетках повы-

шают стрессоустойчивость растений, что выражается в нормализации процессов фотосинтеза, торможении скорости образования активных форм кислорода (АФК) [2], увеличению активности антиоксидантных ферментов [4,5]. Эти результаты позволили использовать обработку растений экзогенной ГАМК для повышения устойчивости к различным стрессам, таким как солевой [4], условия низкого азотного питания [1], гипоксия [5]. Предполагают, что это связано с повышением уровня эндогенной ГАМК в их клетках [2,6,7].

Для увеличения содержания ГАМК в растениях стали использовать разные методы, включая проращивание семян в растворах с низкими концентрациями хлорида натрия [8], кратковременное воздействие на них ультразвуком [9]. Фитогормоны активно участвуют в основных процессах клеточного метаболизма растений [10]. Показано, что при обработке кинетином усиливался синтез полярных липидов, общих фосфолипидов, гликолипидов в растениях кукурузы [11] и в изолированных семядолях кабачка, при этом отмечалось повышение содержания каротиноидов и хлорофилла [12], увеличивалось содержание фенольных соединений [13]. При обработке брассинолидами у растений отмечали увеличение содержания флавоноидов и растворимых сахаров [14], пролина [15]. Однако влияние фитогормонов на содержание свободных аминокислот в растениях остается мало изученным и лишь частично анализировалось при исследовании действия цитокининов в рамках транскриптомного и протеомного анализов [16].

В последние годы было показано, что существуют не только межвидовые, но и сортовые особенности культурных растений как по степени устойчивости к стрессам, так и по содержанию метаболитов, таких как углеводы и белки [17], фенольные соединения [18], фосфолипиды, гликозиды и даже активность ферментов [19]. Однако анализ сортовых особенностей растений по содержанию свободных аминокислот практически не проводился. В связи с этим исследовали влияние фитогормонов кинетина и эпибрасинолида на содержание ГАМК и свободных аминокислот, образование которых связано с функционированием цикла Кребса, а также анализировали их уровень в разных сортах растений гороха.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектами исследования служили растения гороха (*Pisum sativum* L.) 14-и разных сортов. Семена были получены из коллекции кафедры растение-

водства ВГАУ им. Петра I (Воронеж), Орловской опытной станции и относились к раннеспелым и среднеспелым, рекомендованным для выращивания в Центральном регионе, кроме сорта Норд. В опытах использовали 10-дневные проростки гороха данных сортов, выращенные на водопроводной воде на свету (1000 люкс/см²) при 12-часовом фотопериоде и +22°C. При исследовании влияния фитогормонов кинетина и эпибрасинолида (ЭБ) использовали растения гороха сорта «Рамонский 77», которые выращивались в лабораторных условиях или в условиях полевого опыта. В надземную часть проростков, отделенную от корней и семядолей, вводили с транспирационным током растворы фитогормонов (10 мг/л) в 0,1М Na-фосфатном буфере (рН 7,2) в течение 12 и 24 часов. В полевых опытах растения опрыскивали растворами фитогормонов в стадию бутонизации и анализировали через 7 и 14 дней после обработки.

Листья растений гороха (0,4-0,5 г) фиксировали десятикратным объемом 96% этанола, нагретого до +60°C. Полученный спиртовой экстракт фильтровали, упаривали при +60°C, содержимое растворяли в 2 мл 10% изопропанола. Свободные аминокислоты разделяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках "Silufol" ("Chematrol", Чехия) при определении влияния фитогормонов или методом бумажной хроматографии в его микромодификации при определении содержания аминокислот в разных сортах проростков гороха. Хроматограммы разделяли в системе н-бутанол: уксусная кислота: вода (4:1:5) и проявляли раствором нингидрина [20,21]. Идентификацию аминокислот проводили по свидетелям и величине R_f и далее соответствующие аминокислоты элюировали раствором 75%-этанола, насыщенного сульфатом меди (CuSO₄·5H₂O). Оптическую плотность растворов измеряли при 500 нм (СФ-56, Россия). Содержание аминокислот рассчитывали по предварительно построенным калибровочным кривым и выражали в мкмоль г⁻¹сырой массы [20].

Опыты проводились в трех биологических и трех химических повторностях. Полученные данные обрабатывали с помощью пакета прикладных программ Excel, применяя метод описательной статистики. В таблицах и на диаграммах представлены среднеарифметические значения и их стандартные ошибки [19].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гамма-аминомасляная кислота, хотя и не входит в состав белков, играет важную роль в

обменных процессах не только животных, но и растений, являясь одним из компонентов ГАМК-шунта, который позволяет функционировать циклу Кребса в условиях блокирования активности ферментов, катализирующих превращение 2-оксоглутарата в янтарную кислоту. Было показано, что повышение содержания ГАМК в клетках растений при различных неблагоприятных условиях среды повышало их стрессоустойчивость [4,5]. Оказалось, что можно влиять на содержание ГАМК в растениях [8,9]. В опытах исследовали воздействие фитогормонов кинетина и ЭБ на содержание ГАМК и свободных аминокислот α -аланина, аспартата и глутамата, образование которых связано с функционированием цикла Кребса. Как известно [10] используются разные способы обработки растений фитогормонами, такие как опрыскивание листьев [5,22], инкубация растений в течение нескольких дней на растворах фитогормонов или введение в прикорневую зону [23]. В первой серии опытов растворы кинетина и ЭБ вводились с транспирационным током в проростки гороха сорта «Рамонский 77». в течение 12 и 24 час. Данный сорт был выбран в связи с тем, что именно с ним нами были проведены исследования по изучению метаболизма ГАМК в разных условиях аэрации [21] и включение ее в образование агликона специфического для растений гороха изосукцинимид- β -гликозида (ИС-гликозид) [19]. Как видно из результатов, представленных на рис.1, через 12 час введения кинетина содержание всех исследуемых аминокислот возрастало на 15-30%. Однако с увеличением времени введения содержание α -аланина, аспартата и глутамата снижалось, при этом только содержание ГАМК оставалось выше уровня контроля на 10%. При введении ЭБ (рис.2) содержание аминокислот в проростках гороха повышалось в меньшей степени. Содержание α -аланина возросло на 27%,

а ГАМК только на 15%. С увеличением времени поступления ЭБ содержание всех анализируемых свободных аминокислот падало и становилось ниже на 25-35% по отношению к необработанным проросткам, включая ГАМК. При изменении способа обработки растений фитогормонами были получены результаты, представленные в табл.1.

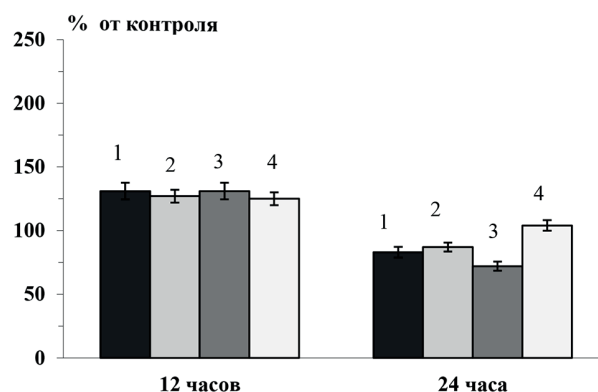


Рис. 1. Влияние кинетина на содержание свободных аминокислот в проростках гороха при введении с транспирационным током: 1-аспартат, 2 –глутамат, 3- аланин, 4 – ГАМК

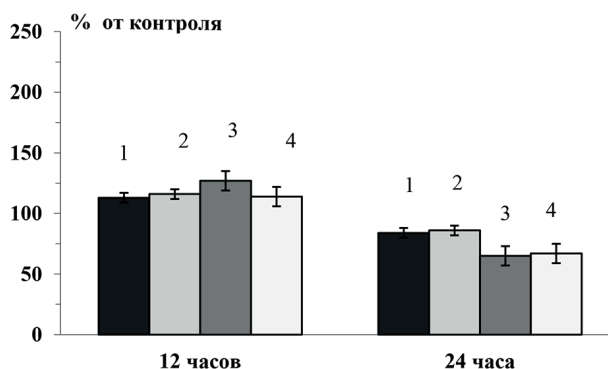


Рис. 2. Влияние ЭБ на содержание свободных аминокислот в проростках гороха при введении с транспирационным током: 1-аспартат, 2 –глутамат, 3- аланин, 4 – ГАМК

Таблица 1

Влияние фитогормонов на содержание свободных аминокислот через 7 и 14 дней после обработки растений гороха в фазу бутонизации

Вариант Аминокислоты	Контроль		+ кинетин		+ ЭБ	
	мкМ г ⁻¹ сырого веса	%	мкМ г ⁻¹ сырого веса	%	мкМ г ⁻¹ сырого веса	%
7 дней						
Аспартат	15,9 ± 1,2	100	16,3 ± 0,6	103	23,4 ± 0,6	147
Глутамат	9,2 ± 0,6	100	8,6 ± 0,4	93	5,7 ± 0,1	62
Аланин	6,3 ± 0,3	100	5,8 ± 0,3	92	6,8 ± 0,2	107
ГАМК	3,2 ± 0,1	100	4,1 ± 0,3	128	5,1 ± 0,1	160
14 дней						
Аспартат	8,2 ± 0,6	100	9,3 ± 0,6	113	6,0 ± 0,4	73
Глутамат	7,9 ± 0,1	100	7,7 ± 0,2	97	5,8 ± 0,2	71
Аланин	4,0 ± 0,1	100	4,3 ± 0,1	106	4,5 ± 0,1	113
ГАМК	2,8 ± 0,1	100	3,0 ± 0,2	107	4,1 ± 0,2	158

После опрыскивания растворами кинетина растений гороха в стадию бутонизации через 7 дней содержание аминокислот практически не изменилось, отмечалось только увеличение содержания ГАМК до 128%. С увеличением сроков наблюдения содержание всех анализируемых аминокислот снижалось, однако по отношению к необработанным растениям возрастало содержание аспартата, α -аланина и ГАМК на 5-15%. В отличие от этого, после обработки фитогормоном ЭБ в проростках гороха повышалось содержание аспартата до $23,4 \pm 0,6$ мкМ г⁻¹сыр веса (147%) и, особенно ГАМК, которое достигало $5,1 \pm 0,1$ мкМ г⁻¹сыр веса (160%). Через 14 дней содержание аминокислот глутамата и аспартата снижалось до 71-73%, но возрастало содержание α -аланина (113%), и ГАМК (158%).

Растения гороха являются важнейшей зернобобовой культурой России, отличающейся высоким содержанием белка в своих семенах. Селекция сортов гороха проводилась как в зерновом, так и кормовом направлении. Однако содержание свободных аминокислот, как белковых, так и не входящих в состав белка, в растениях гороха разных сортов практически не исследовалось. При изучении содержания свободных аминокислот в проростках 14-и сортов гороха, относящихся к группе ранне- и среднеспелых, было показано, что наибольшим содержанием ГАМК от $3,20 \pm 0,08$ до $4,26 \pm 0,01$ мкмоль г⁻¹сырой массы характеризовались сорта Рамонский 77, Рамонский 83, Флагман, Флагман 7, Флагман 8, Талловец 50, Орловчанин и Норд (рис.2). Эти же сорта отличались и более высоким содержанием глутаминовой кислоты ($7,65 \pm 0,06$ до $10,70 \pm 0,07$ мкмоль г⁻¹сырой массы) (рис.3). Значительно меньшее количество ГАМК присутствовало среди свободных аминокислот в проростках гороха сортов Рамонский 90, Талловец 55, Орловчанин 2, Орлус и Малиновка. Сорта Малиновка и Орлус при невысоком содержании ГАМК, отличались достаточно высоким уровнем глутамата $9,70 \pm 0,06$ и $11,22 \pm 0,16$ мкмоль г⁻¹ сырой массы соответственно. Содержание аминокислоты α -аланина, образование которой также связано с функционированием цикла Кребса, было значительно ниже у проростков гороха всех сортов, что характерно для бобовых культур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние года возрос интерес к изучению роли аминокислоты ГАМК в живых организмах.

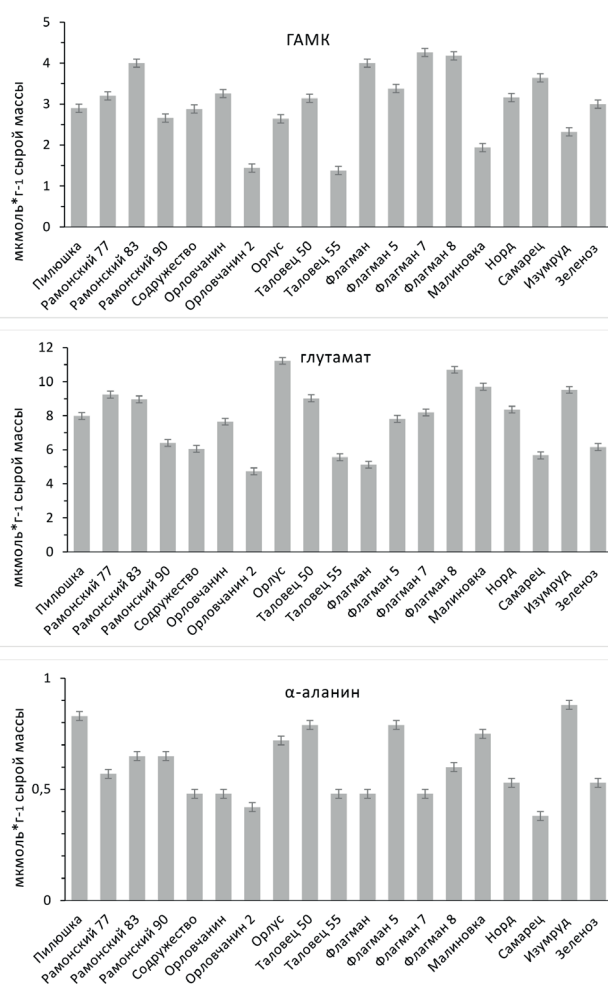


Рис. 3. Содержание ГАМК и свободных аминокислот, образование которых связано с циклом Кребса, в проростках гороха разных сортов

У животных и человека ГАМК выступает в роли нейромедиатора центральной нервной системы и играет важную роль в подавлении возбудимости нейронов. Основной путь образования ГАМК связан с реакциями декарбоксилирования глутаминовой кислоты, вследствие этого ГАМК и глутамат стали рассматривать как важные биологически активные компоненты в питании человека [24]. Стали использовать и растения с повышенным содержанием ГАМК для получения более сбалансированного функционального питания или искусственно обогащать ГАМК для повышения качества [8].

Если роль ГАМК в клетках животных и человека достаточно подробно исследована, то значение этой непротеиногенной аминокислоты для растений продолжает изучаться. ГАМК может накапливаться в растениях в значительных количествах при стрессах [17-19]. Одним из возможных механизмов действия ГАМК при стрессах назы-

вают стабилизацию клеточного pH и увеличение содержания анитоксидантов в клетках растений [2,4]. Установлено, что регуляторы роста кинетин и ЭБ повышают устойчивость растений к неблагоприятным условиям среды [10,22]. В своих опытах мы показали, что обработка растений кинетином и ЭБ повышает содержание свободных аминокислот, включая ГАМК. При этом, если растворы кинетина и ЭБ вводили в проростки гороха с транспирационным током, то эффект увеличения содержания ГАМК был выражен только в первые 12 часов. В этот период наблюдалось повышение содержания всех аминокислот, включая ГАМК, на 15-30%. Увеличение сроков введения фитогормонов вызывало, наоборот, снижение содержания всех аминокислот. В то же время при опрыскивании растворами фитогормонов растений гороха в стадию бутонизации обнаружили значительно большее накопление ГАМК в их листьях. Под влиянием кинетина происходило увеличение содержания ГАМК на 10-28%, а ЭБ вызывал увеличение до 158-160% по отношению к контрольным растениям. Таким образом было впервые установлено, что фитогормоны кинетин и ЭБ эффективно влияют на пул свободных аминокислот, повышая содержание ГАМК в их клетках. Можно предположить, что данные фитогормоны повышают стрессоустойчивость растений и за счет возросшего содержания ГАМК в их клетках. Однако эффект действия кинетина и ЭБ на уровень ГАМК в растениях гороха, определялся способом введения и возрастом обрабатываемых растений, что необходимо учитывать как при проведении экспериментов, так и при использовании данных фитогормонов в растениеводстве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Huang X.-J. Exogenous γ -aminobutyric acid (GABA.) alleviates nitrogen deficiency by mediating nitrate uptake and assimilation in *Andrographis paniculata* seedlings / X.-J. Huang, S.-F. Jian, S. Wan, J.-H. Miao, C. Zhong // *Plant Physiol. Biochem.* - 2023. - Vol.3. - 198. - P. 107700.
- Wang Y. γ -Aminobutyric acid imparts partial protection from salt stress injury to maize seedlings by improving photosynthesis and upregulating osmoprotectants and antioxidants/ Y.Wang, W.Gu, Y. Meng, T. Xie, L. Li, J. Li, S. Wei // *Sci. Rep.* - 2017. - Vol.7. - P. 43609.
- Wu Q. Hypoxia-induced increase in GABA content is essential for restoration of membrane potential and preventing ROS-induced disturbance to ion homeostasis/ Q.Wu, N. Su, X. Huang, J. Cui, L.Shabala, M. Zhou, M. Yu, S. Shabala// *Plant Commun.* - 2021. - Vol.2. - P.100188.
- Ma X. The synergistic benefits of β -aminobutyric acid and γ -aminobutyrate on salt and drought tolerance in cassava/ X. Ma, J. Gu, Q. Luo, M. Wen, H. Li, Z.-Y. Wang// *Plant Biotechnol. Rep.* - 2022. - Vol.16. - P. 29-35.
- Liu X. Watercore pear fruit respiration changed and accumulated γ -aminobutyric acid (GABA) in response to inner hypoxia stress/ X. Liu, D.-H. Liu, T. Chen, J. Zhang, C.-L. Wang// *Genes.* - 2022. - P. 977-989.
- Lü G. Molecular cloning and functional characterization of mitochondrial malate dehydrogenase (mMDH) is involved in exogenous GABA increasing root hypoxia tolerance in muskmelon plants/ G. Lü, Y. Liang, X. Wu, J. Li, W. Ma, Y. Zhang, H. Gao// *Sci. Hortic.* - 2019. - Vol.258. - P. 108741.
- Zhang M. Characterization of GABA-transaminase gene from Mulberry (*Morus multicaulis*) and its role in salt stress tolerance/M. Zhang, Z. Liu, C. Liu, H. Wang, Y. Li, Y. Xin, Y. Gai, X. Ji // *Genes (Basel).* - 2022. - Vol.13. - №3. - P. 501-509.
- Elbaloula, M.F. Effect of different salt concentrations on the gamma-aminobutyric-acid content and glutamate decarboxylase activity in germinated sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) grain/ M.F. Elbaloula, A.B. Hassan// *Food Science and Nutrition.* - 2022. - Vol.3. - P.1-7.
- Naumenko N. Stimulation of antioxidant activity and γ -aminobutyric acid synthesis in germinated wheat grain *Triticum aestivum* L. by ultrasound: Increasing the nutritional value of the product/ N. Naumenko, I. Potoroko, I. Kalinina// *Ultrason. Sonochem.* - 2022. - Vol.86. - P.106000.
- Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р., Кудряков Н.В., Кузнецов В.В. Роль цитокининов в стрессоустойчивости растений // *Физиология растений.* - 2017. - Т. 64. - № 1. - С. 19–32.
- Ершова А.Н., Стерлигова И.А. Тонкослойная хроматография фосфолипидов растений *Zea mays* (L.) при действии фитогормона кинетина в разных условиях аэрации // *Сорбционные и хроматографические процессы.* - 2023. - Т.23. - № 5. - С. 879-886.
- Yash P. Effect of kinetin (6-furfurylaminopurine) on changes in membrane lipids in relation to growth of isolated cotyledons of vegetable marrow *Cucurbita pero* L./ P.Yash, S. Gupta// *Plant Sci.* - 1988. - Vol.55. - №.2. - P. 83-92.

13. Hönig M. Role of Cytokinins in Senescence, Antioxidant Defence and Photosynthesis/ M. Hönig, L. Plíhalová, A. Husíčková, K. Doleža// International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol.19. – № 2. – P.4045.
14. Wu D. Waterlogging faced by bulbil expansion improved the growth of Pinellia ternata and its effect reinforced by brassinolide/ D. Wu, D. Zhang, Z. Geng, W. Gao, M. Tong, J. Chu, X. Yao// Plant Physiol Biochem. – 2024. – Vol.20. – №207. –P.108377.
15. Alam P. 24-Epibrassinolide (EBR) Confers Tolerance against NaCl Stress in Soybean Plants by Up-Regulating Antioxidant System, Ascorbate-Glutathione Cycle, and Glyoxalase System/ T.H. Albalawi, F.H. Altalayan, M.A. Bakht, M.A. Ahanger, V. Raja, M. Ashraf, P. Ahmad // Biomolecules. – 2019. – Vol.9. – №11. – P.640-652.
16. Ma X. Hormone regulation of rhizome development in tall fescue (Festuca arundinacea) associated with proteomic changes controlling respiratory and amino acid metabolism/ X. Ma, Q. Xu, W.A. Meyer, B. Huang// Annals of Botany. – 2016. – Vol.118. – №3. – P.481–494.
17. Шафигуллин Д.Р. Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса/ Д.Р. Шафигуллин - 2019. - Т41. - № 3. - С. 30-32.
18. Шафигуллин Д.Р. Предрасположенность накопления фенольных соединений у сои (Glycine max (L.) Merr.) в зависимости от овощного направления использования / Д.Р. Шафигуллин, Е.П. Пронина, М.С. Гинс, А.В. Солдатенко А.В. //Российская сельскохозяйственная наука - 2020. - №4. С. 22-24.
19. Ершова А.Н. Особенности пространственной структуры и содержание специфического гликозида Pisum sativum L./ А.Н. Ершова, Н.В. Винокурова //Вестник ВГУ: Химия, Биология, Фармация. - 2021. - № 2. - С. 27-33.
20. Ershova A.N. Vinokurova N.V. Effect of Phytohormones of Kinetin and Epibrassinolide on Content and Intracellular Localization of Glucosides and Free Amino Acids in Pea Plants Cells (Pisum sativum L.)/ A.N. Ershova, N.V. Vinokurova // International Journal of Secondary Metabolite (IJSM). – 2018. – Vol. 5. –№ 2. – P. 156–162.
21. Ершова А.Н. Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода/ А.Н. Ершова – Воронеж: ВГУ, 2007, - 264 с
22. Derevyanchuk M. Influence of exogenous 24-Epicasterone on the hormonal status of soybean plants/ M. Derevyanchuk, S. Kretynin, Y. Bukhonska, I. Pokotylo, V. Khripach, E. Ruelland, R. Filepova, P.I. Dobrev, J. Martinec, V. Kravets//Plants. – 2023. – Vol.12. -№20. -P.3586.
23. Liu X. Cytokinin Effects on Creeping Bentgrass Response to Heat Stress: II. Leaf Senescence and Antioxidant Metabolism/ X. Liu, B. Huang// Crop Science. - 2002. - Vol.42. -№2. - P.466-472.
24. Pencheva D. Validation of HPLC Method for Analysis of Gamma-Aminobutyric and Glutamic Acids in Plant Foods and Medicinal Plants /D. Pencheva, D. Teneva, P. Denev //Molecules. - 2022. – Vol.28. - №1. - P.84-91.
25. Hayes F.J. Intraspecific variation in soy across the leaf economics spectrum/ F.J. Hayes, S.W. Buchanan, B. Coleman, A.M. Gordon, P.B. Reich, N.V. Thevathasan, I.J. Wright, A.R. Martin//Annals of Botany. – 2019. - Vol.123. - №1. – P.107–120.

Воронежский государственный педагогический университет

**Ершова Антонина Николаевна, доктор биологических наук, профессор кафедры биологии растений и животных*

Email: profershova@mail.ru

Чичиль Татьяна Сергеевна, магистрант кафедры биологии растений и животных

Voronezh State Pedagogical University

Ershova Antonina N., PhD., DSci., Full Professor, Dept. of Plant and Animal Biology

Email: profershova@mail.ru

Chichil Tatyana S., master student, Dept. of Plant and Animal Biology

IMPACT OF KINETIN AND EPIBRASSINOLIDE ON CONTENT OF GABA AND FREE AMINOACIDS LINKED TO CREBS CYCLE AND FLUCTUATION OF THEIR LEVEL IN PEA PLANTS OF DIFFERENT VARIETIES

A.N. Ershova, T.S. Chichil

Voronezh State Pedagogical University

Abstract. Gamma-amino butyric acid (GABA) is one of the most important nonproteinogenic free amino acids which plays important metabolic and signaling role in plants. High solvability and ampholyte properties enable GABA to accumulate in significant amounts in plant cells under stress resulted in increased tolerance. Impact of phytohormones kinetin and epibrassinolide (EB) on GABA content and free amino acids such as α -alanine, aspartate and glutamate which formation is related to Krebs cycle functioning was investigated. Amino acids content was analyzed by thin layer chromatography method on "Silufol" ("Chemapol", Czech Republic) or by paper chromatography in its micro modification. After development by ninhydrine a transmission density of the solution was measured under 500 nm (SF-56, Russia). Amino acids content was calculated using calibration curve and expressed in micromole g⁻¹ fresh weight. It was shown that under injection of kinetin and EB solutions (10mg/l) with transpiration stream (12h) into pea seedlings of "Ramonsky 77" the content of free amino acids including GABA was increased up to 15-30%. But prolongation of infusion time induced their decrease. A field experiment when pea plants in bud stage were sprayed by phytohormones solution revealed an increase of GABA content under kinetin after 7 and 14 days on 10-28% and EB induced an increase up to 158-160%. Thus, we found that kinetin and EB treatment influence the content of free amino acids including GABA. In this case a phytohormones effect was determined by injection method and by age of the plants under treatment. An analysis of 14 pea varieties the number of cultivars showed high GABA up to $4,26 \pm 0,01$ and glutamate up to $10,70 \pm 0,07$ micromole g⁻¹ fresh weight. However, the varieties with low GABA and high glutamate in the seedlings were also discovered. The obtained results can be used in breeding and in selection of pea varieties with higher GABA content for nutrition. Implementation of kinetin and EB allows to increase GABA content in cells of pea plants which is important for their tolerance increase.

Keywords: GABA, free protein amino acids, impact of phytohormones, cultivar specificity of content, pea plants

REFERENCES

1. Huang X.-J. Exogenous γ -aminobutyric acid (GABA.) alleviates nitrogen deficiency by mediating nitrate uptake and assimilation in *Andropogon paniculatus* seedlings / X.-J. Huang, S.-F. Jian, S. Wan, J.-H. Miao, C. Zhong// *Plant Physiol. Biochem.* - 2023. - Vol.3. - №198. - P. 107700.
2. Wang Y. γ -Aminobutyric acid imparts partial protection from salt stress injury to maize seedlings by improving photosynthesis and upregulating osmoprotectants and antioxidants/ Y.Wang, W.Gu, Y. Meng, T. Xie, L. Li, J. Li, S. Wei// *Sci. Rep.* - 2017. - Vol.7. - P. 43609.
3. Wu Q. Hypoxia-induced increase in GABA content is essential for restoration of membrane potential and preventing ROS-induced disturbance to ion homeostasis/ Q.Wu, N. Su, X. Huang, J. Cui, L.Shabala, M. Zhou, M. Yu, S. Shabala// *Plant Commun.* - 2021. - Vol.2. - P.100188.
4. Ma X. The synergistic benefits of β -aminobutyric acid and γ -aminobutyrate on salt and drought tolerance in cassava/ X. Ma, J. Gu, Q. Luo, M. Wen, H. Li, Z.-Y. Wang// *Plant Biotechnol. Rep.* - 2022. - Vol.16. - P. 29-35.
5. Liu X. Watercore pear fruit respiration changed and accumulated γ -aminobutyric acid (GABA) in response to inner hypoxia stress/ X. Liu, D.-H. Liu, T. Chen, J. Zhang, C.-L. Wang// *Genes.* - 2022. - P. 977-989.
6. Lü G. Molecular cloning and functional characterization of mitochondrial malate dehydrogenase (mMDH) is involved in exogenous GABA increasing root hypoxia tolerance in muskmelon plants/ G. Lü, Y. Liang, X. Wu, J. Li, W. Ma, Y. Zhang, H. Gao// *Sci. Hortic.* - 2019. - Vol.258. - P. 108741.
7. Zhang M. Characterization of GABA-transaminase gene from Mulberry (*Morus multicaulis*)

and its role in salt stress tolerance/M. Zhang, Z. Liu, C. Liu, H. Wang, Y. Li, Y. Xin, Y. Gai, X. Ji // *Genes* (Basel). - 2022. - Vol.13. - №3. - P. 501-509.

8. Elbaloula, M.F. Effect of different salt concentrations on the gamma-aminobutyric-acid content and glutamate decarboxylase activity in germinated sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) grain/ M.F. Elbaloula, A.B. Hassan// *Food Science and Nutrition*. - 2022. - Vol.3. - P.1-7.

9. Naumenko N. Stimulation of antioxidant activity and γ -aminobutyric acid synthesis in germinated wheat grain *Triticum aestivum* L. by ultrasound: Increasing the nutritional value of the product/ N. Naumenko, I. Potoroko, I. Kalinina// *Ultrason. Sonochem.* - 2022. - Vol.86. - P.106000.

10. Veselov D.S., Kudoyarova G.R., Kudryakov N.V., Kuznetsov V.V. Role of cytokinines in stress tolerance of plants/ D.S. Veselov, G.R. Kudoyarova, N.V. Kudryakov, V.V. Kuznetsov // *Plant Physiology* (Russian). - 2017. - Vol.64. - No.1.- P.19–32.

11. Ershova A.N. Thin layer chromatography of plant phospholipids of *Zea mays* (L.) under the action of the phytohormone kinetin in different aeration conditions/ A.N. Ershova, I.A. Sterligova // *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. - 2023. - Vol.23- No.5. P.879-886.

12. Yash P. Effect of kinetin (6-furfurylaminopurine) on changes in membrane lipids in relation to growth of isolated cotyledons of vegetable marrow *Cucurbita pepo* L./ P.Yash, S. Gupta// *Plant Sci.* - 1988. - Vol.55. - №2. - P. 83-92.

13. Hönig M. Role of Cytokinins in Senescence, Antioxidant Defence and Photosynthesis/ M. Hönig, L. Plíhalová, A. Husíčková, K. Doleža// *International Journal of Molecular Sciences*. - 2018. - Vol.19. - № 2. - P.4045.

14. Wu D. Waterlogging faced by bulbil expansion improved the growth of *Pinellia ternata* and its effect reinforced by brassinolide/ D. Wu, D. Zhang, Z. Geng, W. Gao, M. Tong, J. Chu, X. Yao// *Plant Physiol Biochem.* - 2024. - Vol.20. - №207. -P.108377.

15. Alam P. 24-Epibrassinolide (EBR) Confers Tolerance against NaCl Stress in Soybean Plants by Up-Regulating Antioxidant System, Ascorbate-Glutathione Cycle, and Glyoxalase System/ T.H. Albalawi, F.H. Altalayan, M.A. Bakht, M.A. Ahanger, V. Raja, M. Ashraf, P. Ahmad// *Biomolecules*. - 2019. - Vol.9. - №11. - P.640-652.

16. Ma X. Hormone regulation of rhizome development in tall fescue (*Festuca arundinacea*) associated with proteomic changes controlling respiratory and amino acid metabolism/ X. Ma, Q. Xu, W.A. Meyer, B. Huang// *Annals of Botany*. - 2016. - Vol.118. - №3. - P.481–494.

17. Shafigullin D.R. Teoreticheskie i prikladnye problem agropromyshlennogo kompleksa/ D.R. Shafigullin – 2019. - Vol. 41. – No. 3. – P. 30-32.

18. Shafigullin D.R. Rossijskaja selskokhozyajstvennaya nauka/ D.R. Shafigullin, E.P. Pronina, M.S. Ghins, A.V. Soldatenko – 2020. – No. 4. P. 22-24.

19. Ershova A.N. Highlights of spatial structure and specific glycoside content of *Pisum sativum* L./ A.N. Ershova, N.V. Vinokurova // *Vestnik VGU: Chemistry, Biology, Farmacia*. - 2021. - № 2. - C. 27-33.

20. Ershova A.N. Vinokurova N.V. Effect of Phytohormones of Kinetin and Epibrassinolide on Content and Intracellular Localization of Glucosides and Free Amino Acids in Pea Plants Cells (*Pisum sativum* L.)/ A.N. Ershova, N.V. Vinokurova // *International Journal of Secondary Metabolite (IJSM)*. - 2018. - Vol. 5. -№2. - P. 156–162.

21. Ershova A.N. Metabolicheskaya adaptatsiya rastenij k gipoksii i povyshennomu soderzhaniyu dioksida ugleroda/A.N. Ershova – Voronezh: VSU Publ., 2007. - 264 s.

22. Derevyanchuk M. Influence of exogenous 24-eEpicasterone on the hormonal status of soybean plants/ M. Derevyanchuk, S. Kretynin, Y. Bukhonska, I. Pokotylo, V. Khripach, E. Ruelland, R. Filepova, P.I. Dobrev, J. Martinec, V. Kravets// *Plants*. - 2023. - Vol.12. -№20. -P.3586.

23. Liu X. Cytokinin Effects on Creeping Bentgrass Response to Heat Stress: II. Leaf Senescence and Antioxidant Metabolism/ X. Liu, B. Huang// *Crop Science*. - 2002. - Vol.42. -№2. - P.466-472.

24. Pencheva D. Validation of HPLC Method for Analysis of Gamma-Aminobutyric and Glutamic Acids in Plant Foods and Medicinal Plants /D. Pencheva, D. Teneva, P. Denev // *Molecules*. - 2022. - Vol.28. - №1. - P.84-91.

25. Hayes F.J. Intraspecific variation in soy across the leaf economics spectrum/ F.J. Hayes, S.W. Buchanan, B. Coleman, A.M. Gordon, P.B. Reich, N.V. Thevathasan, I.J. Wright, A.R. Martin// *Annals of Botany*. - 2019. - Vol.123. - №1. – P.107–120.