

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ТАРАБАН ДМИТРО АНАТОЛІЙОВИЧ

УДК 581.1:577.13

ДИСЕРТАЦІЯ

**СИГНАЛЬНІ І ПРОТЕКТОРНІ ЕФЕКТИ МЕЛАТОНІНУ У РОСЛИН
ЗА ДІЇ АБІОТИЧНИХ СТРЕСОРІВ**

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

 Д.А. Тарабан

Науковий керівник: Карпець Юрій Вікторович, доктор біологічних наук,
професор

Харків – 2025

АНОТАЦІЯ

Тарабан Д.А. Сигнальні і протекторні ефекти мелатоніну у рослин за дії абіотичних стресорів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» – Державний біотехнологічний університет, Харків, 2025

Актуальність, мета і завдання дослідження. Накопичення знань про механізми регуляції адаптивних реакцій рослин на несприятливі чинники з початку нового століття набуло особливої динамічності. Цьому сприяли секвенування геномів вищих рослин, що відбулися на межі 20 і 21 століть, формування загальних уявлень про передачу зовнішніх і внутрішніх сигналів у рослинних клітинах, а потім і розвиток «омік» – транскриптоміки, протеоміки, метаболоміки. Ці загальнобіологічні успіхи сприяли значному прогресу у розумінні механізмів розвитку індукованої стійкості рослин. При цьому розширилися уявлення про гормональну і метаболічну регуляцію стійкості рослин. Перелік рослинних гормонів поповнився цілою низкою нових класів сполук, серед яких, зокрема, саліцилати, жасмонати, стріголактони і рослинні нейротрансмітери, одним з найважливіших представників яких є мелатонін (N-ацетил-5-метокситриптамін). Його вважають мультифункціональним стресовим метаболітом, який водночас за регуляторним потенціалом порівнюваний з класичними фітогормонами.

Встановлена участь мелатоніну в процесах росту та розвитку рослин, зокрема, проростання зернівок, розвитку кореневої системи, визрівання плодів, формування урожаю. Отримано дані щодо збільшення ендогенного вмісту мелатоніну у відповідь на дію стресових чинників та накопичені відомості про підвищення стійкості рослин до абіотичних стресорів під впливом екзогенного мелатоніну. Водночас дотепер не склалося цілісної картини щодо механізмів стрес-протекторної дії мелатоніну. Зокрема, слабо досліджені сигнальні посередники, задіяні в реалізації захисних ефектів

мелатоніну, недостатньо даних про конкретні адаптивні реакції, що індукуються дією мелатоніну, та стосовно видових і сортових особливостей його впливу на рослини.

Основна мета дисертаційної роботи полягала у з'ясуванні ролі сигнальних посередників (АФК та іонів кальцію) у прояві стрес-протекторної дії мелатоніну на зернові злаки та визначенні внеску антиоксидантної системи і окремих стресових метаболітів у реалізацію його фізіологічних ефектів на рослини у ювенільній стадії розвитку.

Для досягнення цієї мети було поставлено такі завдання: (1) оцінити ефективність впливу екзогенного мелатоніну на інтегральні показники стійкості проростків пшениці та жита до абіотичних стресорів (високі температури, модельна посуха, сольовий стрес); (2) інгібіторним методом встановити участь АФК та іонів кальцію у реалізації впливу мелатоніну на теплостійкість проростків пшениці і функціонування антиоксидантної системи; (3) виявити видові і сортові особливості впливу мелатоніну на стійкість зернових злаків до осмотичних стресів; (4) оцінити можливість регуляції мелатоніном редокс-гомеостазу і проростання зернівок злаків, що зазнали впливу прискореного старіння.

Об'єкти і методи. Експериментальними об'єктами були м'яка пшениця (*Triticum aestivum* L.), жито (*Secale cereale* L.) і тритикале ($\times$ *Triticosecale*). Ці культури є господарсько важливими зерновими злаками, водночас вони мають істотні відмінності у стійкості до несприятливих умов довкілля і стратегіях адаптації. В експериментах використовували зразки пшениці трьох сортів: Тобак, що відрізняється високою посухостійкістю; Досконала – чутливий до посухи, а також сорт Етана який є одним з відносно стійких і найбільш поширених іноземних сортів, вирощуваних в Україні. Крім того у роботі використовували насіння озимого тритикале сорту Раритет і озимого жита сорту Пам'ять Худоєрка.

При дослідженні механізмів впливу мелатоніну на стійкість проростків пшениці до потенційно летального теплового стресу зернівки пророщували у

чашках Петрі на дистильованій воді протягом 3 діб, після чого додавали мелатонін у концентраціях діапазону 10^{-8} - 10^{-4} М та витримували проростки на розчинах протягом 24 год. Для з'ясування участі АФК та іонів кальцію як сигнальних посередників у реалізації стрес-протекторної дії мелатоніну використовували обробку проростків скавенджером пероксиду водню диметилтіосечовиною (ДМТС), інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом, хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА та інгібітором утворення інозитол-1,4,5-фосфату, залежного від фосфоліпази С, неоміцином. Для визначення теплостійкості проростків їх піддавали ушкоджувальному прогріву у водяному ультратермостаті при температурі $45.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ протягом 10 хв. В окремих серіях експериментів тепловий стрес створювали шляхом прогріву проростків у повітряному термостаті у відкритих чашках Петрі за температури 44°C протягом 6 год. Упродовж інкубації проростків на розчинах досліджуваних сполук та після теплового стресу визначали показники генерації супероксидного аніон-радикала, вмісту гідроген пероксиду, продукту пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) малонового діальдегіду (МДА), активність антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази – СОД, каталази та гваяколпероксидази). В експериментах зі створенням потенційно летального теплового стресу шляхом прогріву у водяному термостаті одразу після стресу оцінювали стан мембран коренів (за виходом речовин, що поглинають в області УФ), а через 3 доби визначали виживаність проростків. У дослідях зі створенням нелетального стресу (прогрів у повітряному термостаті) вплив стресу оцінювали за інгібуванням росту відносно контролю через 24 год після прогріву. Крім перелічених показників у цих експериментах визначали вміст у проростках осмолітів – розчинних вуглеводів і проліну.

При дослідженні впливу мелатоніну на проростання насіння злаків з низькими посівними якостями використовували зернівки жита (сорт Пам'ять Худоєрка) і тритикале (сорт Раритет), які протягом трьох років зберігалися в приміщенні у неконтрольованих умовах, внаслідок чого схожість насіння

знизилася приблизно до 40% у тритикале та 30% у жита. У варіантах з обробкою мелатоніном насіння витримували протягом 3 годин у розчинах мелатоніну в концентраціях 5, 20 та 50 мкМ у термостаті при 24°C. Потім насіння висушували в термостаті до вихідної вологості. Після цього насіння розкладали в чашки Петрі з двома шарами стерильного фільтрувального паперу, зволоженого дистильованою водою, і пророщували в темному термостаті при температурі 24°C. Через 2 доби пророщування оцінювали відносну кількість схожого насіння та масу пагонів та коренів проростків. На 3 добу пророщування пагони нормально пророслого насіння використовували для біохімічних аналізів (визначали показники генерації активних форм кисню, вміст МДА, активність антиоксидантних ферментів, вміст фенольних і флавоноїдних сполук).

В експериментах з дослідження впливу праймінгу мелатоніном на проростання зернівок пшениці (сорт Етана) за дії осмотичних стресів як контрольний варіант використовували зразки насіння, витримані протягом 3 год в темному термостаті при 24°C в склянках з дистильованою водою. Зразки дослідних варіантів інкубували протягом 3 год у 20 мкМ розчині мелатоніну. Надалі насіння на скляній поверхні висушували протягом 24 год у темному термостаті до вихідної вологості. Потім насіння пророщували у чашках Петрі на воді або розчинах ПЕГ 6000 (15%) чи NaCl (100 мМ). Через 2 доби у зернівках визначали активність амілази, а через 3 доби у пагонах аналізували біохімічні показники (генерацію супероксидного аніон-радикала, вміст пероксиду водню і МДА, активність каталази і гваяколпероксидази, вміст розчинних вуглеводів і проліну).

Основні результати. Обробка проростків пшениці розчинами мелатоніну в концентраціях діапазону від 10^{-8} до 10^{-5} М підвищувала їх виживаність після ушкоджувального прогріву. Максимальний позитивний ефект спричиняла концентрація порядку 10^{-6} М. За передпосівної обробки насіння пшениці і жита мелатоніном в концентраціях 20-100 мкМ зменшувалось інгібування росту проростків після впливу на них помірного

теплого стресу, поєднаного з помірною повітряною посухою. Більш помітний протекторний ефект мелатоніну виявлено на проростках пшениці. Встановлено, що крім позитивного впливу на ріст проростків, що зазнали дії стресорів, обробка зернівок пшениці мелатоніном сприяла збереженню у проростках вмісту води, близького до контрольного варіанта.

Отримані дані, які свідчать про залучення АФК та іонів кальцію в реалізацію стрес-протекторної дії мелатоніну: його вплив на виживаність проростків після дії ушкоджувального прогріву усувався антиоксидантом ДМТС, інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом, хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА та інгібітором фосфоліпази С неоміцином. Зазначені сполуки також нівелювали вплив обробки проростків мелатоніном на активність антиоксидантних ферментів каталази і гваяколпероксидази.

Порівняння впливу праймінгу насіння мелатоніном на теплостійкість проростків пшениці і жита виявило наявність видових відмінностей його ефектів. На проростки жита мелатонін впливав менш помітно, ніж на проростки пшениці. Обробка насіння мелатоніном перешкоджала розвитку окиснювального стресу, спричинюваного дією високої температури, що виявлялося у зниженні показників генерації супероксидного радикала, вмісту пероксиду водню і малонового діальдегіду у пагонах проростків пшениці і жита. У обох видів злаків у проростках, отриманих із зернівок, праймованих мелатоніном, відзначені ефекти підвищення активності каталази на фоні теплового стресу, також під впливом мелатоніну виявлено стабілізацію активності пероксидази за стресових умов у пшениці та її підвищення у жита. Водночас обробка зернівок мелатоніном спричиняла підвищення вмісту розчинних вуглеводів за стресових умов, але істотно не впливала на вміст проліну у пагонах проростків обох видів.

В умовах осмотичного стресу (модельна посуха) обробка мелатоніном шляхом надходження через корені позитивно впливала на накопичення біомаси проростками пшениці чутливого (Досконала) і стійкого (Тобак) сортів. При цьому вона значно пом'якшувала окиснювальні ушкодження

шляхом впливу на різні складові антиоксидантної системи. Під впливом мелатоніну стабілізувалася активність ключових ферментів цієї системи – СОД та гваяколпероксидази, а також кількість цукрів, антоціанів та флавоноїдів. Обробка мелатоніном в умовах модельної посухи викликала суттєве підвищення вмісту проліну у нестійкого сорту пшениці Досконала. Загалом більш виражену стрес-протекторну дію мелатонін чинив на проростки саме чутливого до посухи сорту пшениці.

Праймінг зернівок пшениці мелатоніном за умов модельної посухи (вплив ПЕГ 6000) і сольового стресу підвищував їх схожість, посилював ріст проростків, а також збільшував співвідношення між біомасою пагонів і коренів. Водночас обробка зернівок мелатоніном пом'якшувала спричинюване стресами інгібування амілази і сприяла накопиченню розчинних вуглеводів у пагонах проростків. Під впливом мелатоніну зменшувалися показники генерації АФК і прояву окиснювальних пошкоджень у пагонах проростків. При цьому обробка насіння мелатоніном сприяла збільшенню активності одного з ключових антиоксидантних ферментів – каталази.

Праймінг старого насіння тритикале і жита мелатоніном істотно підвищував схожість, а також посилював ріст проростків. Дія мелатоніну значно перевершувала ефекти гідропраймінгу насіння, який також підвищував його схожість. Однією з причин підвищення схожості старого насіння тритикале та жита під впливом мелатоніну може бути пом'якшення окиснювального стресу, що супроводжує проростання насіння. На це вказує зменшення генерації супероксидного аніон-радикала, вмісту пероксиду водню і продукту пероксидного окиснення ліпідів малонового діальдегіду у проростках, а також підвищення в них активності антиоксидантних ферментів СОД і каталази та вмісту антоціанів.

Таким чином, у роботі вперше проведено дослідження причинно-наслідкових зв'язків між змінами кальцієвого гомеостазу, генерацією АФК та формуванням індукованої мелатоніном теплостійкості рослин (на прикладі

проростків пшениці) і встановлено, що розвиток теплостійкості проростків і активація їх ферментативної антиоксидантної системи під впливом мелатоніну можливі лише за умови посилення генерації АФК, пов'язаного з підвищенням активності НАДФН-оксидази. Водночас посилення генерації АФК клітинами відбувається за умови надходження іонів кальцію з позаклітинного простору та внутрішньоклітинних компартментів.

Також у роботі вперше встановлено здатність мелатоніну посилювати проростання старих зернівок жита і тритикале і зменшувати прояв окиснювального стресу, яким супроводжується процес проростання зернівок.

Практичне значення роботи полягає, зокрема, у доведенні можливості підвищення стійкості зернових злаків до абіотичних стресів шляхом праймінгу насіння розчинами мелатоніну. Ця процедура передбачає відносно короткочасне замочування насіння у розчинах мелатоніну з подальшим висушуванням до вихідного стану. Результати досліджень можуть стати основою для розробки спеціальних технологій праймінгу насіння мелатоніном з метою поліпшення проростання насіння за стресових умов і підвищення стійкості рослин на ранніх фазах розвитку.

Ключові слова: мелатонін, пшениця, жито, тритикале, праймінг насіння, посуха, тепловий стрес, сольовий стрес, стійкість, ріст, біопродуктивність, антиоксидантні ферменти, активні форми кисню, пероксидне окиснення ліпідів, осморегуляція.

SUMMARY

Taraban D.A. Signaling and protective effects of melatonin in plants under influence of abiotic stressors – Qualification scientific work on the rights of manuscript

Dissertation for degree of Philosophy Doctor in specialty 091 “Biology” – State Biotechnological University, Kharkiv, 2025

Actuality, purpose and tasks of investigation. Since the beginning of the new century, the accumulation of knowledge about the mechanisms of regulation of plant adaptive responses to adverse factors has become particularly dynamic. This was facilitated by the sequencing of higher plant genomes at the turn of the 20th

and 21st centuries, the formation of general ideas about the transduction of external and internal signals in plant cells, and then the development of “omics” - transcriptomics, proteomics, and metabolomics. These general biological successes have contributed to significant progress in understanding the mechanisms of induced plant resistance. At the same time, the understanding of the hormonal and metabolic regulation of plant resistance has expanded. The list of plant hormones has been supplemented by a number of new classes of compounds, including, in particular, salicylates, jasmonates, strigolactones and plant neurotransmitters, one of the most important representatives of which is melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine). It is considered to be a multifunctional stress metabolite, which at the same time is comparable to classical phytohormones in terms of its regulatory potential.

The participation of melatonin in the processes of plant growth and development, in particular, seed germination, root system development, fruit ripening, and yield formation, has been established. Data have been obtained on the increase of endogenous melatonin content in response to stress factors and information has been accumulated on the increase of plant resistance to abiotic stressors under the influence of exogenous melatonin. At the same time, there is still no complete picture of the mechanisms of melatonin's stress-protective effect. In particular, the signaling mediators involved in the realization of the protective effects of melatonin are poorly understood, and there is insufficient data on specific adaptive responses induced by melatonin and on species and varietal characteristics of its effect on plants.

The main purpose of the dissertation was to determine the role of signaling mediators (ROS and calcium ions) in the manifestation of the stress-protective effect of melatonin on cereals and to determine the contribution of the antioxidant system and individual stress metabolites to the realization of its physiological effects on plants in the juvenile stage of development.

To achieve this purpose, the following tasks were set: (1) to evaluate the effectiveness of exogenous melatonin on the integral indicators of resistance of

wheat and rye seedlings to abiotic stressors (high temperatures, model drought, salt stress); (2) to determine the participation of ROS and calcium ions in the realization of the effect of melatonin on the heat resistance of wheat seedlings and the functioning of the antioxidant system by the inhibitory method; (3) to identify species and varietal peculiarities of melatonin effect on the resistance of cereals to osmotic stress; (4) to evaluate the possibility of melatonin regulation of redox homeostasis and germination of cereal grains exposed to accelerated aging.

Objects and methods. The experimental objects were durum wheat (*Triticum aestivum* L.), rye (*Secale cereale* L.) and triticale ($\times$ *Triticosecale*). These crops are economically important cereals, but at the same time they have significant differences in resistance to adverse environmental conditions and adaptation strategies. The experiments used wheat samples of three varieties: Tobacco, which is highly drought-resistant; Doskonala, which is sensitive to drought; and also Etana, which is one of the relatively resistant and most common foreign varieties grown in Ukraine. In addition, the seeds of winter triticale of the Rarytet variety and winter rye of the Pamyat Khudoerka variety were used in the study.

To study the mechanisms of melatonin effect on the resistance of wheat seedlings to potentially lethal heat stress, the seeds were germinated in Petri dishes in distilled water for 3 days, after that melatonin was added in concentrations of the range of 10^{-8} - 10^{-4} M and the seedlings were kept in the solutions for 24 hours. To determine the involvement of ROS and calcium ions as signaling mediators in the realization of the stress-protective effect of melatonin, seedlings were treated with the hydrogen peroxide scavenger dimethylthiourea (DMTU), NADPH oxidase inhibitor imidazole, extracellular calcium chelator EGTA, and inhibitor of inositol-1,4,5-phosphate formation dependent on phospholipase C neomycin. To determine the heat tolerance of seedlings, they were subjected to damaging heating in the water ultrathermostat at $45.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ for 10 min. In separate series of experiments, heat stress was made by heating the seedlings in the air thermostat in open Petri dishes at 44°C for 6 h. During the incubation of seedlings in solutions of the studied compounds and after heat stress, the generation of superoxide anion

radical, the content of hydrogen peroxide, the product of lipid peroxidation (LPO) malondialdehyde (MDA), the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase - SOD, catalase and guaiacol peroxidase) were determined. In experiments with the creation of potentially lethal heat stress by heating in the water thermostat, the state of root membranes was assessed immediately after stress (by the release of compounds that absorb in the UV region), and after 3 days the survival of seedlings was determined. In experiments with the creation of non-lethal stress (heating in the air thermostat), the effect of stress was measured by growth inhibition relative to the control 24 h after heating. In addition to the listed indicators, the content of osmolytes - soluble carbohydrates and proline - in seedlings was measured in these experiments.

To study the effect of melatonin on the germination of seeds of cereals with low sowing qualities, we used rye (Pamyat Khudoerka) and triticale (Rarytet) seeds that had been stored indoors under uncontrolled conditions for three years, as a result of which seed germination decreased to about 40% for triticale and 30% for rye. Under the melatonin treatment, the seeds were incubated for 3 hours in melatonin solutions in concentrations of 5, 20, and 50 μM in thermostat at 24°C. Then the seeds were dried in thermostat to the original moisture content. After that, the seeds were placed in Petri dishes with two layers of sterile filter paper moistened with distilled water and germinated in a dark thermostat at 24°C. After 2 days of germination, the relative number of germinating seeds and the weight of shoots and roots were evaluated. On the 3rd day of germination, shoots of normally germinated seeds were used for biochemical analyzes (determined indicators of generation of reactive oxygen species, MDA content, activity of antioxidant enzymes, content of phenolic and flavonoid compounds).

In the experiments investigating the effect of melatonin priming on the germination of wheat grains (Etana variety), samples of seeds kept for 3 hours in a dark thermostat at 24°C in glasses with distilled water were used as a control. Samples of the experimental variants were kept for 3 hours in 20 μM melatonin solution. Subsequently, the seeds on the glass surface were dried for 24 h in dark

thermostat to the original moisture content. After that, the seeds were germinated in Petri dishes in water or solutions of PEG 6000 (15%) or NaCl (100 mM). After 2 days, amylase activity was determined in the grains, and after 3 days, biochemical indicators were analyzed in the shoots (generation of superoxide anion radical, content of hydrogen peroxide and MDA, activity of catalase and guaiacol peroxidase, content of soluble carbohydrates and proline).

Main results. The treatment of wheat seedlings with melatonin solutions in concentrations ranging from 10^{-8} to 10^{-5} M increased their survival after damaging heating. The maximum positive effect was caused by the concentration of order 10^{-6} M. Pre-sowing treatment of wheat and rye seeds with melatonin in concentrations of 20-100 μ M reduced the inhibition of seedling growth after exposure to moderate heat stress combined with moderate air drought. A more noticeable protective effect of melatonin was found on wheat seedlings. It was established that in addition to the positive effect on the growth of seedlings exposed to stressors, the treatment of wheat grains with melatonin contributed to the preservation of water content in seedlings close to the control variant.

Data were obtained indicating the involvement of ROS and calcium ions in the implementation of the stress-protective effect of melatonin: its effect on seedling survival after exposure to damaging heating was eliminated by the antioxidant DMTU, the NADPH oxidase inhibitor imidazole, the extracellular calcium chelator EGTA, and the phospholipase C inhibitor neomycin. These compounds also neutralized the effect of melatonin treatment on the activity of antioxidant enzymes catalase and guaiacol peroxidase.

Comparison of the effect of seed priming with melatonin on the heat resistance of wheat and rye seedlings revealed the presence of species differences in its effects. Melatonin had a less significant effect on rye seedlings than on wheat seedlings. Seed treatment with melatonin prevented the development of oxidative stress caused by high temperature, which was manifested in the decrease of generation of superoxide radical, content of hydrogen peroxide and malondialdehyde in the shoots of wheat and rye seedlings. In both species of

cereals, seedlings obtained from melatonin-primed grains showed the effects of increasing catalase activity under heat stress, and under the influence of melatonin, the activity of peroxidase was found to stabilize under stress conditions in wheat and increase in rye. At the same time, melatonin treatment of grains caused an increase in the content of soluble carbohydrates under stress conditions, but did not significantly affect the proline content in the shoots of seedlings of both species.

Under the conditions of osmotic stress (model drought), melatonin treatment by entering through the roots had the positive effect on the accumulation of biomass by seedlings of sensitive (Doskonala) and resistant (Tobac) wheat varieties. At the same time, it significantly mitigated oxidative damage by affecting various components of the antioxidant system. Under the influence of melatonin, the activity of the key enzymes of this system – SOD and guaiacol peroxidase, as well as the amount of sugars, anthocyanins and flavonoids – stabilized. Melatonin treatment under model drought conditions caused the significant increase in proline content in non-resistant wheat variety Doskonala. In general, melatonin had a more pronounced stress-protective effect on the seedlings of drought-sensitive wheat variety.

Priming of wheat grains with melatonin under conditions of model drought (exposure to PEG 6000) and salt stress increased their germination, enhanced seedling growth, and increased the ratio between shoot and root biomass. At the same time, melatonin treatment of grains mitigated the stress-induced inhibition of amylase and promoted the accumulation of soluble carbohydrates in the shoots of seedlings. Under the influence of melatonin, the generation of ROS and the manifestation of oxidative damage in the shoots of seedlings decreased. At the same time, melatonin treatment increased the activity of one of the key antioxidant enzymes – catalase.

Priming of old triticale and rye seeds with melatonin significantly increased germination and seedling growth. The effect of melatonin was significantly superior to the effects of hydropriming of seeds, which also increased their germination. One of the reasons for the increase in germination of old triticale and

rye seeds under the influence of melatonin may be the mitigation of oxidative stress accompanying seed germination. This is indicated by the decrease in the generation of superoxide anion radical, hydrogen peroxide and the product of lipid peroxidation malondialdehyde in seedlings, as well as the increase in the activity of antioxidant enzymes SOD and catalase and the content of anthocyanins.

Thus, for the first time, we investigated the cause-and-effect relationships between changes in calcium homeostasis, ROS generation, and the formation of melatonin-induced heat resistance of plant (using wheat seedlings as an example) and found that the development of seedling heat resistance and activation of their enzymatic antioxidant system under the influence of melatonin are possible only if the generation of ROS is enhanced, associated with an increase in the activity of NADPH oxidase. At the same time, the increase in ROS generation by cells occurs when calcium ions enter from the extracellular space and intracellular compartments.

Also, the ability of melatonin to enhance the germination of old rye and triticale grains and to reduce the manifestation of oxidative stress, which accompanies the process of grain germination, was established for the first time in this work.

The practical significance of the work lies, in particular, in proving the possibility of increasing the resistance of cereal plants to abiotic stresses by priming seeds with melatonin solutions. This procedure involves a relatively short-term soaking of seeds in melatonin solutions, followed by drying to the original state. The results of the research can become the basis for the development of special technologies for seed priming with melatonin in order to improve seed germination under stress conditions and increase plant resistance in the early stages of development.

Keywords: melatonin, wheat, rye, triticale, seed priming, drought, heat stress, salt stress, resistance, growth, bioproductivity, antioxidant enzymes, reactive oxygen species, lipid peroxidation, osmoregulation.

Публікації

Статті у наукових виданнях, що індексовані у наукометричній базі даних Scopus:

1) Kolupaev Yu.E., **Taraban D.A.**, Karpets Yu.V., Makaova B.E, Ryabchun N.I., Dyachenko A.I., Dmitriev O.P Induction of cell protective reactions of *Triticum aestivum* and *Secale cereale* to the effect of high temperatures by melatonin // *Cytology and Genetics*. 2023. 57, №2. P. 117-127. <https://doi.org/10.3103/S0095452723020068> (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, написанні тексту статті, обробка результатів)

2) Karpets Yu.V., **Taraban D.A.**, Kokorev A.I., Yastreba T.O., Kobyzeva L.N., Kolupaev Yu.E. Response of wheat seedlings with different drought tolerance to melatonin action under osmotic stress // *Agriculture and Forestry*. 2023. 69, 5. P. 53-69. <https://doi.org/10.17707/AgricultForest.69.4.05> (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка результатів)

3) Kolupaev Yu.E., **Taraban D.A.**, Kokorev A.I., Yastreba T.O., Pysarenko V.M., Sherstiuk E., Karpets Yu.V. Effect of melatonin and hydropriming on germination of aged triticale and rye seeds // *Botanica*. 2024. 30, 1. P. 1-13. <https://doi.org/10.35513/Botlit.2024.1.1> (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, написанні тексту статті, обробка результатів)

4) Kolupaev Yu.E., **Taraban, D.A.**, Karpets, Yu.V., Kokorev A.I., Yastreba T.O., Blume Y.B., Yemets A.I. Involvement of ROS and calcium ions in developing heat resistance and inducing antioxidant system of wheat seedlings under melatonin's effects // *Protoplasma*. 2024. 261. P. 975-989. <https://doi.org/10.1007/s00709-024-01952-z> (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка результатів)

Статті у наукових фахових виданнях України:

5) **Тарабан Д.А.**, Карпець Ю.В., Ястреб Т.О., Дяченко А.І., Колупаєв Ю.Є. Ca^{2+} - і АФК-залежне індукування теплостійкості проростків пшениці екзогенним мелатоніном // *Доповіді Національної академії наук України*.

2022. №4. С. 98-105. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.04.098> (Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експериментів, обробка результатів)

6) Колупаєв Ю.Є., **Тарабан Д.А.**, Карпець Ю.В., Панченко В.Г. Мелатонін у рослин: участь у сигналінгу й адаптації до абіотичних чинників // Фізіологія рослин і генетика. 2022. 54, №5. С. 371-386. <https://doi.org/10.15407/frg2022.05.371> (пошук, аналіз і узагальнення даних літератури)

Глава в монографії, проіндексованій у наукометричній базі даних

Scopus:

7) Kolupaev Y.E., **Taraban D.A.**, Karpets Y.V., Beschasnyi S.P., Kravets O.A., Relina L.I., Yemets A.I., Blume Y.B. Melatonin as an emerging new phytohormone and its role in plant adaptation to abiotic stress factors // Regulation of Adaptive Responses in Plants / Eds. Yastreba T.O., Kolupaev Y.E., Yemets A.I., Blume Y.B. N.Y.: Nova Science Publishers, 2024. P. 209-257. <https://doi.org/10.52305/TXQB2084> (Пошук, аналіз і узагальнення даних літератури).

Матеріали конференцій:

8) **Taraban D.A.**, Karpets Yu.V., Yastreba T.O., Kolupaev, Yu.E. Influence of melatonin on ROS generation by cells of roots of wheat seedlings and their heat resistance // The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation, (15-17 of June 2022 Kyiv). Kyiv, 2022. P. 90.

9) Колупаєв Ю.Є., **Тарабан Д.А.**, Карпець Ю.В., Макаова Б.Є., Дяченко А.І. Вплив мелатоніну на теплостійкість проростків пшениці у зв'язку зі змінами редокс-гомеостазу. Селекція, генетика та біотехнологія сільськогосподарських рослин: досягнення, інновації та перспективи: тези доповідей Міжнародної наукової інтернет-конференції (26 жовтня 2022 р. Одеса). Одеса, 2022. С. 127-128.

10) Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., **Taraban D.A.**, Kokorev O. I., Kobyzeva L.N., Yemets A.I., Blume Ya.B. Melatonin-induced wheat resistance to heat in interplay with changes of ROS generation and neutralization // Plant Stress and

Adaptation: Abstracts of the Second International Scientific Conference, dedicated to the 125th anniversary of the birth of Prof. F.P. Matskov (7-8 June 2023 Kharkiv). Kharkiv, 2023. P. 80-81.

11) **Тарабан Д.А.**, Карпець Ю.В., Кокорев О.І., Кобизєва Л.Н., Колупаєв Ю.Є. Вплив мелатоніну на стан антиоксидантної та осмопротекторної систем проростків пшениці за умов модельної посухи // Актуальні проблеми генетики, біотехнології та біохімії рослин: тези доповідей Міжнародної наукової конференції, присвяченої 140 річчю з дня народження академіка Андрія Сапєгіна (1883–1946), ботаніка, цитолога, генетика, селекціонера (19 жовтня 2023 р., СГІ–НЦНС, Одеса,). Одеса, 2023. С. 83-84.

12) **Тарабан Д.**, Карпець Ю., Кокорев О., Колупаєв Ю. Активація проростання зернівок і підвищення теплостійкості *Secale cereale* на ранніх фазах розвитку дією мелатоніну // Матеріали XV З'їзду Українського ботанічного товариства (30 вересня – 4 жовтня 2024 р. Івано-Франківськ). Одеса : Видавничий дім «Гельветика», 2024. С. 46.

13) **Тарабан Д.А.**, Карпець Ю.В. Перспективи використання мелатоніну в лісовому господарстві // Лісівництво, переробляння деревини та землевпорядкування: здобутки, стан і перспективи: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції (29–30 жовтня 2024 р. ДБТУ, Харків). Харків, 2024. С. 49-50

14) **Тарабан Д.А.**, Карпець Ю.В., Ястреб Т.О., Колупаєв Ю.Є. Вплив праймінгу зернівок пшениці мелатоніном на їх проростання за умов осмотичних стресів // Сучасні технології в рослинництві. Тези Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції, присвяченої 150-річчю з дня народження видатного вітчизняного вченого-рослиника Рожественського Бориса Миколайовича (27-28 листопада 2024 р. НААН України Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва, Харків). Харків, 2024. С. 213.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	21
ВСТУП	22
РОЗДІЛ 1 УЧАСТЬ МЕЛАТОНІНУ В АДАПТИВНИХ РЕАКЦІЯХ РОСЛИН (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	29
1.1. Біосинтез мелатоніну у рослин	31
1.2. Зміна вмісту мелатоніну у рослин у відповідь на дію стрес-факторів	34
1.3. Мелатонін як учасник сигнальної мережі рослинних клітин	37
1.3.1. Рецепція сигналу мелатоніну	37
1.3.2. Мелатонін і кальцієвий сигналінг	38
1.3.3. Мелатонін і АФК-сигналінг.	41
1.3.4. Функціональна взаємодія мелатоніну та оксиду азоту.	44
1.4. Регуляція адаптивних реакцій рослин екзогенним мелатоніном	47
1.4.1. Холодовий стрес.	48
1.4.2. Тепловий стрес.	49
1.4.3. Посуха.	50
1.4.4. Сольовий стрес.	52
1.5. Вплив мелатоніну на проростання насіння	53
Висновки до розділу 1	55
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	57
2.1. Об'єкти дослідження та їх коротка характеристика	57
2.2. Дизайн експериментів	57
2.2.1. Дослідження участі сигнальних сполук у реалізації фізіологічних функцій мелатоніну.	57
2.2.2. Дослідження сортових особливостей впливу мелатоніну на стійкість проростків пшениці до модельної посухи.	58
2.2.3. Дослідження впливу праймінгу насіння зернових злаків мелатоніном на його проростання і ріст проростків за стресових і нормальних умов.	59
2.3. Біохімічні аналізи	62
2.3.1. Визначення показників генерації АФК та окислювального стресу.	62
2.3.2. Аналіз активності антиоксидантних ферментів.	64
2.3.3. Визначення активності амілази у зернівках.	65

2.3.4. Вимірювання вмісту низькомолекулярних сполук зі стрес-протекторними властивостями.	65
2.4. Повторність експериментів і статистична обробка результатів	66
РОЗДІЛ 3. ФЕНОМЕНОЛОГІЯ ВПЛИВУ МЕЛАТОНІНУ НА СТІЙКІСТЬ РОСЛИННИХ ОБ'ЄКТІВ ДО ВИСОКИХ ТЕМПЕРАТУР І МОДЕЛЬНОЇ ПОСУХИ	68
3.1. Вплив мелатоніну на стійкість проростків злаків до потенційно летального і помірного теплового стресу	68
3.2. Вплив мелатоніну на стійкість проростків пшениці до модельної посухи	73
Висновки до розділу 3	75
Розділ 4 МЕХАНІЗМИ ІНДУКУВАННЯ МЕЛАТОНІНОМ ТЕПЛО- І ОСМОСТІЙКОСТІ ПРОРОСТКІВ ЗЛАКІВ	76
4.1. Участь АФК і кальцію в індукуванні теплостійкості проростків пшениці мелатоніном	76
4.1.1. Вплив мелатоніну на генерацію АФК коренями проростків пшениці.	76
4.1.2. Динаміка активності антиоксидантних ферментів у коренях проростків пшениці при інкубації на розчині мелатоніну.	77
4.1.3. Активність антиоксидантних ферментів, генерація АФК та показники стану мембран коренів проростків пшениці після впливу теплового стресу.	79
4.1.4. Вміст пероксиду водню та активність антиоксидантних ферментів у коренях проростків пшениці при їх обробці антагоністами АФК і кальцію у поєднанні з мелатоніном.	80
4.1.5. Виживаність проростків пшениці після теплового стресу при їх обробці антагоністами АФК та кальцію у поєднанні з мелатоніном.	83
4.1.6. Можливі механізми стрес-протекторного впливу мелатоніну на проростки пшениці за умов теплового стресу.	83
4.2. Вплив праймінгу мелатоніном зернівок пшениці і жита на функціонування стрес-протекторних систем за дії високих температур	89
4.3 Вплив мелатоніну на стійкість проростків пшениці різних генотипів до модельної посухи	99
4.3.1. Вміст маркерів окиснювального стресу за впливу модельної посухи і мелатоніну на проростки пшениці різних генотипів.	100

4.3.2. Активність антиоксидантних ферментів за впливу модельної посухи і мелатоніну на проростки пшениці різних генотипів.	101
4.3.3. Вміст низькомолекулярних захисних сполук.	103
Висновки до розділу 4	109
РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ПРОРОСТАННЯ ЗЕРНІВОК ЗЛАКІВ ЗА НОРМАЛЬНИХ І СТРЕСОВИХ УМОВ	111
5.1. Механізми активації обробкою мелатоніном проростання зернівок пшениці за умов осмотичного і сольового стресів	111
5.1.1. Вплив мелатоніну на схожість зернівок та біомасу проростків пшениці.	112
5.1.2. Активність амілази у зернівках за дії стресових факторів та мелатоніну.	114
5.1.3. Вміст розчинних вуглеводів і проліну у пагонах проростків пшениці.	115
5.1.4. Рівень генерації АФК та інтенсивність ПОЛ у пагонах проростків пшениці.	116
5.1.5. Активність каталази і гваяколпероксидази у пагонах проростків пшениці.	118
5.1.6. Кореляційний аналіз впливу мелатоніну на проростання зернівок пшениці за стресових умов та біохімічні показники.	118
5.2. Вплив мелатоніну на проростання зернівок жита і тритикале зі зниженою схожістю	125
5.2.1. Схожість насіння тритикале та жита.	127
5.2.2. Біомаса органів проростків тритикале та жита.	127
5.2.3. Генерація активних форм кисню та рівень пероксидного окиснення ліпідів у проростках.	130
5.2.4. Активність антиоксидантних ферментів.	131
5.2.5. Вміст антоціанів у пагонах проростків.	132
5.2.6. Можливі механізми впливу мелатоніну на проростання насіння злаків з низькими посівними якостями.	133
Висновки до розділу 5	136
ВИСНОВКИ	137
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	140

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АБК – абсцизова кислота

АФА – активні форми азоту

АФК – активні форми кисню

БТШ – білки теплового шоку

ГПО – гваяколпероксидаза

ДМТС – диметилтіосечовина

ЕГТА – етиленглікольтетраоцтова кислота

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

МДА – малоновий діальдегід

НСТ – нітросиній тетразолій

ПЕГ – поліетиленгліколь

ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів

ПТМ – посттрансляційна модифікація білків

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – тіобарбітурова кислота

ТХО – трихлороцтова кислота

РТЮ – 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide

ВСТУП

Актуальність теми. Культурні рослини постійно зазнають значного впливу абіотичних стресорів (посуха, високі температури, засолення ґрунту), які значно знижують врожайність. Ці фактори спричиняють суттєві втрати врожайності та обмежують продуктивність рослин, особливо в регіонах із посушливим кліматом і нестабільними погодними умовами. За оцінками, більше 50% зниження врожайності пов'язане з дією абіотичних стресорів.

Пошуки вирішення проблеми стійкості рослин ведуться у площині використання селекційно-генетичних (традиційних методів селекції і нових засобів генетичної інженерії) та фізіологічних підходів. Останні включають широкий арсенал фітогормонів, їх синтетичних аналогів, а також сигнальних посередників і стресових метаболітів. Серед цих сполук останніми роками значна увага приділяється дослідженню так званих рослинних нейротрансмітерів – речовин, що виконують роль медіаторів передачі нервового збудження у тварин (мелатонін, серотонін, дофамін, ацетилхолін, γ -аміномасляна кислота) (Akula & Mukherjee, 2020). У цій групі сполук найбільший інтерес дослідників викликає мелатонін (N-ацетил-5-метокситриптамін) (Colombage et al., 2023).

Показано вплив мелатоніну на різних етапах онтогенезу рослин на численні їх функції: циркадні ритми, проростання насіння, розвиток коренів, старіння листків, цвітіння, формування насіння та дозрівання плодів (Wang et al., 2024). Накопичено і численні відомості про підвищення стійкості рослин до абіотичних стресорів різної природи під впливом екзогенного мелатоніну (Agathokleous et al., 2021; Wang et al., 2022b).

Мелатонін бере участь у регуляції ключових сигнальних шляхів, зокрема кальцієвих і АФК-залежних каскадів, а також взаємодіє з іншими сигнальними молекулами, такими як оксид азоту (NO) та сірководень (H_2S) (Kolupaev et al., 2024). Однак, незважаючи на значний прогрес у вивченні властивостей мелатоніну, молекулярні механізми його дії, функціональні

зв'язки з іншими компонентами сигнальної мережі з'ясовані далеко не повністю, що обмежує можливості його широкого застосування в рослинництві (Li et al., 2020).

Як одну із важливих причин захисної дії мелатоніну розглядають його антиоксидантні ефекти. Вони можуть бути як прямими, так і опосередкованими. Пряма антиоксидантна дія мелатоніну, присутнього в рослинах, значною мірою зумовлена його здатністю взаємодіяти з АФК (Arnao, Hernandez-Ruiz, 2015). Однак вплив мелатоніну на редокс-гомеостаз не обмежується прямим антиоксидантним ефектом. У багатьох дослідженнях повідомляється про індукування мелатоніном експресії генів антиоксидантних ферментів (Martinez et al., 2018; Sun et. el., 2018; Zhao et al., 2018) і його вплив на синтез низькомолекулярних антиоксидантів (Ahmad et al., 2019). Ще один механізм антиоксидантного захисту під впливом мелатоніну пов'язаний зі зниженням експресії генів, що кодують основні молекулярні форми каталітичної субодиниці НАДФН-оксидази (Lei et al., 2021). Водночас у літературі є відомості, які, навпаки, вказують на підвищення активності НАДФН-оксидази під впливом мелатоніну та залучення АФК як посередників у шляху передачі його сигналів (Chang et al., 2021). У цілому стрес-протекторні ефекти мелатоніну зумовлені його залученням до складної сигнальної мережі рослинних клітин. Імовірно, важливу роль у цій мережі відіграє функціональна взаємодія мелатоніну з АФК та іонами кальцію як універсальними внутрішньоклітинними месенджерами. Наприклад, у рослин кавуна показано залучення АФК, генерованих НАДФН-оксидазою, та іонів кальцію, що надходять у цитозоль через іонні канали, керовані циклічними нуклеотидами, у реалізацію протекторної дії мелатоніну при холодоровому стресі (Chang et al., 2021). Однак причинно-наслідкові зв'язки між можливими змінами кальцієвого гомеостазу та генерацією АФК та формуванням стійкості рослин до високих температур досі залишалися практично не дослідженими.

Мало досліджені і видові особливості стрес-протекторного впливу мелатоніну на зернові злаки, зокрема, на стадії проростання зернівок. Повідомляється про позитивний вплив мелатоніну на процеси проростання старіючого насіння вівса (Yan et al., 2020), кукурудзи (Deng et al., 2017) та різних видів бобових (Yu et al., 2021). Також у низці досліджень показано посилення під впливом мелатоніну проростання насіння різних сільськогосподарських культур за дії несприятливих факторів, зокрема, осмотичного та сольового стресів (Jiang et al., 2016; Li et al., 2020; Guo et al., 2022). Однак дотепер відсутні дані про вплив мелатоніну на проростання зернівок таких важливих зернових злаків, як жито і тритикале, у яких істотно знижується схожість при відносно тривалому зберіганні або пророщуванні у несприятливих умовах.

Отже в цілому потенціал мелатоніну як молекули, що синтезується рослинами і виконує важливі регуляторні і стрес-протекторні функції, досліджений недостатньо. Вивчення сигнальних і протекторних ефектів мелатоніну в контексті дії абіотичних стресорів є важливим як із теоретичної, так і з практичної точки зору. Такі дослідження сприятимуть розробленню нових агротехнологій, що дозволять підвищити стійкість сільськогосподарських культур до стресів і зменшити втрати врожаю в умовах змін клімату.

Мета і завдання досліджень: Основною метою роботи стало з'ясування ролі сигнальних посередників (АФК та іонів кальцію) у прояві стрес-протекторної дії мелатоніну на зернові злаки та визначення внеску антиоксидантної системи і окремих стресових метаболітів у реалізацію його фізіологічних ефектів на рослини зернових злаків у ювенільній стадії розвитку.

Для досягнення цієї мети було поставлено такі завдання:

- оцінити ефективність впливу екзогенного мелатоніну на інтегральні показники стійкості проростків пшениці (*Triticum aestivum* L.) та жита (*Secale*

cereale L.) до абіотичних стресорів (високі температури, модельна посуха, сольовий стрес);

- інгібіторним методом встановити участь АФК та іонів кальцію у реалізації впливу мелатоніну на теплостійкість проростків пшениці і функціонування антиоксидантної системи;

- виявити видові і сортові особливості впливу мелатоніну на стійкість зернових злаків до осмотичних стресів;

- оцінити можливість регуляції мелатоніном редокс-гомеостазу і проростання зернівок злаків, що зазнали впливу прискореного старіння.

Об'єкт дослідження: стрес-протекторні системи рослин, що регулюються дією мелатоніну за участю компонентів клітинної сигнальної мережі.

Предмет дослідження: функціонування антиоксидантної і осмопротекторної систем, ростові процеси рослин на ранніх фазах розвитку за дії екзогенного мелатоніну і стресових чинників.

Методи досліджень: фізіологічні (оцінка впливу мелатоніну на стійкість проростків злаків до абіотичних стресорів, процеси проростання зернівок і росту проростків, інгібіторний аналіз ефектів мелатоніну з використанням кальцієвих антагоністів, скавенджерів АФК тощо); біохімічні (аналіз генерації АФК, продуктів пероксидного окиснення ліпідів, активності антиоксидантних ферментів і амілази, вмісту вторинних метаболітів, проліну, розчинних вуглеводів тощо у рослинних тканинах), математико-статистичні (дисперсійний і кореляційний аналіз).

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше проведено дослідження причинно-наслідкових зв'язків між змінами кальцієвого гомеостазу, генерацією АФК та формуванням індукованої мелатоніном теплостійкості рослин (на прикладі проростків пшениці). З використанням інгібіторного аналізу та прямих методів оцінки генерації АФК встановлено, що розвиток теплостійкості проростків і активація їх ферментативної антиоксидантної системи під впливом мелатоніну можливі лише за умови

посилення генерації АФК, пов'язаного з підвищенням активності НАДФН-оксидази. Водночас посилення генерації АФК клітинами відбувається за умови надходження іонів Ca^{2+} з позаклітинного простору та внутрішньоклітинних компартментів.

Вперше проведено порівняльне дослідження дії мелатоніну на стійкість *Triticum aestivum* і *Secale cereale* до впливу високої температури у поєднанні з низькою вологістю повітря і встановлено видові особливості прояву стрес-протекторних ефектів мелатоніну. Відзначено менш помітний вплив передобробки мелатоніном на функціонування протекторних систем жита, як більш стійкого виду.

За умов модельної посухи, створюваної ПЕГ 6000, виявлено сортові особливості стрес-протекторної дії мелатоніну на проростки пшениці. Показано більш помітний прояв захисних ефектів мелатоніну у непом'якшеного сорту. Водночас відзначено, залежно від адаптивних стратегій сортів, мелатонін по різному впливав на накопичення проліну проростками за стресових умов.

Вперше встановлено здатність мелатоніну посилювати проростання старих зернівок жита і тритикале і зменшувати прояв окиснювального стресу, яким супроводжується процес проростання зернівок. Виявлені ефекти підвищення активності СОД і каталази, а також вмісту антоціанів у проростках обох видів і зростання активності гваяколпероксидази у тритикале.

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 спеціальності 091 «Біологія», 201 «Агрономія» та 205 «Лісове господарство», у навчальних курсах: «Фізіологія і біохімія рослин» та спеціальних курсів, пов'язаних зі стійкістю рослин.

Практичне значення отриманих результатів. Доведена можливість підвищення стійкості зернових злаків до абіотичних стресів шляхом праймінгу насіння розчинами мелатоніну. Ця процедура передбачає відносно короткочасне замочування насіння у розчинах мелатоніну з подальшим висушуванням до вихідного стану, що робить її доступною для практичного використання. Також показаний позитивний вплив праймінгу мелатоніном на проростання зернівок злаків з низькими посівними якостями. Результати досліджень можуть стати основою для розробки спеціальних технологій праймінгу насіння мелатоніном з метою поліпшення проростання насіння за стресових умов і підвищення стійкості рослин на ранніх фазах розвитку. Водночас така обробка зернівок може використовуватися як спосіб відновлення схожості насіння з низькими посівними якостями.

Результати роботи можуть бути використані у наукових установах НАН України і НААН України, які проводять дослідження у галузі стійкості рослин і займаються розробкою агробіотехнологій підвищення стійкості рослин і посівних якостей насіння. Отримані результати можуть бути інтегровані у навчальні програми закладів вищої освіти для підготовки фахівців у галузі біології, біотехнології, агрономії та охорони навколишнього середовища, зокрема, при викладанні курсів «Фізіологія і біохімія рослин» та спеціальних курсів, пов'язаних зі стійкістю рослин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційне дослідження виконувалося в рамках теми НДР кафедри землеробства та гербології Державного біотехнологічного університету «Регуляція адаптивних реакцій рослин з участю активних форм кисню і азоту та нейромедіаторів» (№ держреєстрації 0123U100582) та 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.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно опрацьовано джерела літератури, освоєно відповідні методи досліджень та проведено всі необхідні експерименти. Отримані результати інтерпретовані, узагальнені і підготовлені до публікації за участю наукового керівника. Частина експериментів проведена спільно зі співробітниками Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН д.б.н. Ю.Є.Колупаєвим, к.б.н. Т.О. Ястреб. Частка особистої участі здобувача становить понад 70%

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційних досліджень були представлені на Міжнародній науковій конференції, присвяченій 140 річчю з дня народження академіка Андрія Сапегіна (19 жовтня 2023 р., м. Одеса, Україна), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Лісівництво, переробляння деревини та землевпорядкування: здобутки, стан і перспективи» (29–30 жовтня 2024 р., Харків, Україна); Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Сучасні технології в рослинництві» (27-28 листопада 2024 р. Харків, Україна); XV З'їзді Українського ботанічного товариства (30 вересня — 4 жовтня 2024 р. Івано-Франківськ, Україна); Міжнародній науковій конференції, присвяченій 125-річчю від дня народження професора Ф.П. Мацкова «Стрес та адаптація рослин» (7-8 червня 2023 р. Харків, Україна); Всеукраїнській конференції з молекулярної та клітинної біології з міжнародною участю (15-17 червня 2022 р., Київ, Україна); Міжнародній науковій інтернет-конференції «Селекція, генетика та біотехнологія сільськогосподарських рослин: досягнення, інновації та перспективи» (26 жовтня 2022 р., Одеса, Україна).

Структура і обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, п'яти розділів (огляд літератури, опис методів досліджень та використаних об'єктів, три експериментальні розділи), висновків та списку використаних джерел. Робота викладена на 168 сторінках, містить 29 рисунків і 4 таблиці. Список цитованої літератури нараховує 208 джерел.

РОЗДІЛ 1 УЧАСТЬ МЕЛАТОНІНУ В АДАПТИВНИХ РЕАКЦІЯХ РОСЛИН (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Рослини перманентно зазнають впливу несприятливих умов навколишнього середовища, зокрема абіотичних стресів, що впливає на їх розповсюдження і продуктивність. Припускають, що глобальна ескалація штормів, посух, заморозків та інших важких погодних епізодів зі змінами температури можуть остаточно порушити виробництво врожаю як в світовому масштабі так і в Україні зокрема (Khan et al., 2018; Matyukha et al., 2023). Згідно з сучасними оцінками, що близько 90% орних земель схильне до впливу хоча б одного з вищезгаданих стресорів (Dos Reis et al., 2012). Тільки зниження кількості доступної води на 40% від оптимального призводить до зменшення врожайності зернових культур на 20-40% (Daryanto et al., 2016). При цьому прогнозують, що до 2050 року потреби сільського господарства у прісній воді збільшаться, тоді як кількість доступної води може знизитися на 50% через кліматичні зміни (Gupta et al., 2020).

Одним з ефективних прийомів, що підвищують стійкість рослин, є використання біостимуляторів-адаптогенів – речовин, що утворюються в самих рослинах і виконують роль індукторів адаптивних реакцій або їх синтетичних аналогів (Sako et al., 2020; Raza et al., 2022).

У даний час активно досліджуються і вже знаходять практичне застосування як стрес-проектори такі групи рослинних гормонів і стресових метаболітів, як брассиностроїди, жасмонати, саліцилова кислота, стріголактони, поліаміни (Damalas, Koutroubas, 2022; Kosakivska et al, 2022; Matusova, 2023; Kolupaev et al., 2022). Однак список природних сполук із стрес-протекторною активністю постійно розширюється і останніми роками він поповнився так званими рослинними нейромедіаторами. Такі сполуки, як ацетилхолін, біогенні аміни, індоламіни та глютамін виявлені не тільки у ссавців, але й у всіх живих організмів (Akula, Mukherjee, 2020; Raza et al., 2022).

Мелатонін (N-ацетил-5-метокситриптамін) є основним індоламіном у рослин. Його вважають мультифункціональним стресовим метаболітом (Fan et al., 2018; Arnao, Hernández-Ruiz, 2019), при цьому дедалі більше експериментальних даних свідчить про його залучення до функціонування сигнальної та гормональної мережі у рослин (Nawaz et al., 2021). Формуються уявлення про те, що ефекти мелатоніну можуть проявлятися на рівні впливу на експресію генів, стан білків, а також шляхом залучення до системи трансдукції сигналів інших гормонів та посередників негормональної природи (Zeng et al., 2022).

У рослин мелатонін був ідентифікований 1995 року, причому відразу трьома незалежними групами дослідників (Dubbels et al., 1995; Hattori et al., 1995; Yang et al., 2022). Наступні дослідження показали, що мелатонін поширений у царстві рослин і є їх функціональним метаболітом. Він міститься в листках, стеблах, коренях, плодах та насінні у різних видів (Fan et al., 2018). Нині мелатонін розглядається як «кандидат» у фітогормони, оскільки є мультирегуляторною молекулою, задіяною в процесах росту та розвитку рослин, зокрема проростання насіння, розвитку коренів, дозрівання плодів, формування врожаю (Sun et al., 2015). З'ясування ролі мелатоніну у стійкості рослин до абіотичних і біотичних стресів в останнє десятиліття стало одним з напрямків стресової фізіології та фітогормонології, що динамічно розвиваються (Ayyaz et al., 2022; Yang et al., 2022).

На прикладі рослин різних видів отримано дані щодо збільшення ендогенного вмісту мелатоніну у відповідь на дію стресових чинників (Arnao, Hernandez-Ruiz, 2015; Altaf et al., 2021). Також накопичено численні відомості про підвищення стійкості рослин до абіотичних стресорів різної природи під впливом екзогенного мелатоніну (Fan et al., 2018; Altaf et al., 2021). Зафіксовано зміни у функціонуванні антиоксидантної (Ciu et al., 2017), осмопротекторної (Jahan et al., 2019) та інших захисних систем рослин за дії мелатоніну. В останні роки виходить велика кількість оглядів, в яких узагальнюються експериментальні дані про зазначені ефекти мелатоніну (Fan

et al., 2018; Rehaman et al., 2021; Zeng et al., 2022; Kolupaev et al., 2024), також робляться спроби мета-аналізу великого масиву експериментальних даних про дію мелатоніну на стрес-протекторні системи рослин (Agathokleous et al., 2021). Однак цілісної картини, яка пояснює широкий спектр стрес-протекторних ефектів мелатоніну, поки що немає. Дуже суперечливі відомості про його вплив на редокс-гомеостаз, утворення та знешкодження активних форм кисню і азоту. Через недостатній обсяг даних поки не сформувалися уявлення про розташування та взаємодію посередників у сигнальних ланцюгах, через які реалізуються фізіологічні ефекти мелатоніну. Все це обмежує можливості практичного застосування мелатоніну як біостимулятора стрес-протекторної дії у рослинництві.

1.1. Біосинтез мелатоніну у рослин

Мелатонін у рослин синтезується чотирма основними шляхами (Rehaman et al., 2021) (рис. 1). Спочатку у цитоплазмі триптофандекарбоксилаза (TDC) перетворює триптофан на триптамін. Потім локалізована в ендоплазматичному ретикулумі триптамін-5-гідроксилаза (T5H) перетворює його на серотонін (Back et al., 2016). Останній перетворюється на мелатонін у два етапи (Rehaman et al., 2021). Спершу відбувається N-ацетилювання серотоніну серотонін-N-ацетилтрансферазою (SNAT), яка перетворює серотонін на N-ацетил-серотонін. SNAT є ключовим ферментом, що лімітує швидкість синтезу мелатоніну (Liao et al., 2021). N-ацетил-серотонін, що утворився, може метилюватися або N-ацетилсеротонін-О-метилтрансферазою (ASMT, паралельна назва – гідроксіндол-О-метилтрансфераза – HIOMT), або О-метилтрансферазою кавової кислоти (COMT). Ці реакції призводять до утворення мелатоніну у цитоплазмі (Шлях I) (рис. 1). Шлях II пов'язаний з перетворенням серотоніну на 5-метоксилтриптамін у цитоплазмі в присутності ASMT або COMT. Потім 5-метоксилтриптамін у хлоропластах перетворюється на мелатонін за допомогою SNAT (Rehaman et al., 2021).

Існують інші шляхи, що ведуть до синтезу мелатоніну. Триптофан може перетворюватися на 5-гідрокситриптофан під дією триптофан-гідроксилази (TPH). Потім у цитоплазмі він перетворюється на серотонін під дією триптофандекарбоксилази (TDC). Серотонін далі перетворюється на N-ацетилсеротонін за допомогою SNAT або на 5-метокситрипамін за допомогою ASMT/COMT. N-ацетилсеротонін та 5-метокситрамін перетворюються на мелатонін або під дією ASMT/COMT, або за участю SNAT у цитоплазмі та хлоропласті відповідно (шляхи III та IV) (Back et al., 2016) (рис. 1).

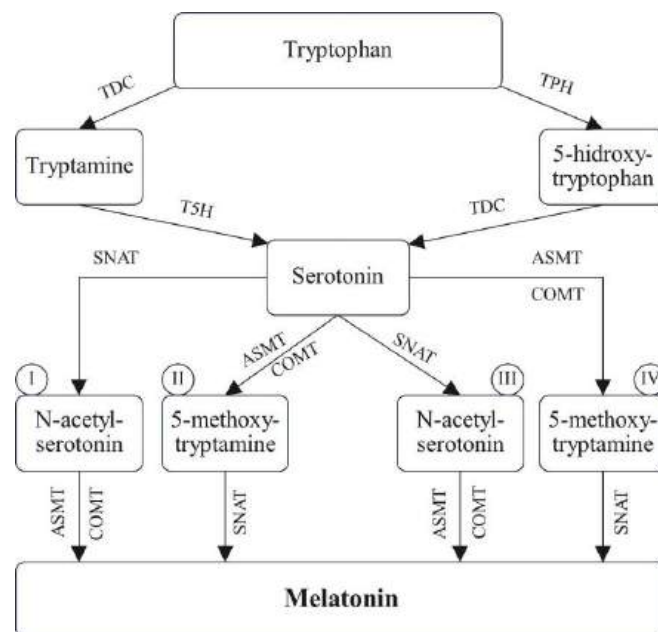


Рис. 1. Шляхи синтезу мелатоніну в рослинах. ASMT – N-ацетилсеротонін-О-метилтрансфераза; COMT – кофеїнової кислоти-О-метилтрансфераза; SNAT – серотонін-N-ацетилтрансфераза; TDC – триптофан-декарбоксилаза; T5H – триптамін-5-гідроксилаза; TPH – триптофан-гідроксилаза.

Існують відмінності у шляхах синтезу мелатоніну у рослин у фізіологічно нормальних та стресових умовах (Zeng et al., 2022). У стандартних умовах домінуючий шлях включає ацетилювання серотоніну під дією SNAT з утворенням N-ацетил-5-гідрокситриптаміну, а потім О-метилування за допомогою ASMT/COMT з утворенням мелатоніну. При

абіотичному стресі серотонін спочатку О-метилується з утворенням 5-метокситриптамін у за допомогою ASMT, а потім ацетилується SNAT з утворенням мелатоніну.

Хлоропласти вважаються основними клітинними компартментами біосинтезу мелатоніну у рослин. Ключовий фермент синтезу мелатоніну, SNAT, у рослин різних видів виявлено переважно у хлоропластах (Rehaman et al., 2021). COMT та ASMT також експресуються в хлоропластах, і їх надекспресія призводить до посилення синтезу мелатоніну (Choi et al., 2017). Крім хлоропластів, місцями біосинтезу мелатоніну вважаються мітохондрії. У мітохондріях триптофан, що надходить з цитоплазми, перетворюється на 5-гідрокситриптофан за допомогою триптофангідроксилази (TPH). Далі декарбоксилаза ароматичних амінокислот (AADC) перетворює 5-гідрокситриптофан на 5-гідрокситриптамін, після чого арилалкіламін-N-ацетилтрансфераза каталізує перетворення 5-гідрокситриптамін у N-ацетил-5-гідрокситриптамін. Останній за допомогою гідроксиіндол-О-метилтрансферази (HIOMT, яка також відома як N-ацетилсеротонін-О-метилтрансфераза – ASMT) перетворюється на мелатонін (Zeng et al., 2022). Є відомості, що вклад мітохондрій у синтез мелатоніну зростає у стресових умовах (Zeng et al., 2022). Таким чином, залежно від умов, в яких перебуває рослинний організм, може змінюватися як внесок різних хлоропластних шляхів синтезу мелатоніну, так і співвідношення між його синтезом у хлоропластах та мітохондріях.

Катаболізм мелатоніну може йти шляхом ферментативної та неферментативної трансформації (Back, 2021; Zeng et al., 2022). Останнім часом цей процес розглядається не тільки з точки зору регуляції вмісту мелатоніну, але і як процес, у ході якого може відбуватися знешкодження активних форм кисню (АФК) та азоту (АФА), а також утворюватися фізіологічно активні похідні мелатоніну (Zeng et al., 2022).

При ферментативній трансформації мелатонін у тварин метаболізується у 6-гідроксимелатонін (6-ОНМ) ферментами P450. Потім 6-ОНМ

сульфатується в 6-сульфатоксимелатонін і N1-ацетил-N2-форміл-5-метоксикінурамін (AFMK) за допомогою кількох ферментів (наприклад, індоламін-2,3-діоксигенази та цитохромів (Yang et al., 2022)). 6-ОНМ є основним продуктом ферментативного розщеплення мелатоніну у тварин.

У рослин першим метаболітом мелатоніну вважається 2-гідроксимелатонін (2-ОНМ), утворення якого каталізується 2-гідроксимелатоніноксигеназою (Byeon, Back, 2015). Ще одним метаболітом мелатоніну, утворення якого каталізується рослинними ферментами, є циклічний 3-гідроксимелатонін – 3-ОНМ (Back, 2021).

У рослин виявлені й інші метаболіти мелатоніну, наприклад, характерний для тварин циклічний мелатонін, а також 6-гідроксимелатонін та циклічний-6-гідроксимелатонін. Вони можуть утворюватися при взаємодії мелатоніну з різними окисниками, включаючи АФК та АФА (Manchester et al., 2015). Ще одним біологічно активним метаболітом мелатоніну у рослин є 5-метокситриптамін. Він утворюється з мелатоніну під дією N-ацетилсеротоніндеацетилази (ASDAC) (Back, 2021). При неферментативному розщепленні мелатонін може нітрозуватися атомом азоту його індольного кільця, що призводить до утворення N-нітрозомелатоніну (Zeng et al., 2022). В цілому, в даний час вважається, що у рослин, як і у тварин, багато метаболітів мелатоніну утворюються в результаті ферментативних та неферментативних реакцій. Детальна інформація про метаболіти мелатоніну та механізми їх синтезу у рослин узагальнена в огляді Back (2021). У той самий час функції більшості метаболітів мелатоніну в рослин ще не з'ясовані. Можливо, що процес катаболізму мелатоніну є важливим для виконання ним антиоксидантних функцій (див. нижче).

1.2. Зміна вмісту мелатоніну у рослин у відповідь на дію стрес-факторів

Значення ендogenous вмісту мелатоніну у рослин для їх стійкості до стресів вивчається за допомогою різних експериментальних прийомів:

шляхом оцінки змін його синтезу у відповідь на стресові впливи, шляхом генетичних модуляцій, що підсилюють або послаблюють накопичення мелатоніну і шляхом застосування екзогенного мелатоніну з одночасним контролем його вмісту. Одна з найбільш ранніх робіт з вивчення впливу різних стресів на вміст мелатоніну проведена Arnao і Hernández-Ruiz (2013) на прикладі рослин люпину. Авторами встановлено підвищення вмісту мелатоніну у коренях під впливом підкислення середовища, посухи, засолення, сульфату цинку, пероксиду водню, а також низької температури. Особливо суттєве збільшення вмісту мелатоніну (у 12 разів) відзначалося при впливі на кореневу систему рослин люпину сульфату цинку (Arnao, Hernández-Ruiz, 2013). У листках рису, оброблених солями кадмію, виявлено 6-разове підвищення вмісту мелатоніну (Byeon et al., 2015).

У проростках рису зафіксовано підвищення вмісту мелатоніну за дії високих температур (Byeon, Back, 2014). У листках та коренях рослин пшениці у відповідь на нагрівання виявлено майже дворазове зростання вмісту мелатоніну (Buttar et al., 2020). Подібний ефект за дії високих температур зафіксовано і у рослин арабідопсису (Shi et al., 2015) і томату (Xu et al., 2016). Також показано, що трансформанти томату з надекспресією гена одного з ферментів синтезу мелатоніну та високим вмістом ендогенного мелатоніну відрізнялися підвищеною теплостійкістю та меншим накопиченням агрегованих білків в умовах теплового стресу (Xu et al., 2016). Водночас у томатів із генетичними дефектами синтезу мелатоніну спостерігалися сильніші теплові пошкодження порівняно із звичайними рослинами (Ahammed et al., 2019).

При обробці рослин пшениці в умовах посухи екзогенним мелатоніном відзначено збільшення його ендогенного вмісту та посилення експресії генів ферментів синтезу мелатоніну – О-метилтрансферази кавової кислоти та триптофандекарбоксилази (Zhang et al., 2023). В умовах сольового стресу показано, що екзогенний мелатонін у пшениці спричиняв підвищення кількості транскриптів основного ферменту його синтезу серотонін-N-

ацетилтрансферази (TaSNAT) та ендогенного вмісту мелатоніну (Ke et al., 2018). У люцерни також виявлено збільшення ендогенного вмісту мелатоніну та підвищення солестійкості за обробки екзогенним мелатоніном (Jalili et al., 2022). При сольовому, осмотичному та тепловому стресах виявлено також підвищення вмісту ендогенного мелатоніну у рослин винограду, ячменю та люпину (див. огляд: Hassan et al., 2022). У той же час, мутанти арабідопсису, дефектні за генами синтезу мелатоніну, відрізнялися низькою стійкістю до сольового стресу (Chen et al., 2017).

У роботі Shreya та співавт. (2022) порівнювали вміст ендогенного мелатоніну в оптимальних умовах та за посухи у двох сортів *Arachis hypogaea*. У стійкого сорту відзначався вищий конститутивний вміст мелатоніну та його зростання за посухи, тоді як у чутливого сорту він виявився набагато нижчим і не збільшувався під час стресу. Однак після обробки екзогенним мелатоніном виявили підвищення його ендогенного вмісту у чутливого сорту, а у стійкого сорту обробка екзогенним мелатоніном, навпаки, зменшувала стрес-індуковане посилення його синтезу (Shreya et al., 2022).

За посухи у двох видів *Malus* посилювалася експресія генів чотирьох ферментів біосинтезу мелатоніну – *TDC*, *T5H*, *SNAT* та *HIOMT* (Li et al., 2015). Також показано, що рослини яблуні, трансформовані генами *ASMT1* і *MzSNAT5*, що кодують відповідно N-ацетилсеротонінметилтрансферазу та серотонін-N-ацетилтрансферазу, відрізнялися підвищеним ендогенним вмістом мелатоніну і більшою стійкістю до окиснювального стресу в умовах посухи.

Обробка плодів томату мелатоніном посилювала експресію генів *TDC*, *T5H*, *SNAT*, *ASMT* та його синтез при їх зберіганні в умовах низьких температур (Sharafi et al., 2019). В цілому, можна вважати доведеним зв'язок між здатністю рослин посилювати синтез мелатоніну у відповідь на стресові впливи та їх стійкістю до несприятливих факторів різної природи.

1.3. Мелатонін як учасник сигнальної мережі рослинних клітин

1.3.1. Рецепція сигналу мелатоніну. Питання про специфічний рецептор мелатоніну в рослинних клітинах поки що залишається відкритим. У клітинах людини виявлено два рецептори, чутливі до мелатоніну та пов'язані з G-білками — Mel1a (MT1) та Mel1b (MT2) (Mannino et al., 2021). Як відомо, гетеротримерний комплекс G-білка клітин ссавців містить три субодиниці: $G\alpha$, $G\beta$ та $G\gamma$, і коли цей комплекс активується GPCR (G-proteins coupled receptors), GTP замінюється GDP на $G\alpha$. Рослинні клітини також містять три субодиниці комплексу G-білка та деякі передбачувані GPCR (Cannon, Chapman, 2021). Однак GPCR рослин не мають активності фактора обміну гуанінових нуклеотидів, через що механізм передачі сигналів G-білком у рослинних клітинах сильно відрізняється від механізму передачі сигналів у клітинах тварин. Тим не менш, у рослин виявлено білки, що взаємодіють з GPCR — CAND2 і CAND7 (Jin et al., 2012).

У 2018 році CAND2 був запропонований як рецептор фітомелатоніну1 (PMTR1) (Wei et al., 2018). Показано, що у мутанта *Arabidopsis* за геном цього білка (*AtCand2*) на відміну від рослин дикого типу, була відсутня реакція закривання продихів у відповідь на обробку мелатоніном (Wei et al., 2018). Точна локалізація CAND2/PMTR1 у клітинах рослин залишається невідомою. Крім плазматичної мембрани можливим місцем локалізації рецептора мелатоніну CAND2 у рослин може бути зовнішня мембрана мітохондрій (Zhao et al., 2021). Автори відзначають амінокислотну схожість цього мітохондріального білка з рецептором мелатоніну MT1 людини, який також локалізований у мітохондріях. Проте інша дослідницька група припустила, що CAND2 взагалі є справжнім рецептором мелатоніну типу GPCR. За даними цієї групи, білок CAND2 локалізовано у цитоплазмі. При цьому у мутанта *AtCand2* під дією мелатоніну індукувався сигнальний шлях мітоген-активованих протеїнкіназ (MAP-кіназний каскад), задіяний у формуванні захисних реакцій рослин *Arabidopsis* на патогени (Lee, Back, 2020). Іншими словами, відсутність білка CAND2 не перешкоджала індукуванню

мелатоніном захисних реакцій рослин на патогени через MAP-кіназний шлях.

Більш того, на підставі даних про активацію каскаду MAP-кіназ за впливу мелатоніну припускають, що в *Arabidopsis* один із 600 гомологів RLK може діяти саме як рецептор мелатоніну (Back, 2021). При цьому доведено роль активованого мелатоніном MAP-кіназного каскаду в активації експресії генів PR-білків, а також деяких антиоксидантних ферментів: PR1, ICS1, GST1, APX1 та PDF1.2, які беруть участь у захисті рослин від патогенів (Lee, Back, 2016).

Тим не менш, як на прикладі *Arabidopsis thaliana*, так і на *Panax notoginseng* показано, що білок CAND2/PMTR1 бере участь у формуванні продихової реакції на бактеріальну інвазію, а сигнальний каскад MAP-кіназ і сигнальний шлях, пов'язаний з активацією $G\alpha$ -субодиниці, активовані мелатоніном, знаходяться нижче CAND2/PMTR1 (Yang et al., 2021). На важливість білка CAND2/PMTR1 в адаптації рослин до абіотичних стресів вказує знижена стійкість арабідопису *Atcand2* до осмотичного стресу і відсутність її підвищення під дією екзогенного мелатоніну (Wang et al., 2021). Автори вважають, що CADN2 є обов'язковим учасником у забезпеченні індукованої мелатоніном толерантності арабідопису до осмотичного стресу.

Таким чином, у даний час найбільш ймовірним білком, задіяним у рецепції мелатоніну, вважається CAND2/PMTR1, який може бути локалізований у плазматичній мембрані, зовнішній мембрані мітохондрій та цитоплазмі.

1.3.2. Мелатонін і кальцієвий сигналінг. Як у тварин, так і в рослинних клітинах кальцій виконує роль універсального внутрішньоклітинного сигнального месенджера, що бере участь у регуляції багатьох клітинних процесів у нормальних та стресових умовах (Li et al., 2022). Найбільш важливими рецепторами Ca^{2+} є кальмодулін (CaM) і CaM-подібні білки (CML), а також залежні від кальцію та/або кальмодуліну протеїнкінази, які беруть участь у сигнальних шляхах, що активуються стресами (Khan et al., 2023).

Імовірно, що існує декілька шляхів, за допомогою яких під дією мелатоніну підвищується вміст цитозольного кальцію та активуються кальцій-залежні сигнальні процеси. Дані, що показують присутність CAND2/PMTR1 у плазматичній мембрані у арабідопсису та квасолі, дозволяють вважати, що підвищення концентрації кальцію опосередковується активацією G-білка (рис. 2). При цьому за участю G-білка відбувається активація НАДФН-оксидази та посилення генерації АФК клітинною поверхнею. У свою чергу, АФК можуть активувати надходження кальцію в цитозоль (Khan et al., 2023). Показано роль кальцію в індукованій мелатоніном холодостійкості кавуна (*Citrullus lanatus*). Розвиток стійкості рослин до холодового стресу, спричинюваний мелатоніном, пов'язаний з кальцій-опосередкованою активацією шляху C-REEPEAT BINDING FACTOR (CBF) (Chang et al., 2021). Білки CBF виконують роль фактора зв'язування елемента, що реагує на дегідратацію (DREB) та мають вирішальне значення для холодової акліматизації вищих рослин (Shi et al., 2018). Авторами виявлено, що блокування кальцієвих каналів усувало індуковане мелатоніном накопичення CBF та розвиток холодостійкості рослин (Chang et al., 2021). При цьому показано, що підвищення вмісту кальцію в цитозолі у кавуна, спричинюване мелатоніном, пов'язане з активацією циклічних нуклеотид-керованих іонних каналів 2 (ClCNGC2).

Інший шлях збільшення вмісту цитозольного кальцію під впливом мелатоніну може бути пов'язаний з підвищенням активності фосфоліпази С та посиленням деградації мембранних фосфоліпідів з утворенням діацилгліцеролу і розчинного у воді інозитол-1,4,5-трифосфату (IP3). Зокрема, дані, що свідчать про можливість такого механізму дії мелатоніну, отримані щодо його ефектів при сольовому стресі (Khan et al., 2023).

Є відомості про активацію мелатоніном експресії генів, що кодують кальмодулін та кальмодулін-залежні протеїнкінази, що також може активувати багато кальцій-залежних адаптивних реакцій рослин (Zhang et al., 2021). Так, показано, що обробка ячменю екзогенним мелатоніном індукувала

підвищувала вміст внутрішньоклітинного кальцію, посилювала експресію генів кальцій-залежних протеїнкіназ і кальмодулін-зв'язувальних білків, що, у свою чергу, спричиняло активацію синтезу фенольних сполук, підвищувало антиоксидантну активність і солестійкість рослин. З іншого боку, кальцієві антагоністи – хлорид лантану та ЕГТА – усували позитивний вплив мелатоніну на солестійкість рослин ячменю. Також є відомості про посилення під впливом мелатоніну синтезу кальмодуліну в насінні пшениці при проростанні в умовах сольового стресу (Zhang et al., 2022). У роботі Mukherjee та співавт. (2023) недавно було показано, що вирішальне значення для прояву протекторної дії екзогенного мелатоніну на проростки соняшнику в умовах сольового стресу мають кальцієві канали, чутливі до верапамілу.

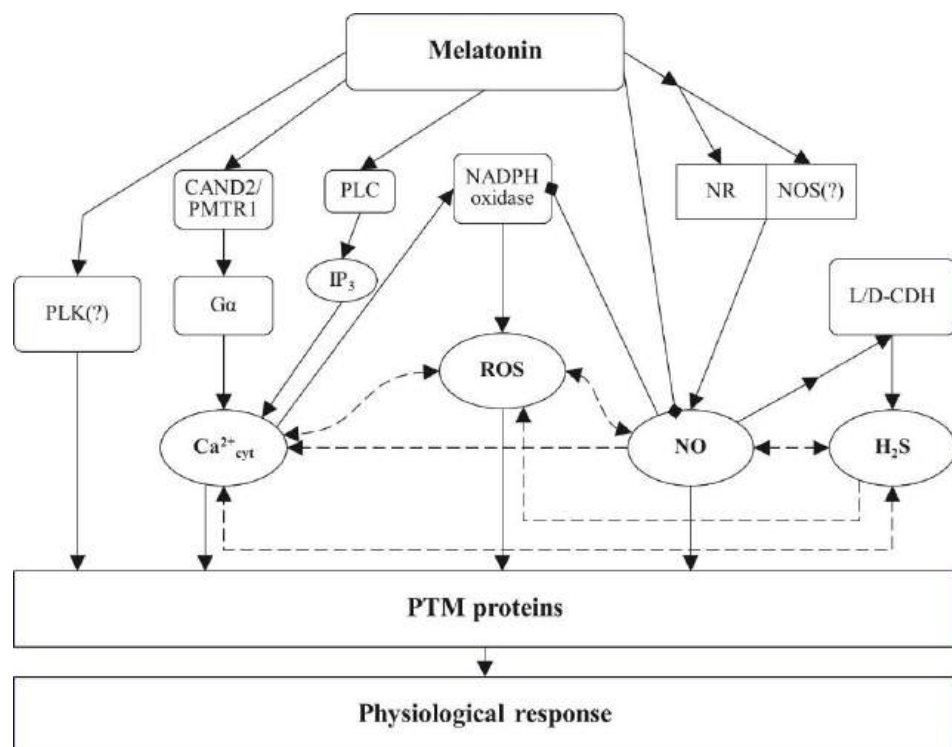


Рис. 2. Сигнальні посередники, залучені до реалізації фізіологічних ефектів мелатоніну. CAND2/PMTR1 – фітомелатоніновий рецептор 1; IP₃ – інозитол 1,4,5-трифосфат; L/D-CDH – L/D-систеїндесульфгідраза; NOS – NO-синтаза; NR – нітратредуктаза; PLC – фосфоліпаза C; PLK – гіпотетичний мелатоніновий рецептор, асоційований з каскадом MAP-кінази; PTM – посттрансляційні модифікації. Пояснення див. у тексті.

1.3.3. Мелатонін і АФК-сигналінг. Як відомо, у стресових умовах у живих організмах підвищується вміст АФК. Залежно від кількості, хімічної природи, клітинної компартментації, часу утворення АФК результат їхньої фізіологічної дії може бути різним. Короткочасне та відносно невелике збільшення вмісту АФК в окремих компартментах клітини, що відбувається у відповідь на дію стресора, може виконувати функції сигналу, що забезпечує подальше індукування захисних реакцій, включно з активацією антиоксидантної системи (Kolupaev et al., 2013; Boroday et al., 2023). Сильніша генерація АФК може спричиняти програмовану клітинну загибель. Нарешті, масштабне стохастичне утворення АФК може призвести до неконтрольованих клітин деструктивних змін (Kasperska, 2004). Вважається, що сигнальні функції виконують пероксид водню, супероксидний аніон-радикал та синглетний кисень (Kolupaev et al., 2013), хоча роль двох останніх АФК у сигналінгу залишається малодослідженою.

Особливе значення утворенні сигнального пулу АФК має НАДФН-оксидаза, локалізована в плазматичній мембрані. Цей ферментний комплекс відновлює молекулярний кисень з утворенням супероксидного аніон-радикалу. Геном арабідопсису містить 10 представників сімейства генів мембрано-пов'язаної субодиниці RBOH (Respiratory Burst Oxidase Homologs), що позначаються як *AtRboh* (A, B, C, D, E, F, G, H, J, L) (Torres et al., 2002; Kaue et al., 2011). На даний час проведені дослідження, що вказують на роль генів різних молекулярних форм Rbohs у арабідопсису, томату, тютюну, огірка, люцерни та інших видів рослин (Li et al., 2015; Chen et al., 2017; Liu et al., 2020). Отримані результати показали важливу роль генів *RBOH* у стійкості рослин до екстремальних температур, сольового стресу, дії важких металів та інших абіотичних факторів (Yemets et al., 2019; Gu et al., 2022).

Рослинна мембрано-зв'язана субодиниця має N-кінцеву ділянку, яка зв'язує іони кальцію. Регуляція активності НАДФН-оксидази відбувається з прямою та непрямою участю іонів кальцію, фосфатидної кислоти та шляхом фосфорилювання каталітичної субодиниці (Kolupaev et al., 2015).

Супероксидний радикал, що утворюється під дією НАДФН-оксидази спонтанно, а частіше під впливом СОД, перетворюється на стабільні молекули пероксиду водню, які зазвичай за допомогою аквапоринів переміщаються в цитозоль, де виконують сигнальні функції (Kolupaev et al., 2013).

Як зазначалося вище, мелатонін є потужним антиоксидантом, і саме з цієї точки зору тривалий час розглядали його роль у адаптації до стресорів. Однак останніми роками з'явилися відомості про здатність мелатоніну індукувати генерацію клітинами АФК та про роль АФК як посередників у реалізації ефектів мелатоніну. Ймовірно, показане у низці досліджень посилення генерації АФК рослинними клітинами під впливом мелатоніну зумовлено підвищенням активності НАДФН-оксидази (рис. 2). Найбільш вивченим феноменом участі АФК у реалізації ефектів мелатоніну є спричинюване ним закривання продихів у *Arabidopsis* (Wei et al., 2018). Показано, що обробка мелатоніном індукувала закривання продихів за посередництвом сигналів H_2O_2 і Ca^{2+} . При цьому зміна кальцієвого та АФК-гомеостазу була наслідком вивільнення під впливом мелатоніну α -субодиниці гетеротримерного G-білка, а це вивільнення було результатом взаємодії мелатоніну з ймовірним рецептором CAND2/PMTR1. Мутантні лінії *Arabidopsis*, позбавлені гена *AtCand2*, який кодує потенційний рецептор, зв'язаний з G-білком, були не здатні до мелатонін-індукованого закривання продихів. Проте механізми підвищення активності НАДФН-оксидази у присутності екзогенного мелатоніну зрозумілі не повністю. Припускають, що вони можуть бути пов'язані як з посиленням експресії генів *RBOH* в результаті передачі сигналу мелатоніну в генетичний апарат, так і підвищенням під впливом мелатоніну концентрації кальцію в цитозолі і прямої активації НАДФН-оксидази (Wei et al., 2018).

Розглядається також роль в активації НАДФН-оксидази зв'язування мелатоніном ендогенного оксиду азоту, внаслідок чого знижується S-нітрозилювання *RBOH*, що перешкоджає прояву її активності (Gu et al.,

2022). Відомо, що NO може негативно регулювати активність RBOH шляхом S-нітрозилювання Cys 890 (Yun et al., 2011). На прикладі рослин *Solanum lycopersicum* виявлено, що обробка екзогенним мелатоніном спочатку призводить до накопичення ендogenous мелатоніну, який потім видаляє молекули NO, які утворюються в клітинах, що своєю чергою викликає денітрозилювання RBOH і підвищення її активності (Gong et al., 2017). При цьому показано, що активація RBOH та посилення генерації АФК є критично необхідними для підвищення мелатоніном стійкості рослин до посухи, теплового та осмотичного стресів. Інгібування RBOH або хімічне видалення H_2O_2 його скавенджером значно нівелювало індуковані мелатоніном захисні реакції рослин, включаючи зниження експресії декількох генів, пов'язаних зі стресом (*CDPK1*, *MAPK1*, *TSPMS*, *ERF4*, *HSP80* і *ERD15*), а також викликало зменшення активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази і аскорбатпероксидази) (Gong et al., 2017).

На прикладі арабідопису отримані дані, що вказують на роль НАДФН-оксидази в індукованому мелатоніном розвитку стійкості до сольового стресу. Показано, що обробка мелатоніном може посилити антиоксидантний захист у стресів рослин дикого типу, але не у *AtrbohF* мутанта (Chen et al., 2017).

Встановлено природу деяких інших захисних реакцій, що активуються мелатоніном за посередництвом АФК генерованих НАДФН-оксидазою. Так, обробка плодів груші екзогенним мелатоніном не тільки індукувала біосинтез антоціанів, а й підвищувала ендogenous вміст H_2O_2 та O_2^- у плодах груші. Вплив мелатоніну на біосинтез антоціанів усувався інгібіторами НАДФН-оксидази (Sun et al., 2021). Автори також спостерігали, що експресія генів, які кодують RBOH (*PuRBOHF*), значно посилювалася після обробки рослин мелатоніном. Транзиторна гіперекспресія *PuRBOHF* значно збільшувала накопичення антоціанів та активувала транскрипцію генів біосинтезу антоціанів, тоді як пригнічення *PuRBOHF* усувало стимульоване мелатоніном накопичення антоціанів та продукцію H_2O_2 (Sun et al., 2021).

1.3.4. Функціональна взаємодія мелатоніну та оксиду азоту. Відомо, що надмірне накопичення оксиду азоту (NO) та інших АФА у клітинах рослин, як і дія надлишку АФК, може спричинити окиснювальні пошкодження біомакромолекул та клітинних структур, що умовно називають нітрозативним стресом. При цьому мелатонін як один з потужних клітинних антиоксидантів може мати важливе значення для знешкодження АФА. У той же час, NO вважається одним з найважливіших компонентів сигнальної мережі клітин рослин і тварин (Mur et al., 2013; Santolini et al., 2017; Dey et al., 2024). Як сигнальна молекула-радикал оксид азоту бере участь у регуляції багатьох клітинних процесів у фізіологічно нормальних та особливо стресових умовах.

Основні ефекти NO на молекулярному рівні пов'язані із посттрансляційною модифікацією білків (ПТМ). В даний час вважається, що NO ідеально підходить для ролі сигнальної молекули, що реалізує свій потенціал в окиснювально-відновних модифікаціях білків (Gupta et al., 2020).

Одним із найбільш важливих для регуляції клітинних процесів механізмів NO-модифікації білків є S-нітרוзування – ковалентне приєднання групи NO до –SH-залишків цистеїну з утворенням S-нітрозотіолу (SNO) (Mishra et al., 2021). S-нітרוзування – оборотний процес, який вважається своєрідним перемикачем, що дозволяє регулювати функції цільових білків. Ймовірно, що від S-нітрозування білків залежить безліч клітинних процесів у рослинах, у тому числі пов'язаних з реакцією на дію факторів навколишнього середовища. S-нітрозування білків відбувається без участі ферментів (Arora et al., 2016). Однак цей процес дуже специфічний, оскільки залежить не тільки від близькості між NO та цільовим білком, але й від амінокислотної послідовності та конформації білка (Lamotte et al., 2014). Також S-нітрозування залежить від реакційної здатності нітруючого агента та окиснювально-відновного потенціалу мікрооточення (Arora et al., 2016).

Ще одна NO-модифікація білків – нітрозилування металовмісних білків – відбувається при взаємодії NO з іонами перехідних металів, що

входять до складу металопротеїнів, та призводить до утворення метало-нітрозильних комплексів. NO може зв'язуватися з різними металовмісними центрами (Fe, Cu, Zn) металопротеїнів (Ford, 2010; Arora et al., 2015). Формування метало-нітрозильних комплексів викликає оборотні конформаційні зміни білків і змінює їх структуру та/або функціональну активність (Arora et al., 2016).

Очевидно, функціональна взаємодія між мелатоніном та оксидом азоту може бути як синергічною, так і антагоністичною. Останнє, як зазначалося вище, проявляється у зв'язуванні мелатоніном надлишкових кількостей оксиду азоту та інших АФА. Наприклад, показано, що ризосферна обробка мелатоніном підвищувала посухостійкість рослин люцерни. Такий ефект проявлявся в нижчому рівні ПОЛ і вмісті H_2O_2 та NO у праймованих рослинах. Автори припускають, що передобробка мелатоніном пом'якшувала нітроокиснювальний стрес, спричинюваний посухою (Antonioni et al., 2017).

У той же час отримано ряд даних, що вказують на залучення NO як сигнального посередника у реалізацію фізіологічних ефектів мелатоніну. Так, індукування теплостійкості томатів мелатоніном супроводжувалося зниженням прояву окиснювального стресу та індексу ушкодження мембран. При цьому обробка рослин мелатоніном спричиняла підвищення вмісту оксиду азоту, подібний ефект викликав і стресовий вплив. Автори вважають, що оксид азоту необхідний посередник для розвитку теплостійкості рослин під дією донорів NO (Jahan et al., 2019). Також, підвищуючи стійкість арабідопсису до дефіциту заліза, екзогенний мелатонін викликав збільшення ендогенного вмісту NO (Zhou et al., 2016). Захисний вплив мелатоніну на рослини пшениці за токсичної дії кадмію, виявлялося у зниженні рівня окиснювального стресу. Він супроводжувався посиленням синтезу NO та усувався скаведжером оксиду азоту PTIO (phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) (Kaya et al. 2019). Участь оксиду азоту як посередника показано і при дослідженні дії мелатоніну на стійкість *Catharanthus roseus* до кадмієвого стресу (Nabaei, Amooaghaie, 2019).

Обробка рослин мелатоніном або донором оксиду азоту підвищувала вміст проліну та активність антиоксидантних ферментів у коренях при стресі Cd. Ці мелатонін-індуковані реакції пригнічувалися скавенджером оксиду азоту cPTIO. У той самий час інгібування біосинтезу мелатоніну *p*-хлорфенілаланіном не усувало захисні ефекти оксиду азоту. Ці результати показують, що NO як низхідний сигнал бере участь в активації мелатоніном антиоксидантної системи в коренях рослин *C. roseus*.

Також оксид азоту може бути посередником індукування екзогенним мелатоніном солестійкості ріпаку. Обробка рослин ріпаку мелатоніном спричиняла підвищення вмісту NO. При цьому скавенджер оксиду азоту PTIO усував стрес-протекторний ефект мелатоніну (Zhao et al., 2018). Крім того, показано, що мутанти, дефектні за генами нітратредуктази і не здатні синтезувати достатню кількість NO, мали підвищену чутливість до сольового стресу і мелатонін не впливав на їх солестійкість. Таким чином, індукування солестійкості ріпаку дією мелатоніну опосередковано залежним від нітратредуктази посиленням синтезу NO. Автори вважають, що S-нітрозування цільових білків є обов'язковою складовою сигнального шляху, що запускається мелатоніном і призводить до підвищення солестійкості. Участь сигналу оксиду азоту показано й у індукуванні мелатоніном стійкості томатів до содового засолення (Liu et al., 2015).

У той же час у плодах томатів, оброблених мелатоніном для поліпшення зберігання при низьких температурах, виявлено підвищення ендогенного вмісту оксиду азоту на тлі посилення експресії гена *NOS1* та збільшення NOS-подібної активності, що вказує на роль окисного шляху синтезу оксиду азоту у реалізації дії мелатоніну (Ahammed et al., 2019). У цій роботі показано посилення синтезу поліамінів у плодах томатів під впливом мелатоніну. Поліаміни можуть виконувати роль мультифункціонального стрес-протекторного з'єднання, так і ймовірного додаткового джерела сигналів АФК і NO, що утворюються при їх окисненні (Kolupaev et al., 2022).

З іншого боку, оксид азоту може виступати як сигнал, що індукує синтез мелатоніну. Показано, що NO за посередництва цГМФ може активувати експресію генів ферментів синтезу мелатоніну, що призводить до збільшення ендогенного вмісту мелатоніну (Wang et al., 2022). Виявлено, що скавенджер NO сРТІО порушував Cd-індукований синтез мелатоніну, знижуючи експресію генів *TDC* та *COMT* у рису (He, He, 2020). Таким чином, не виключено, що існують механізми взаємного посилення синтезу мелатоніну та оксиду азоту у рослин. У той же час, як уже зазначалося, мелатонін, синтезуючись у хлоропластах та мітохондріях, може знижувати токсичну дію АФА безпосередньо в цих органелах (Wang et al., 2022). Ймовірно, регулюючи вміст ендогенного NO, мелатонін має здатність модулювати інтенсивність процесів посттрансляційної модифікації різних білків, у тому числі антиоксидантних ферментів (Arora, Bhatla, 2017). При цьому, залежно від концентрації NO та особливостей реакційного середовища, можливі різні типи посттрансляційної модифікації цих ферментів, що призводять до підвищення або зниження активності. Однак пригнічення антиоксидантних ферментів за рахунок ПТМ може бути причиною появи АФК-сигналів, що активують експресію генів антиоксидантних ферментів (Kolupaev et al., 2023).

У деяких роботах показано синергічну дію екзогенних мелатоніну та донорів NO при їх комбінованому застосуванні з метою підвищення стресостійкості рослин. Так, за комбінованої дії мелатоніну та донора оксиду азоту на рослини сої значно пом'якшувалися токсичні ефекти кадмію та свинцю, що виявлялося у зменшенні прояву окиснювального стресу, зниженні ендогенного вмісту важких металів та інгібування росту (Imran et al., 2022).

1.4. Регуляція адаптивних реакцій рослин екзогенним мелатоніном

Захисна дія екзогенного мелатоніну зареєстрована на прикладі рослин різної таксономічної приналежності та за дії різних стресових факторів:

екстремальних температур, посухи, засолення, важких металів, дії УФ тощо (Agathokleous et al., 2021; Tiwari et al., 2021; Zeng et al., 2022). При цьому його позитивні ефекти пов'язують як з посиленням неспецифічних (загальних) реакцій (активація антиоксидантної системи, накопичення мультифункціональних стресових метаболітів тощо), так і досить специфічних (наприклад, посилення експресії холодочутливих генів сімейств *CBF*, *COR* або транскрипційних факторів генів теплового).

1.4.1. Холодовий стрес. Обробка рослин бермудської трави мелатоніном підвищувала їхню холодостійкість, пом'якшуючи прояв окислювального стресу. Ці ефекти пов'язані як з підвищенням активності антиоксидантних ферментів, так і накопиченням різних низькомолекулярних протекторних сполук (Shi et al., 2015). Триразове обприскування рослини пшениці 1 мМ мелатоніном викликало ефекти, подібні до дії холодового загартовування (Sun et al., 2018). При цьому праймінг мелатоніном зменшував холодоіндукований прояв ефекту окиснювального стресу, призводив до посилення експресії генів та підвищення активності антиоксидантних ферментів – СОД, каталази та аскорбатпероксидази.

На рослинах кукурудзи показано, що підвищення холодостійкості мелатоніном пов'язане з його модулюючим ефектом на мітохондріальне дихання. Під його впливом відбувалося значне збільшення активності та експресії генів піруватдегідрогенази, цитратсинтази та малатдегідрогенази, що вказує на активацію циклу трикарбонових кислот. Також під дією мелатоніну підвищувалися експресія генів та вміст білка цитохромоксидази та альтернативної оксидази. У варіанті з мелатоніном зафіксовано підвищення вмісту АТФ в клітинах рослин в умовах холодового стресу (Turk, Genisel, 2020).

Під впливом екзогенного мелатоніну підвищувалася холодостійкість рослин кавуна (Chang et al., 2021). Цей ефект супроводжувався посиленням експресії генів *CBF 1*, *COR 47*, *CIERD 10* та інших. Обробка плодів томатів при їх низькотемпературному зберіганні сприяла накопиченню ендогенного

мелатоніну за рахунок посилення експресії генів *TDC*, *T5H*, *SNAT* та *ASMT* (Sharafi et al., 2019). Також у плодах, оброблених мелатоніном, відзначалася активація вторинного метаболізму та накопичення фенольних та поліфенольних сполук, що призводило до підвищення загальної антиоксидантної активності.

1.4.2. Тепловий стрес. Під впливом мелатоніну відзначилося підвищення теплостійкості проростків пшениці (Buttar et al., 2020). У варіантах з обробкою мелатоніном спостерігалось зменшення проявів індукованого високою температурою окиснювального стресу на тлі підвищення активності СОД, каталази, неспецифічної пероксидази та аскорбатпероксидази та посилення експресії відповідних генів. У той же час обприскування рослин мелатоніном активувало експресію генів низки транскрипційних факторів, відповідальних за адаптацію рослин до абіотичних стресорів – MYB80, WRKY26, WRKY39 (Buttar et al., 2020). Також у рослин пшениці, оброблених мелатоніном, в умовах теплового стресу спостерігалось підвищення інтенсивності фотосинтезу, вміст розчинних вуглеводів, показників антиоксидантної активності (Iqbal et al., 2021).

Обробка мелатоніном стимулювала активність антиоксидантних ферментів та ферментів детоксикації метилгліоксалу, збільшувала вміст неферментативних антиоксидантів (аскорбінової кислоти та GSH) та осмолітів (проліну, трегалози) у проростках кукурудзи в нормальних умовах і особливо при тепловому стресі (Li et al., 2019). В результаті підвищувалась виживаність після жорсткої дії теплового стресу (46°C, 16 год). Здатність мелатоніну посилювати синтез проліну зафіксована у рослин різних видів і її вважають однією з причин стрес-протекторної дії мелатоніну за дії високих температур і посухи (Hassan et al., 2022).

Підвищення теплостійкості двох видів м'яти під дією мелатоніну супроводжувалося значним зростанням активності антиоксидантних ферментів: СОД, каталази, неспецифічної пероксидази, глутатіон S-трансферази (Наударі et al., 2019). Загалом на рослинах різних таксономічних

груп, включаючи кукурудзу, томати, сою та цитрусові, встановлено, що обробка мелатоніном підвищує активність багатьох антиоксидантних ферментів (Gu et al., 2022).

Обробка рослин *Festuca altissima* мелатоніном також пом'якшувала пошкодження, спричинені дією високої температури: зменшувала вихід електролітів з тканин, знижувала генерацію АФК і накопичення продукту ПОЛ МДА, сприяла збереженню пулу хлорофілу та підвищення активності антиоксидантних ферментів ферменту (Alam et al., 2018).

При дії мелатоніну на рослини томатів, що експонувалися протягом 9 годин при температурі 40°C, відзначалося зменшення ефектів фотоінгібування та виходу електролітів із тканин (Xu et al., 2016). Під впливом мелатоніну у томатів зафіксовано посилення експресії генів білків теплового шоку, зокрема HSP20, HSP26, HSP90 (Xu et al., 2016). А у рослин арабідопсису при обробці екзогенним мелатоніном виявлено збільшення вмісту транскриптів факторів теплового шоку класу A1 – HSFA1S (Shi et al., 2015).

1.4.3. Посуха. У роботі Li та співавт. (2020) позитивний вплив мелатоніну на проростки пшениці в умовах посухи пов'язують насамперед із підвищенням активності СОД та зменшенням окиснювальних ушкоджень. В іншому дослідженні у оброблених мелатоніном проростків пшениці в умовах посухи зафіксовано більш високу швидкість фотосинтезу та підвищену водоутримувальну здатність (Cui et al., 2017). Крім того, показано, що мелатонін активував гени, пов'язані з аскорбат-глутатіоновим циклом, та їх експресія корелювала з активністю антиоксидантних ферментів, а також вмістом глутатіону та аскорбату.

У роботах, виконаних на рослинах різних видів, вивчали вплив мелатоніну на синтез проліну як одного з основних осмолітів, що накопичуються за посухи. Результати цих досліджень виявилися дуже суперечливими. Так, обробка мелатоніном рослин сої викликала підвищення вмісту проліну в умовах посухи (Cao et al., 2019; Awan et al., 2023). Однак у

дослідженні Imran та ін. (2021) показано, що внесення мелатоніну до ризосфери рослин сої, навпаки, знижувало індуковане стресом посухи накопичення проліну. Зниження накопичення проліну в умовах посухи у варіанті з обробкою мелатоніном виявлено і у рослин *Trigonella foenum-gracum* (Zamani et al., 2019).

У рослин люцерни за обробки мелатоніном спостерігалось більш істотне підвищення вмісту проліну в умовах посухи (Antoniou et al., 2017). Такий ефект супроводжувався посиленням експресії генів ферментів синтезу проліну. Вплив мелатоніну на рослини кукурудзи також посилював накопичення проліну під час посухи (Ahmad et al., 2019). Підвищення вмісту проліну під час посухи під впливом обробки мелатоніном зафіксовано і у рослин винограду (Meng et al., 2014).

Ймовірно, ефекти мелатоніну можуть бути частково видо- та сортоспецифічними. При цьому, мабуть, залежно від адаптивних стратегій та сили стресу, можливе як посилення, так і послаблення синтезу проліну. Незважаючи на важливість проліну як мультифункціонального протектора, менше підвищення його вмісту при помірному стресовому впливі може вказувати на більшу резистентність рослин. Іншими словами, за більшої резистентності «поріг» активації накопичення проліну стресовим фактором може бути вищим. Можна вважати, що у рослин, передадапованих дією мелатоніну активно функціонують інші захисні механізми, зокрема, ферментативна складова антиоксидантної системи. Як відомо, у ряді випадків між проліном та СОД можлива функціональна взаємозамінність як агентами, які забезпечують захист від вільних радикалів (Kolupaev et al., 2019).

Підвищення посухостійкості рослин під дією мелатоніну частково може бути пов'язане з посиленням вторинного метаболізму, що, як зазначалося раніше, зафіксовано і при інших стресах. Так, фоліарна обробка рослин *Fagopyrum tataricum* мелатоніном спричиняла багаторазове підвищення активності фенілаланін-амонійліази та збільшення вмісту флавоноїдів в умовах посухи (Hossain et al., 2020). Примітно, що у

бермудської трави функціонування двох генів, які контролюють експресію фенілаланін-амонійліази (ключового ферменту синтезу фенольних сполук), пригнічуються під час стресу, спричиненого посухою, але підвищуються після обробки екзогенним мелатоніном (Ayyaz et al., 2022).

Посилення адаптації рослин до зневоднення дією мелатоніну, що супроводжується активацією ключових стрес-протекторних систем, може бути наслідком зрушень гормонального балансу під впливом мелатоніну. Показано, що обробка мелатоніном рослин пшениці нестійкого до посухи сорту Jimai 22 призводила до збільшення вмісту ауксину та зеатин рибозиду в коренях та інгібування синтезу АБК і попередника етилену аміноциклопропан-1-карбонової кислоти (Li et al., 2017). У той же час відзначається відсутність позитивного впливу мелатоніну на стійкість до дефіциту води посухостійкого сорту пшениці Hengguan 35. Таким чином, ефекти мелатоніну можуть залежати від конститутивної (базової) стійкості рослин, тобто сортових особливостей.

У рослин *Arachis hypogaea* праймінг мелатоніном стимулював експресію гена ліпоксигенази та активність ферменту, а також посилював експресію інших генів, що беруть участь у синтезі жасмонової кислоти (Shreya et al., 2022). Крім того, мелатонін сприяв накопиченню АБК, посилюючи експресію генів ферментів її синтезу та послаблюючи рівень експресії генів, відповідальних за деградацію АБК.

1.4.4.Сольовий стрес. Як відомо, сольовий стрес, крім осмотичного впливу, зазвичай супроводжується проникненням іонів солей в клітини, що призводить до їх токсичної дії (Isayenkov et al., 2012). Обробка мелатоніном рослин ріпаку (Zhao et al., 2018) підвищувала їх солестійкість, що виражалось у зменшенні інгібування росту та зниженні співвідношення вмісту Na^+/K^+ у тканинах. Подібний ефект зміни співвідношення концентрації зазначених катіонів під впливом мелатоніну в умовах сольового стресу зафіксовано і рослин пшениці (Zhang et al., 2022). Зменшення відтоку іонів калію з коренів

під впливом мелатоніну в умовах сольового стресу показано також у рису (Liu et al., 2020).

Показано прямий зв'язок між вмістом ендогенного мелатоніну у сортів бавовнику та їх солестійкістю. Репресія генів, пов'язаних з біосинтезом мелатоніну, і, як наслідок, зниження його вмісту викликала падіння активності антиоксидантних ферментів і меншу стійкість рослин до вторинного окиснювального стресу (Zhang et al., 2021).

Екзогенний мелатонін підвищував і солестійкість томатів, що супроводжувалося зростанням експресії генів антиоксидантних ферментів – аскорбатпероксидази, глутатіонредуктази, гваяколпероксидази та пероксиредоксину (Martinez et al., 2018). Припускають, що роль мелатоніну в толерантності до сольового стресу може бути пов'язана з його залученням до регулювання експресії генів ферментів, що беруть участь у фотосинтезі, антиоксидантному захисті, зокрема, в аскорбат-глутатіоновому циклі, а також метаболізмі проліну (Siddiqui et al., 2019). У рослин рису у варіанті з обробкою мелатоніном посилювалася експресія генів та підвищувалася активність різних молекулярних форм СОД та аскорбатпероксидази (Zhao et al., 2018).

У коренях рослин люцерни, оброблених мелатоніном, при сольовому стресі відзначалося збільшення кількості сумісних розчинних сполук (гліцин-бетаїн, цукрів та катіонів калію) (Jalili et al., 2022).

Як один із механізмів підвищення солестійкості пшениці за дії мелатоніну розглядається зростання під його впливом вмісту поліамінів, пов'язане з підвищенням активності ферментів їх синтезу (Talaat, 2021). Також зафіксовано підвищення вмісту проліну у пшениці під час сольового стресу під впливом мелатоніну (Ismacil et al., 2022).

1.5.Вплив мелатоніну на проростання насіння

Ініціація проростання зернівок значною мірою визначається підвищенням обводненості осьових частин зародка та зміною гормонального

балансу фітогормонів, насамперед, зменшенням вмісту АБК та підвищенням кількості гіберелінів, ауксинів і до певної міри етилену (Колупаєв та ін., 2023). У цих зрушеннях як сигнальні посередники беруть участь пероксид водню і оксид азоту. Відомо, що посилення АФК є атрибутом початку проростання насіння (Kranter et al., 2010). З іншого боку, показано, що карбонілювання білків насіння, пов'язане з підвищенням вмісту АФК, супроводжує його старіння (Rajjou et al., 2008). Такі ж окиснювальні процеси розвиваються і при проростанні зернівок за несприятливих умов, зокрема, екстремальних температур, посухи і засолення. У зв'язку з цим можна припустити, що використання мелатоніну, який є потужним антиоксидантом, як праймувального агента може пом'якшити прояв окислювального стресу та підвищити схожість насіння при його старінні або пророщуванні за несприятливих умов (Deng et al., 2017).

Наявні експериментальні дані до певної міри підтверджують це припущення. Так, обробка насіння пшениці мелатоніном значно підвищила швидкість їх проростання та підтримувала подальший ріст в умовах посухи, створюваної ПЕГ (Cui et al., 2018). При цьому мелатонін сприяв збереженню редокс-гомеостазу та посилював синтез антиоксидантних ферментів на рівнях транскрипції та трансляції. Також обробка насіння мелатоніном посилювала експресію генів ферментів гліколізу, зокрема фруктозо-1,6-бісфосфатальдолази, гексокінази, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази та енолази. Крім того, автори виявили активацію під дією мелатоніну експресії генів каскаду білків, пов'язаних із регуляцією аутофагії та зменшенням вмісту денатурованих білків (Cui et al., 2018).

Праймінг насіння кукурудзи 0,8 мМ мелатоніном значно покращував енергію проростання, накопичення біомаси проростків, підвищував відносний вміст води в них, а також концентрацію K^+ при зменшенні концентрації Na^+ (Jiang et al., 2016). У проростках, вирощених з обробленого мелатоніном насіння, при стресі відзначався підвищений вміст проліну та фенольних сполук, зростала активність СОД та каталази. Підвищення

активності антиоксидантних ферментів за умов сольового стресу викликала і передпосівна обробка мелатоніном насіння сої (Awan et al., 2023).

Активацію мелатоніном проростання насіння огірка та підвищення щільності бічних коренів в умовах засолення пов'язують із зміною гормонального балансу – співвідношення АБК та гіберелінів (Zhang et al., 2014a). Крім того, під дією мелатоніну у рослин огірка при засоленні виявлено (Zhang et al., 2014b).

Водночас вплив мелатоніну на проростання насіння, зокрема, старіючого, досліджений поки що дуже слабо.

Висновки до розділу 1

На підставі наявних на даний час відомостей можна виділити щонайменше кілька типів ефектів мелатоніну, що пояснюють його роль у стійкості рослин до стресових факторів: (1) пряма антиоксидантна дія (мелатонін присутній в рослинах у значній кількості, а його антиоксидантна активність вища, ніж у аскорбінової кислоти, глутатіону, НАДФН); (2) здатність після взаємодії з рецептором (рецепторами) впливати на експресію багатьох генів, важливих для захисних реакцій шляхом трансдукції сигналів в генетичний апарат; (3) залучення до процесів АФК та NO-сигналінгу шляхом прямої взаємодії з цими молекулами та впливу на системи їх генерації. Кожен із зазначених механізмів залишається поки що маловивченим.

Особливо складним пояснення залишається питання, як у одній сполучі поєднуються різні, багато в чому протилежні, ефекти. Наприклад, як поєднується пряма антиоксидантна дія і здатність індукувати експресію генів каталітичної субодиниці НАДФН-оксидази – основного ферментативного генератора АФК? Чи пов'язані між собою і яким чином ефекти мелатоніну, що спричиняють зміни кальцієвого і редокс-гомеостазу?

Незважаючи на численні дослідження впливу мелатоніну на ключові стрес-протекторні системи рослин (антиоксидантну, осмопротекторну,

шаперонну та інші), відомості про «знак» цього впливу досить суперечливі. Наприклад, мелатонін може як посилювати, так і послаблювати синтез проліну, як підвищувати, так і знижувати активність антиоксидантних ферментів. Загалом питання про умовні «перемикачі» ефектів мелатоніну залишається поки відкритим і методичні підходи до його вирішення ще не відпрацьовані. Очевидно, цікаві і такі рутинні питання, як видові і сортові особливості прояви ефектів мелатоніну.

На з'ясування принаймні частини перелічених питань і було спрямоване дане дисертаційне дослідження.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти дослідження та їх коротка характеристика

Експериментальними об'єктами були м'яка пшениця (*Triticum aestivum* L.), жито (*Secale cereale* L.) і тритикале ($\times$ *Triticosecale*). Ці культури є господарсько важливими зерновими злаками, водночас вони мають істотні відмінності у стійкості до несприятливих умов довкілля і стратегіях адаптації (Kolupaev et al., 2022; Yastreba et al., 2023). Їх одночасне використання у дослідженнях стрес-протекторної дії мелатоніну може бути корисним для з'ясування видових особливостей прояву його фізіологічних ефектів.

В експериментах використовували зразки пшениці трьох сортів: Тобак, що відрізняється високою посухостійкістю в лабораторних (Kolupaev et al., 2023c) і польових (Urban et al., 2018) умовах, оригінатор – Saaten-Union GmbH, Isernhagen HB (Німеччина); Досконала – чутливий до посухи (Kolupaev et al., 2023c), оригінатор – Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України; а також сорт Етана (заявник – «Дойче Заатфеределунг АГ, Німеччина), який є одним з найбільш поширених іноземних сортів, вирощуваних в Україні (<https://agroportal.ua/news/rastenievodstvo/nazvano-naupropulyarnishi-sorti-pshenici-v-ukrajini>). Повідомляється про його відносно високу посухостійкість в польових умовах (Kryzhanovsky, 2019).

Крім того у роботі використовували насіння озимого тритикале сорту Раритет і озимого жита сорту Пам'ять Худоєрка (оригінатор обох сортів — Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України).

2.2. Дизайн експериментів

2.2.1. Дослідження участі сигнальних сполук у реалізації фізіологічних функцій мелатоніну. Насіння пшениці сорту Досконала знезаражували протягом 2 хв у 70% етанолі, а потім протягом 15 хв у 2% розчині NaClO, після чого 8-10 разів промивали стерильною дистильованою водою. Зернівки пророщували без світла в термостаті при 24°C протягом 3

діб. Після цього у середовище інкубації для відповідних варіантів додавали мелатонін (Alfa Aesar, США, вміст основної речовини не менше 99%) у концентраціях діапазону 10^{-8} - 10^{-4} М та витримували проростки на розчинах протягом 24 год. Вихідний розчин мелатоніну готували шляхом розчинення наважки у невеликому об'ємі спирту. У спеціальних експериментах було встановлено, що етанол у концентрації, еквівалентній максимальній (0,1%), яка міститься в розчинах мелатоніну, суттєво не впливав на теплостійкість проростків. В основних серіях експериментів серед варіантів без мелатоніну вносили еквівалентну кількість етанолу.

Для з'ясування участі АФК та іонів кальцію як сигнальних посередників у реалізації стрес-протекторної дії мелатоніну використовували інгібіторний метод, а саме обробку проростків (надходження через корені) скавенджером пероксиду водню диметилтіосечовиною (Hung et al., 2006), інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом (Sung et al., 2009), хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА та інгібітором утворення інозитол-1,4,5-фосфату, залежного від фосфоліпази С, неоміцином (Shkliarevskyi et al., 2020). При вивченні впливу ДМТС (150 мкМ), імідазолу (10 мкМ), ЕГТА (400 мкМ) та неоміцину (200 мкМ) на теплостійкість проростків та досліджувані біохімічні показники інкубація коренів у розчинах становила 26 год. При оцінці комбінованої дії мелатоніну та антагоністів сигнальних посередників останні додавали в середовище інкубації коренів за 2 години до введення в нього мелатоніну. Зразки, які не обробляли ефекторами, весь час інкубували на воді.

Для визначення теплостійкості проростків їх піддавали ушкоджувальному прогріву у водяному ультратермостаті при температурі $45.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ протягом 10 хв. Після цього проростки всіх варіантів переносили на дистильовану воду та інкубували на світлі (120 Вт/м^2) при температурі $25/20^\circ\text{C}$ (день/ніч) та фотоперіоді 16 год. Через 3 доби оцінювали відносну кількість (%) проростків, які вижили (Shkliarevskyi et al., 2020).

2.2.2. Дослідження сортових особливостей впливу мелатоніну на стійкість проростків пшениці до модельної посухи. Зернівки пшениці

сортів Досконала і Тобак знезаражували протягом 2 хв у 70% етанолі і протягом 15 хв у 2% розчині NaClO, після чого ретельно промивали стерильною дистильованою водою. Зернівки пророщували без світла в термостаті при 24°C протягом 2 діб. Надалі проростки приблизно однакового розміру розкладали по 70 штук в чашки Петрі з 7 мл дистильованої води або таким самим об'ємом 15% розчину ПЕГ 6000 й інкубували в термостаті за температури при 24°C протягом 2 діб. У варіантах з мелатоніном до середовища інкубації проростків додавали розчини мелатоніну до досягнення кінцевих концентрацій діапазону від 0,2 до 5 мкМ. Після 2-добової інкубації на розчинах ПЕГ 6000 або суміші ПЕГ 6000 та мелатоніну визначали біомасу пагонів і коренів та біохімічні показники.

2.2.3. Дослідження впливу праймінгу насіння зернових злаків мелатоніном на його проростання і ріст проростків за стресових і нормальних умов. При дослідженні впливу мелатоніну на проростання насіння злаків з низькими посівними якостями використовували зернівки жита (сорт Пам'ять Худосерка) і тритикале (сорт Раритет), які протягом трьох років зберігалися в приміщенні у неконтрольованих умовах (у літній період температура періодично досягала 30-32°C, а в зимовий період опускалася до -6...-8°C, а відносна вологість повітря під час зберігання неодноразово змінювалася від 25-30 до 80-85%). Внаслідок цього схожість насіння за 3 роки зберігання знизилася приблизно до 40% у тритикале та 30% у жита.

Насіння дослідних варіантів знезаражували 3% розчином гіпохлориту натрію протягом 15 хв, восьмиразово промивали стерильною дистильованою водою. Потім частину насіння протягом 3 год витримували в склянках з дистильованою водою (гідрораймінг). У варіантах з обробкою мелатоніном насіння витримували протягом 3 годин у розчинах мелатоніну в концентраціях 5, 20 та 50 мкМ у темному термостаті при 24°C. Потім насіння, піддане гідропраймінгу або обробці мелатоніном, висушували в термостаті при температурі 24°C і вологості повітря 40% протягом 24 год до вихідної вологості. Насіння контрольного варіанта (без гідропраймінгу та

обробки мелатоніном) знезаражували 3% розчином гіпохлориту натрію протягом 15 хв безпосередньо перед пророщуванням. Після цього насіння відповідно до варіантів пророщували у чашках Петрі на подвійному шарі вологого фільтрувального паперу (по 80 зернівок в кожній чашці з додаванням 8 мл води). Через 2 доби пророщування оцінювали відносну кількість схожого насіння та масу пагонів та коріння насіння з нормальною схожістю. На 3 добу пророщування пагони нормально пророслого насіння використовували для біохімічних аналізів.

В експериментах з дослідження впливу праймінгу мелатоніном на проростання зернівок пшениці (сорт Етана) за умов осмотичного і сольового стресів як контрольний варіант використовували зразки насіння, витримане протягом 3 год в темному термостаті при 24°C в склянках з дистильованою водою (співвідношення об'ємів зернівок і води 1:4). Зразки дослідних варіантів витримували протягом 3 год у 20 мкМ розчині мелатоніну, інші умови, як для контрольного варіанта (рис. 2.1). Після гідропраймінгу (контроль) і обробки мелатоніном насіння на скляній поверхні висушували протягом 24 год у темному термостаті за температури 24°C і відносної вологості повітря 40% до вихідної вологості (11-12%).

По 80 приблизно однакових зернівок переносили у чашки Петрі на подвійні фільтри, які зволожували 8 мл дистильованої води (контроль), 8 мл 15% ПЕГ 6000 (посуха) або 8 мл 150 мМ NaCl (сольовий стрес). Насіння пророщували в темному термостаті за температури 24 °C протягом 3 діб. Через 2 доби пророщування визначали загальну активність амілази у зернівках. На 3-ю добу пророщування оцінювали схожість і ростові показники (відносну кількість пророслого насіння і масу стеблової та кореневої частини проростків). Також пагони 3-добових проростків використовували для аналізу показників про-/антиоксидантної рівноваги та вмісту розчинних вуглеводів і проліну (рис. 2.1). Усі біохімічні показники за винятком активності амілази визначали тільки у пагонах проростків, оскільки прямий контакт коренів з ПЕГ 6000 не дає можливості відбирати проби

коренів без їх механічних ушкоджень, що може призводити до змін досліджуваних показників. Активність амілази аналізували у зернівках.



Рис. 2.1. Дизайн експерименту з дослідження впливу мелатоніну на проростання зернівок пшениці за посухи і сольового стресу. АО ферменти – антиоксидантні ферменти; АФК – активні форми кисню.

В експериментах з порівняння впливу праймінгу насіння мелатоніном на стійкість проростків пшениці і жита до відносно тривалого теплового стресу, що поєднувався з повітряною посухою, зернівки дослідних варіантів занурювали у розчини мелатоніну в концентраціях 5–500 мкМ протягом 2 год, в контрольному варіанті зернівки обробляли дистильованою водою. Насіння пророщували впродовж 3 діб в термостаті за температури $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Після цього оцінювали теплостійкість проростків за ростовою реакцією на високу температуру з використанням методу, запропонованого О.І. Жук та І.П. Григорюком (Pat. 45879 UA, 2002, <https://uapatents.com/2-45879-sposib-ocinki-zharostijjnosti-sortiv-ozimo-pshenici.html>) з нашими модифікаціями. Дослідні проростки протягом 6 год піддавали прогріву у відкритих чашках Петрі у повітряному термостаті за температури $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$ і відносної вологості повітря 42–45%, проростки контрольного варіанта у цей час залишалися в термостаті з температурою 24°C і вологістю повітря 60–70%. Для недопущення підсихання коренів фільтрувальний папір у чашках через кожну

годину зволожували однаковою кількістю дистильованої води відповідної температури. Після закінчення прогріву проростки дослідних варіантів знову переносили в термостат з температурою 24°C. Температуру та часову експозицію, що спричиняли інгібування росту приблизно на 50–70%, добирали у попередніх дослідях (результати не наводяться). Для кожного варіанта визначали приріст протягом доби біомаси пагонів і коренів за формулою:

$$I = \frac{(C_2 - C_1) - (E_2 - E_1)}{C_2 - C_1} \cdot 100\%$$

де I – інгібування росту (%); C_1 і C_2 , E_1 і E_2 – відповідно, початкові і кінцеві величини біомаси коренів або пагонів у контрольних і дослідних (тепловий стрес) варіантах.

Одразу після закінчення експозиції проростків за стресових умов визначали вміст води у тканинах гравіметричним методом шляхом висушування за температури 103°C до сталої маси. Величину водного дефіциту оцінювали за насиченням відокремлених від проростків пагонів водою протягом 12 год і виражали у відсотках від загального вмісту води у стані повного насичення (Barrs, Weatherley, 1962).

Біохімічні показники визначали у пагонах проростків одразу після 6-годинного впливу на них високої температури.

2.3. Біохімічні аналізи

2.3.1. Визначення показників генерації АФК та окислювального стресу. Генерацію супероксидних аніон-радикалів коренями інтактних проростків оцінювали за відновленням нітросинього тетразолію (Kolupaev et al., 2012). Від проростків попередньо відокремлювали ендосперм і ретельно промивали їх дистильованою водою. По шість проростків поміщали коренями у бюкси з 0.1 М K_2Na -фосфатним буфером (рН 7,6), який містив 0,05% нітросинього тетразолію (НСТ), 10 мкМ ЕДТА, 0.1% Тритону Х-100 на 20 хв, після чого вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 530 нм. Для

перевірки специфічності генерації $O_2^{\cdot-}$ у спеціальних дослідах в проби додавали СОД (50 од./мл). СОД інгібувала швидкість відновлення НСТ щонайменше ніж 90%, у зв'язку з цим вважали, що відновлення НСТ визначається кількістю супероксидних аніон-радикалів. Показники генерації супероксидного аніон-радикалу розраховували в умовних одиницях як відношення абсорбції інкубаційного розчину до маси коренів, які інкубувалися у буфері, і виражали в % до величини, яка спостерігалася у контрольному варіанті в першій часовій точці експерименту.

При визначенні генерації супероксидного аніон-радикала пагонами проростків по 10 пагонів однакового розміру поміщали в бюкси з 5 мл 0,1 М К, Na-фосфатного буферу (рН 7,6), що містив 0,05% НСТ, 10 мкМ ЕДТА і 0,1% тритону Х-100. Через 1 год пагони обережно вилучали з бюксів та вимірювали оптичну густину інкубаційного розчину за довжини хвилі 530 нм.

Для визначення вмісту H_2O_2 корені або пагони гомогенізували на льоду в 5%-ній ТХО. Проби центрифугували на центрифугі MPW 350R (MPW MedInstruments, Польща) при 8000 g протягом 10 хв при температурі 2–4°C і в супернатанті визначали концентрацію пероксиду водню з використанням феротіоціанатного методу (Sagisaka, 1976). Вміст H_2O_2 виражали у нмоль/г сирої маси.

Для аналізу кількості продуктів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (в основному малоновий діальдегід – МДА), наважки рослинного матеріалу гомогенізували в реакційному середовищі, який містило 0,25%-ну 2-тіобарбітурову кислоту в 10%-ній ТХО. Пробірки з кришками з алюмінієвої фольги поміщали в киплячу баню на 30 хв. Потім проби охолоджували та центрифугували 15 хв при 10000 g. Абсорбцію супернатанту визначали при 532 нм (максимум світлопоглинання МДА) та 600 нм (для поправки на неспецифічне світлопоглинання) (Kolupaev et al., 2020). Вміст МДА визначали,

використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції $1.55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (для рожевого кольору) і виражали у нмоль/г сирової маси.

Стан мембран клітин коренів оцінювали через 3 години після ушкоджувального прогріву за виходом речовин, що поглинають в ультрафіолетовій (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. Оптичну густину інкубаційного розчину визначали при A_{252} та A_{264} (Shkliarevskiy et al., 2020). 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, не підданих ушкоджувальному прогріву.

2.3.2. Аналіз активності антиоксидантних ферментів. Для визначення активності антиоксидантних ферментів СОД, каталази та гваяколпероксидази пагони гомогенізували на холоді в 0,15 М К,Na-фосфатному буфері (рН 7,6) з вмістом ЕДТА (0,1 мМ) та дітіотреїтолу (1 мМ) (Kolupaev et al., 2022). Активність ферментів визначали в надосадовій рідині після центрифугування гомогенату при 8000 g протягом 10 хв при 4°C. Оскільки під час відбору проб вміст води у проростках проростків різних варіантів відрізнявся, то досліджувані показники розраховували на грам сухої маси.

Активність СОД (ЕС 1.15.1.1.1) визначали при рН 7,6 методом, що базується на здатності ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксид-аніони, що утворюються при аеробній взаємодії НАДН і феназинметосульфату, світлопоглинання визначали при 540 нм. Активність каталази (ЕС 1.11.1.6) аналізували при рН 7,0 за кількістю пероксиду водню, розкладеного за одиницю часу. Активність гваяколпероксидази (ЕС 1.11.1.7) визначали з використанням гваяколу як донора водню та пероксиду водню як субстрату. У цьому випадку рН реакційної суміші попередньо доводили до 6,2 К,Na-фосфатним буфером. Світлопоглинання тетрагваяколу визначали при 470 нм.

2.3.3. Визначення активності амілази у зернівках. Загальну активність амілази визначали за кількістю відновних цукрів, що утворюються в результаті гідролізу крохмалю, за відомими протоколами (Goldstein, Jennings, 1975; Fawzi, El-Fouly, 1979) з нашими модифікаціями (Yastreba et al., 2024). Наважку рослинного матеріалу гомогенізували в 0,2 М ацетатному буфері (pH 5,6), гомогенат центрифугували на центрифугі MPW 350R (MPW MedInstruments, Poland) при 8000 g за температури не вище 4°C протягом 15 хв. Супернатант розбавляли у необхідну кількість разів тим самим буфером і використовували для аналізу. Витяжку ферменту змішували з 5 мл 2% розчину крохмалю й інкубували в термостаті протягом 30 хв за температури 25°C, після чого реакцію зупиняли осадженням білків, додаючи 0,1 мл 10% ацетату свинцю і 0,1 мл 16% сульфату натрію. У контрольні проби ці сполуки додавали до внесення в них крохмалю. Вміст відновних цукрів у кожній пробі (включно з контролем з інактивованим ферментом) визначали за реакцією з реактивом Фелінга. Оптичну густину супернатанту вимірювали на спектрофотометрі UV-1280 (Shimadzu, Japan) за довжини хвилі 670 нм. Як стандарт використовували D-мальтозу.

2.3.4. Вимірювання вмісту низькомолекулярних сполук зі стрес-протекторними властивостями. Сумарний вміст розчинних вуглеводів у пагонах проростків визначали методом Моріса-Рое (Zhao et al., 2003) з модифікаціями. Рослинний матеріал гомогенізували у дистильованій воді, гомогенат кип'ятили протягом 10 хв. Для осадження білків до гомогенату додавали однакові об'єми розчинів сульфату цинку (30%) і жовтої кров'яної солі (15%). Проби фільтрували і за необхідності розбавляли дистильованою водою, після чого 1 мл екстракту змішували з 3 мл антронового реактиву. Розчин порівняння замість екстракту містив 1 мл дистильованої води. Проби кип'ятили на водяній бані протягом 7 хв, охолоджували й визначали оптичну густину при 610 нм. Як стандарт використовували D-глюкозу.

Визначення вмісту проліну здійснювали за методом, описаним Bates і співавт. (1973) з модифікаціями. Наважки пагонів гомогенізували у

дистильованій воді, після чого гомогенат одразу протягом 10 хв кип'ятили на водяній бані. Проби охолоджували, екстракт фільтрували. У реакційних пробірках змішували по 1 мл екстракту, льодяної оцтової кислоти і нінгідринового реактиву. Пробірки, закриті ковпачками з фольги, нагрівали на киплячій водяній бані протягом 1 год. Оптичну густину визначали за довжини хвилі 520 нм. Як стандарт використовували L-пролін.

Для аналізу загального вмісту фенольних сполук і флавоноїдів проростки гомогенізували у 80% етанолі, екстрагували протягом 20 хв при кімнатній температурі та центрифугували при 8000 g протягом 15 хв. Для аналізу фенольних сполук у реакційні пробірки додавали 0,5 мл надосадової рідини, 8 мл дистильованої води та 0,5 мл реактиву Фоліна, перемішували і через 3 хв додавали 1 мл 10% карбонату натрію. Світлопоглинання реакційної суміші вимірювали при 725 нм через 1 годину (Bobo-García et al., 2015). Вміст фенольних сполук виражали як мкмоль галової кислоти на грам сухої маси.

Для визначення вмісту антоціанів зразки пагонів гомогенізували в 1% HCl в етанолі. Після центрифугування гомогенату при 8000 g протягом 15 хвилин поглинання супернатанту оцінювали при 530 нм (Nogués, Baker, 2000). Результати виражали в абсорбції на масу свіжої речовини рослинного матеріалу.

2.4. Повторність експериментів і статистична обробка результатів

Для забезпечення достовірності отриманих результатів та їх репрезентативності у дослідях з оцінки виживаності та ростових показників рослинних об'єктів у кожному повторенні включали не менше 30 зразків. Кожен експеримент виконувався в чотирьох повтореннях, які відтворювали незалежно щонайменше три рази. Такий підхід дозволяв враховувати можливу біологічну варіабельність і підвищувати надійність отриманих результатів.

Біохімічні аналізи проводили у 4–5-разовому біологічному повторенні в межах 2–3 незалежних дослідів.

Для обробки результатів використовували загальновідомі статистичні методи. Зокрема, для перевірки вірогідності відмінностей між варіантами застосовували *t*-критерій Ст'юдента для супряжених вибірок, використовуючи пакет статистичного аналізу Statistica, версія 10.0. Перед цим виконували перевірку нормальності розподілу даних вибірки, щоб підтвердити коректність використання параметричних методів аналізу. В окремих випадках використовували дисперсійний аналіз. За результатами кореляційного аналізу матрицю кореляцій Пірсона будували у програмі Microsoft Excel.

У таблицях і на рисунках представлені середні значення для серій експериментів, проведених в ідентичних умовах, а також їх квадратичні похибки. Усі відмінності між варіантами, які обговорюються у роботі, вважалися значимими при $p \leq 0,05$, за винятком випадків, спеціально відзначених у тексті.

РОЗДІЛ 3. ФЕНОМЕНОЛОГІЯ ВПЛИВУ МЕЛАТОНІНУ НА СТІЙКІСТЬ РОСЛИННИХ ОБ'ЄКТІВ ДО ВИСОКИХ ТЕМПЕРАТУР І МОДЕЛЬНОЇ ПОСУХИ

3.1. Вплив мелатоніну на стійкість проростків злаків до потенційно летального і помірного теплового стресу

До цього часу отримані дані про посилення синтезу та збільшення ендогенного вмісту мелатоніну в рослинах різних таксономічних груп за дії стрес-факторів різної природи. Так, у коренях люпину виявлено підвищення вмісту мелатоніну у відповідь на дію посухи, засолення, підкислення середовища, екзогенного пероксиду водню, а також низької температури (Arnao, Hernández-Ruiz, 2013). У листках рису, оброблених солями кадмію, виявлено 6-разове підвищення вмісту мелатоніну та активності ферментів, що беруть участь у його синтезі — триптофандекарбоксилази, триптамін-5-гідроксилази та гідроксиіндол-О-метилтрансферази (Byeon et al., 2015).

У томатів зафіксоване поступове збільшення вмісту ендогенного мелатоніну з підвищенням температури навколишнього середовища максимум до 40°C (Xu et al., 2016). Також встановлено, що у томатах з генетичними дефектами синтезу мелатоніну спостерігалися більш сильні теплові ушкодження порівняно зі звичайними рослинами (Ahammed et al., 2019). Високий вміст мелатоніну за дії високої температури зафіксовано і в проростках рису (Byeon, Back, 2014) і арабідопсису (Shi et al., 2015). У листках і коренях пшениці у відповідь на дію нагріву виявлено майже дворазове зростання вмісту мелатоніну (Buttar et al., 2020).

Накопичений і значний обсяг даних про захисні ефекти екзогенного мелатоніну на рослини за дії стресорів різної природи. Обробка насіння пшениці мелатоніном значно підвищувала швидкість їх проростання та

підтримувала подальший ріст в умовах осмотичного стресу, створюваного за допомогою ПЕГ (Cui et al., 2018). Ефект підвищення посухостійкості рослин кукурудзи під впливом мелатоніну зафіксовано в польовому експерименті (Ahmad et al., 2020). Фоліарна обробка мелатоніном збільшила загальну кількість листків і їх площу, масу тисячі зерен і врожайність зерна кукурудзи в напівзасушливому регіоні.

Передобробка мелатоніном рослин томатів зменшувала фотоінгібування та вихід електролітів з тканин при їх експозиції за температури 40°C (Xu et al., 2016). Також у рослин, оброблених мелатоніном, вміст убіквітинованих білків у стресових умовах був меншим, ніж у необроблених. Теплостійкість проростків пшениці підвищувалася за їх фоліарної обробки мелатоніном (Buttar et al., 2020), а також у результаті праймінгу насіння (Kolupaev et al., 2023a). При цьому спостерігалось зменшення проявів індукованого високої температурою окислювального стресу і натомість зростання активності ключових антиоксидантних ферментів (Buttar et al., 2020).

Однак, незважаючи на великий обсяг феноменологічних даних, майже недослідженим залишається вплив мелатоніну на стійкість етіюльованих проростків на найбільш ранніх фазах розвитку. Також не достатньо робіт з порівняння впливу мелатоніну на рослини різних таксономічних груп. Повною мірою це стосується зернових злаків. Зважаючи на це, оцінювали концентраційну залежність впливу мелатоніну на теплостійкість етіюльованих проростків пшениці сорту Досконала.

Обробка проростків мелатоніном у широкому діапазоні концентрацій (10^{-8} – 10^{-4} М) сприяла підвищенню їх виживаності після дії теплового стресу (рис. 3.1). Дослідження показали, що мелатонін демонструє захисний ефект для всього діапазону досліджуваних концентрацій, однак найпомітніший вплив було зафіксовано при концентрації 1 мкМ. Це узгоджується з результатами інших досліджень, які підтверджують, що оптимальні концентрації мелатоніну для підвищення стійкості рослин до стресу зазвичай

знаходяться у низькому мікромолярному діапазоні (Arnao & Hernandez-Ruiz, 2019; Zhang et al., 2017).

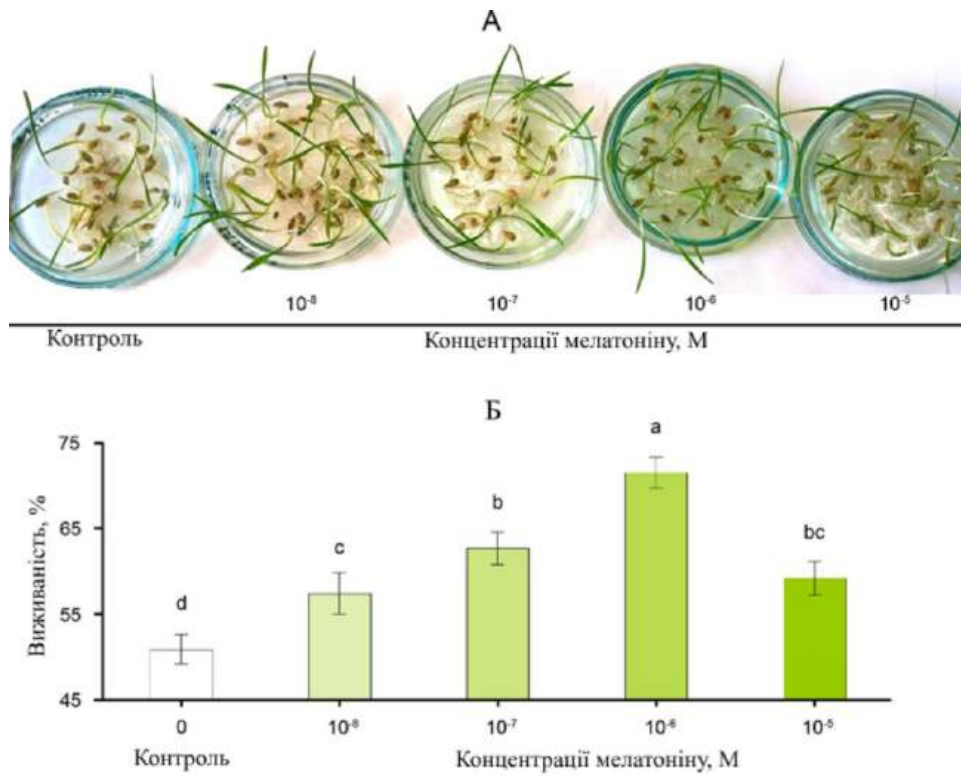


Рис. 3.1. Концентраційна залежність впливу мелатоніну на виживаність проростків пшениці після 10-хвиленного прогріву у водяному термостаті за температури 45°C.

Різними літерами позначені величини, різниця між якими вірогідна при $p \leq 0.05$.

На основі отриманих результатів концентрація 1 мкМ була обрана для подальших експериментів як найбільш ефективна.

У наступній серії експериментів досліджували вплив мелатоніну на стійкість проростків озимих пшениці і жита до помірного (нелетального) теплового стресу (6-годинний прогрів у повітряному термостаті за температури 44°C, який поєднувався з дією помірною повітряною посухи - вологість повітря 42-45%). У даній серії експериментів обробку мелатоніном проводили шляхом 2-годинного замочування насіння.

Попереднє оброблення зернівок пшениці та жита розчинами мелатоніну в концентраціях 5–100 мкМ не мало значного впливу на ріст коренів і пагонів на третю-четверту добу експерименту за вирощування

проростків при контрольній температурі 24°C. Водночас мелатонін у концентрації 500 мкМ викликав інгібування росту, яке сягало приблизно 35% для пагонів і 25% для коренів. Тому для подальших експериментів, спрямованих на визначення впливу мелатоніну на теплостійкість, використовували концентрації в межах 5–100 мкМ (рис. 3.2).

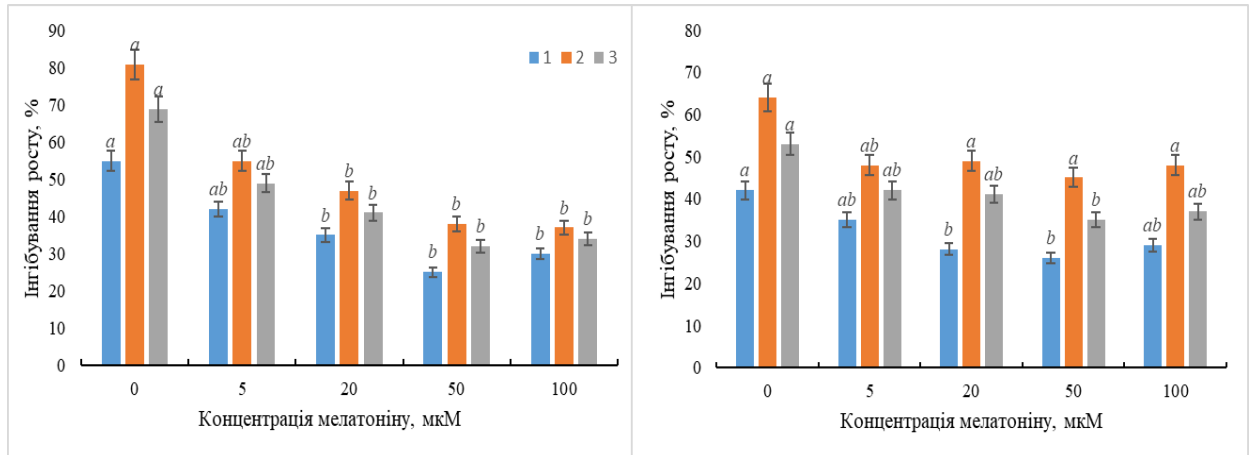


Рис. 3.2. Вплив праймінгу зернівок мелатоніном на інгібування росту (%) пагонів (1), коренів (2) і проростків в цілому (3) після дії теплового стресу (44°C, 6 год). (a) – *Triticum aestivum*; (б) – *Secale cereale*. Різними літерами позначені величини, різниця між якими вірогідна при $p \leq 0.05$ при їх порівнянні в межах одного виду рослин.

Тепловий стрес (44°C) значно пригнічував ріст проростків пшениці (рис. 3.2). При цьому інгібування росту коренів було більш вираженим, ніж пагонів. Проростки жита виявляли меншу чутливість до теплового стресу, але в них також спостерігалось більш сильне пригнічення росту коренів порівняно з пагонами (рис. 3.2). Обробка зернівок мелатоніном значно зменшувала інгібування росту пагонів та коренів пшениці за умов теплового стресу (рис. 3.2). Найбільш виражений захисний ефект було зафіксовано при концентраціях мелатоніну 20, 50 і 100 мкМ.

Щодо жита, вплив мелатоніну на ростові характеристики за теплового стресу був менш вираженим. Проте обробка зернівок мелатоніном у концентраціях 20 і 50 мкМ зменшувала інгібування росту пагонів (рис. 3.2). У випадку коренів жита мелатонін в усіх концентраціях лише незначно знижував інгібування, спричинене стресом, однак ці зміни не були статистично значущими ($p \leq 0,05$). Аналіз сумарних ростових показників

проростків жита показав, що вірогідне зменшення інгібування спостерігалось при обробці мелатоніном у концентрації 50 мкМ, тому саме цю концентрацію було використано для наступних експериментів.

Висока температура в умовах низької вологості повітря викликала значне зменшення вмісту води в пагонах проростків пшениці, а у проростків жита цей ефект був менш вираженим (рис. 3.3, а). Обробка зернівок мелатоніном сприяла вірогідному збільшенню вмісту води в пагонах пшениці, тоді як у жита цей ефект проявлявся лише як тенденція.

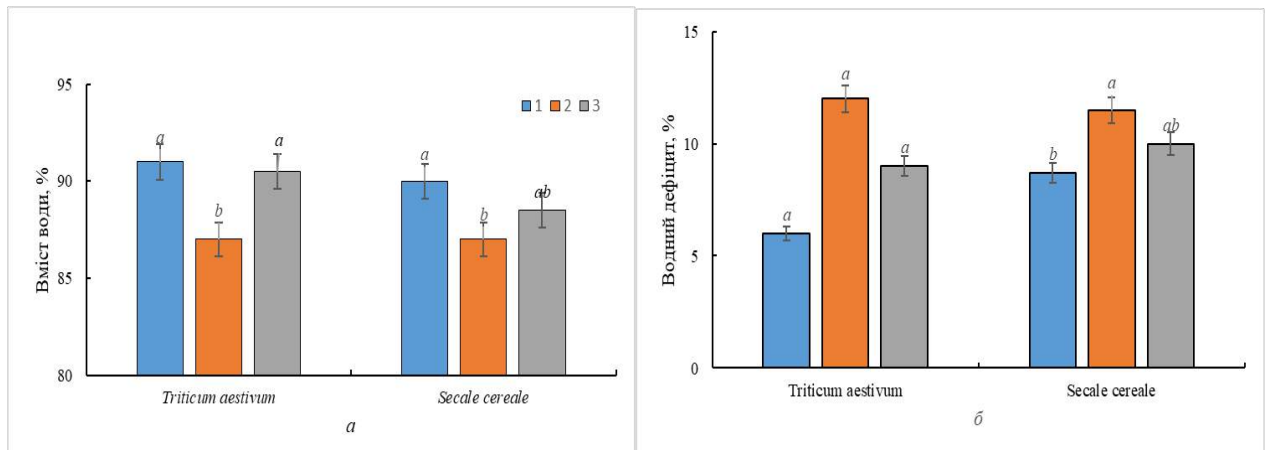


Рис. 3.3. Вміст води (а – %) і водний дефіцит (б – %) у пагонах проростків пшениці і жита. 1 – контроль; 2 – тепловий стрес (44°C, 6 год); 3 – тепловий стрес + мелатонін (50 мкМ). Різними літерами позначені величини, різниця між якими вірогідна при $p \leq 0.05$ при їх порівнянні в межах одного виду рослин.

Тепловий стрес також спричиняв підвищення водного дефіциту в пагонах пшениці, що свідчить про значне порушення водного балансу (рис. 3.3, б). Попередня обробка мелатоніном зменшувала водний дефіцит, демонструючи ефективний протекторний вплив. У жита тепловий стрес не призводив до значного збільшення водного дефіциту, а мелатонін лише частково зменшував цей показник, хоча ці зміни не досягали статистичної значущості при $p \leq 0,05$.

3.2. Вплив мелатоніну на стійкість проростків пшениці до модельної посухи

Відомо, що ефекти можуть залежати не тільки від видових, а й від сортових особливостей рослин. Так, показано, що мелатонін посилював накопичення проліну при посусі у нестійкого сорту пшениці та послаблював у стійкого (Li et al., 2020). Відомо, що адаптивні стратегії сортів пшениці та інших зернових культур можуть суттєво відрізнятися, що може виявлятися у різному внеску в адаптацію до окислювального стресу ферментативних та неферментативних компонентів антиоксидантної системи (Kolupaev et al., 2023a; 2023c).

Незважаючи на велике значення пшениці як продовольчої культури, вплив мелатоніну на її посухостійкість поки що вивчено лише в поодиноких роботах (Cui et al., 2018; Li et al., 2020; Zhang et al., 2023). Особливо фрагментарна інформація про особливості прояву стрес-протекторних ефектів мелатоніну у сортів із різною стратегією адаптації до посухи. У зв'язку з цим порівнювали реакцію 2-4-добових проростків пшениці сортів Тобак (псухостійкий) і Досконала (чутливий) на дію мелатоніну в умовах модельної посухи (обробка 15% ПЕГ 6000).

За таких умов ріст біомаси проростків істотно знижувався. У стійкого до посухи сорту пшениці Тобак зменшення біомаси коренів і пагонів складало приблизно 35% порівняно з контролем (рис. 3.4). Натомість у чутливого до посухи сорту Досконала осмотичний стрес мав більш виражений негативний ефект, спричиняючи зниження біомаси органів проростків приблизно на 53% (рис. 3.4).

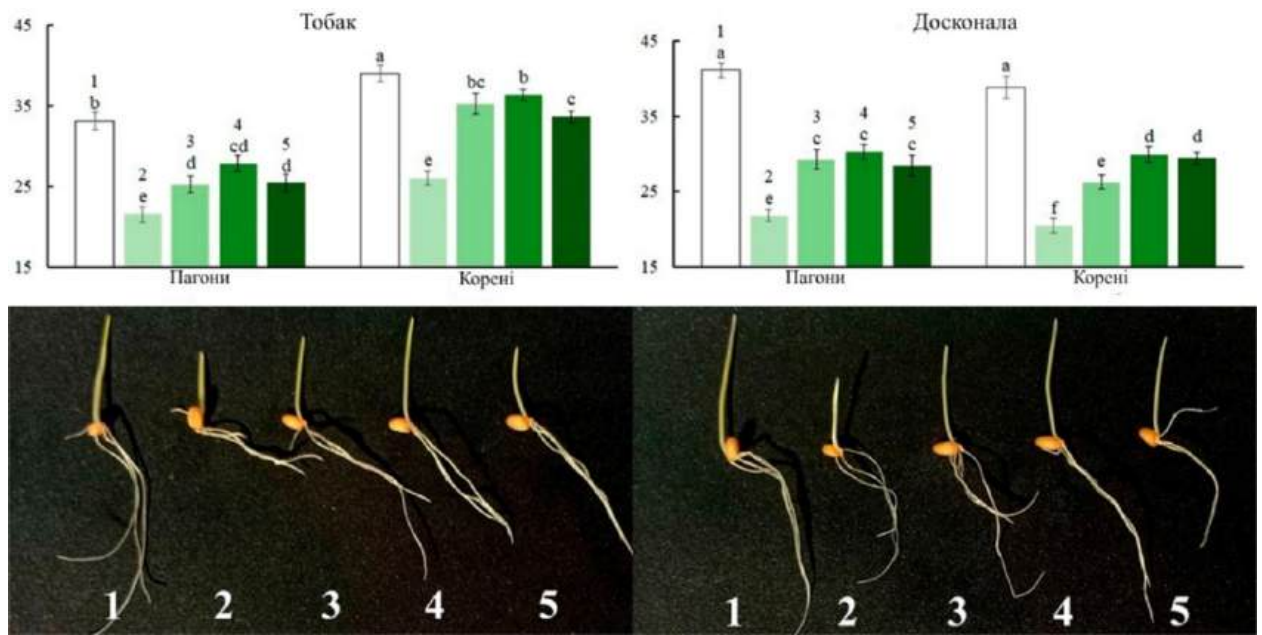


Рис. 3.4. Маса коренів і пагонів (мг) проростків пшениці сортів Тобак і Досконала за дії ПЕГ 6000 і мелатоніну. 1 — контроль; 2 — ПЕГ (15%); 3 — ПЕГ (15%) + мелатонін (0.2 мкМ); 4 — ПЕГ (15%) + мелатонін (1 мкМ); 5 — ПЕГ (15%) + мелатонін (5 мкМ).

Застосування мелатоніну в концентраціях 0,2–5,0 мкМ значно пом'якшувало інгібуючу дію осмотичного стресу на ріст проростків обох сортів. Найвищу ефективність спостерігали при використанні мелатоніну в концентрації 1 мкМ, яка сприяла максимальному зменшенню негативного впливу осмотичного стресу. Це свідчить про високу ефективність мелатоніну як антистресового регулятора в умовах осмотичного стресу (рис. 3.4).

У сорту Досконала, який є більш чутливим до посухи, позитивний вплив мелатоніну був більш вираженим. Обробка мелатоніном сприяла значному збільшенню біомаси коренів і пагонів порівняно з необробленими рослинами, що піддавалися осмотичному стресу. Це може вказувати на вищу залежність чутливих до посухи сортів від регуляторного впливу мелатоніну за умов обмеженої доступності води. У стійкішого сорту Тобак мелатонін також помітно зменшував негативний вплив стресу, але ступінь такого ефекту був меншим, ніж у сорту Досконала (рис. 3.4).

Аналіз росту окремих органів показав, що мелатонін впливає на ріст як пагонів, так і коренів проростків обох сортів. Водночас ступінь інгібування

росту коренів і пагонів сорту Досконала значно знижувався після обробки мелатоніном, особливо при концентрації 1 мкМ. У сорту Тобак мелатонін також сприяв зменшенню негативного впливу стресу на ріст коренів і пагонів, проте ефект був менш вираженим.

Висновки до розділу 3

Обробка проростків пшениці розчинами мелатоніну в концентраціях діапазону від 10^{-8} до 10^{-5} М підвищувала їх виживаність після ушкоджувального прогріву. Максимальний позитивний ефект спричиняла концентрація порядку 10^{-6} М.

За передпосівної обробки насіння пшениці і жита мелатоніном в концентраціях 20-100 мкМ зменшувалось інгібування росту проростків після впливу на них помірного теплового стресу, поєднаного з помірною повітряною посухою. Більш помітний протекторний ефект мелатоніну виявлено на проростках пшениці. Встановлено, що крім позитивного впливу на ріст проростків, що зазнали дії стресорів, обробка зернівок пшениці мелатоніном сприяла збереженню у проростках вмісту води, близького до контрольного варіанта.

Встановлено, що обробка мелатоніном (концентрація 0,2-5,0 мкМ, надходження через корені) зменшувала інгібування росту коренів і пагонів проростків за умов посухи, спричинюваної дією ПЕГ 6000 у двох досліджуваних сортів пшениці. При цьому більш виразно захисні ефекти мелатоніну проявлялися за його впливу на проростки чутливого до посухи сорту.

Розділ 4 МЕХАНІЗМИ ІНДУКУВАННЯ МЕЛАТОНІНОМ ТЕПЛО- І ОСМОСТІЙКОСТІ ПРОРОСТКІВ ЗЛАКІВ

4.1. Участь АФК і кальцію в індукуванні теплостійкості проростків пшениці мелатоніном

Як уже зазначалося, є підстави вважати, що стрес-протекторні ефекти мелатоніну зумовлені його залученням до складної сигнальної мережі рослинних клітин. Імовірно, важливу роль у цій мережі відіграє функціональна взаємодія мелатоніну з АФК та іонами кальцію як універсальними внутрішньоклітинними месенджерами. Однак причинно-наслідкові зв'язки між можливими змінами кальцієвого гомеостазу та генерацією АФК та формуванням стійкості рослин до високих температур досі залишаються практично не дослідженими. Це зокрема стосується і виявленого феномену індукування теплостійкості злаків при обробці мелатоніном. У зв'язку з цим одним із завдань роботи стало дослідження можливого залучення АФК та іонів кальцію, що надходять у цитозоль з різних компартментів, в індуковані мелатоніном процеси розвитку теплостійкості проростків пшениці та активації їх антиоксидантної системи. Для цього досліджували динаміку генерації АФК коренями проростків, активність в них антиоксидантних ферментів і вплив антагоністів кальцію, антиоксидантів та інгібітору НАДФН-оксидази на теплостійкість проростків пшениці.

4.1.1. Вплив мелатоніну на генерацію АФК коренями проростків пшениці. Генерація $O_2^{\bullet-}$ у коренях проростків контрольного варіанту протягом 24 год спостережень істотно не змінювалася (рис. 4.1 А). У той же час у варіанті з інкубацією проростків на розчині, що містив 1 мкМ мелатоніну, вже через 20 хв після початку дії спостерігали дворазове посилення генерації супероксидного аніон-радикала коренями (рис. 4.1 А). До першої години інкубації проростків на розчині мелатоніну відзначалося невелике додаткове підвищення генерації $O_2^{\bullet-}$, проте достовірно ця величина

не відрізнялася від зафіксованої в першій точці експерименту. Посилена генерація супероксидного аніон-радикала спостерігалася й у наступні кілька годин, однак на момент закінчення інкубації (24 год) цей показник помітно знижувався, хоч і перевищував величини контролю (рис. 4.1, А).

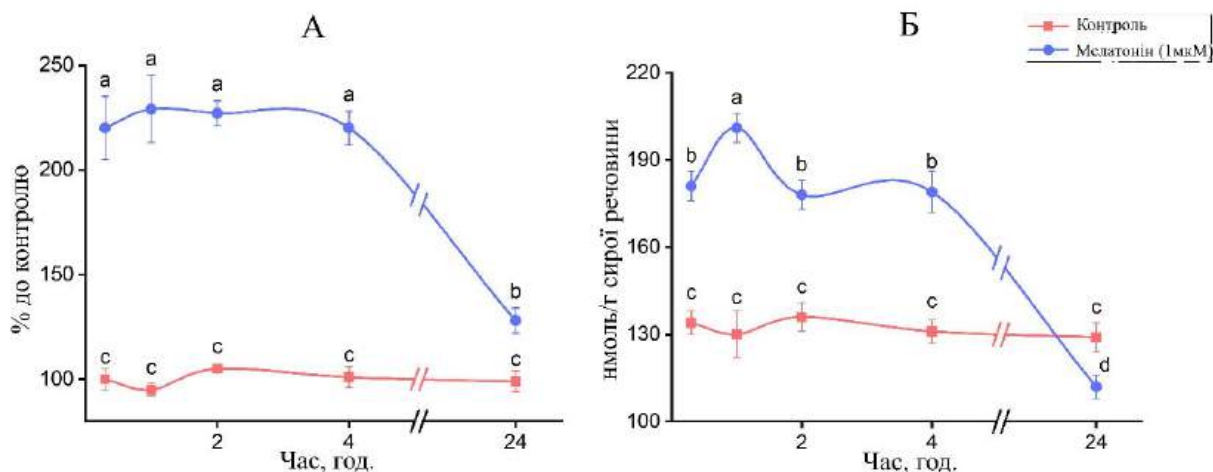


Рис. 4.1. Динаміка генерації супероксидного аніон радикала (А) та вмісту пероксиду водню (Б) у коренях проростків пшениці під впливом 1 мкМ мелатоніну.

Примітка. Різними літерами позначені величини, відмінності між якими вірогідні при $p \leq 0,05$.

Вміст пероксиду водню у коренях проростків контрольного варіанта за період спостережень суттєво не змінювався (рис. 4.1 В). У варіанті з обробкою мелатоніном кількість H_2O_2 , як і генерація $\text{O}_2^{\cdot-}$, істотно збільшувалася вже через 20 хв після початку впливу (рис. 4.1, В). Максимальне підвищення вмісту пероксиду водню зафіксовано через 1 годину після початку інкубації проростків у присутності мелатоніну. Через 2-3 години після початку впливу мелатоніну вміст H_2O_2 у коренях проростків залишався помітно підвищеним, проте до 24 годин значно знижувався і був нижчим від контролю (рис. 4.1, В).

4.1.2. Динаміка активності антиоксидантних ферментів у коренях проростків пшениці при інкубації на розчині мелатоніну. У період спостережень суттєвих змін активності СОД у коренях проростків

контрольного варіанта не виявлено (рис. 4.2, А). Не зафіксовано значних змін активності ферменту і у варіанті з обробкою мелатоніном.

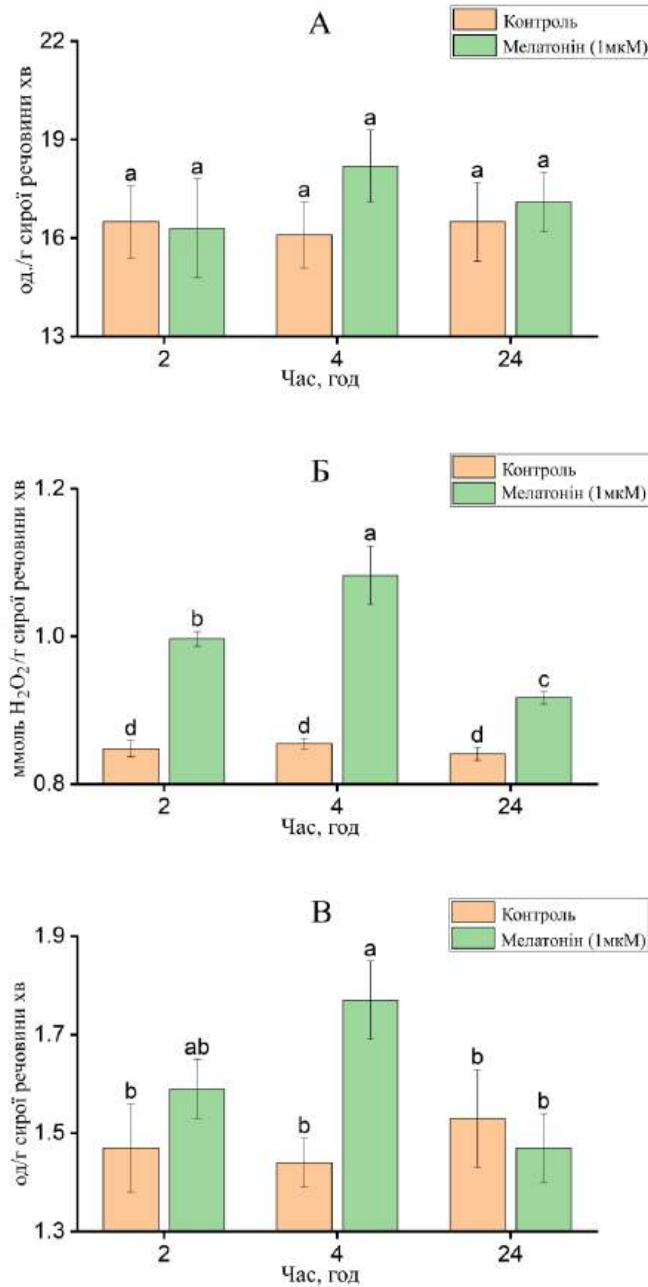


Рис. 4.2. Динаміка активності СОД (А), каталази (Б) та гваяколпероксидази (В) у коренях проростків пшениці при обробці їх мелатоніном.

Примітка. Різними літерами позначені величини, відмінності між якими суттєві при $p \leq 0,05$.

Активність каталази у коренях проростків у контролі також не змінювалася протягом експерименту (рис. 4.2, В). Обробка мелатоніном

викликала значне підвищення активності ферменту вже через 2 години після початку інкубації. Найбільш суттєве збільшення активності каталази відзначено через 4 години впливу мелатоніну. Через 24 години активність ферменту у варіанті з мелатоніном трохи знижувалася, однак у цій точці експерименту її значення також перевищували величини контролю.

Активність гваяколпероксидази у контрольному варіанті в період спостережень істотно не змінювалася (рис. 4.2, С). Обробка мелатоніном спричиняла підвищення активності ферменту, яке було значним через 4 години після її початку.

4.1.3. Активність антиоксидантних ферментів, генерація АФК та показники стану мембран коренів проростків пшениці після впливу теплового стресу. Через 3 години після впливу теплового стресу активність СОД і гваяколпероксидази в коренях проростків пшениці суттєво не змінювалася, проте активність каталази знижувалася (рис. 4.3, А-В). Обробка мелатоніном не впливала на активність СОД, проте спричиняла суттєве підвищення активності каталази та гваяколпероксидази в коренях проростків, що зазнали стресового впливу.

Генерація супероксидного аніон-радикала у коренях проростків пшениці після теплового стресу суттєво не змінювалася (рис. 4.3, Г). Однак обробка мелатоніном викликала деяке зниження генерації $O_2^{\cdot-}$ в коренях проростків, підданих тепловому стресу.

Вміст пероксиду водню та МДА у коренях після ушкоджувального прогріву помітно збільшувався, а обробка мелатоніном повністю усувала прояв такого ефекту (рис. 4.3, Д, Є).

Також після теплового стресу відзначалося помітне посилення виходу речовин, які поглинають у ділянці спектру УФ-В, з коренів проростків пшениці, що свідчить про пошкодження їх мембран (рис. 4.3, Ж). У той же час обробка мелатоніном значно зменшувала цей показник для коренів проростків, які зазнали стресу.

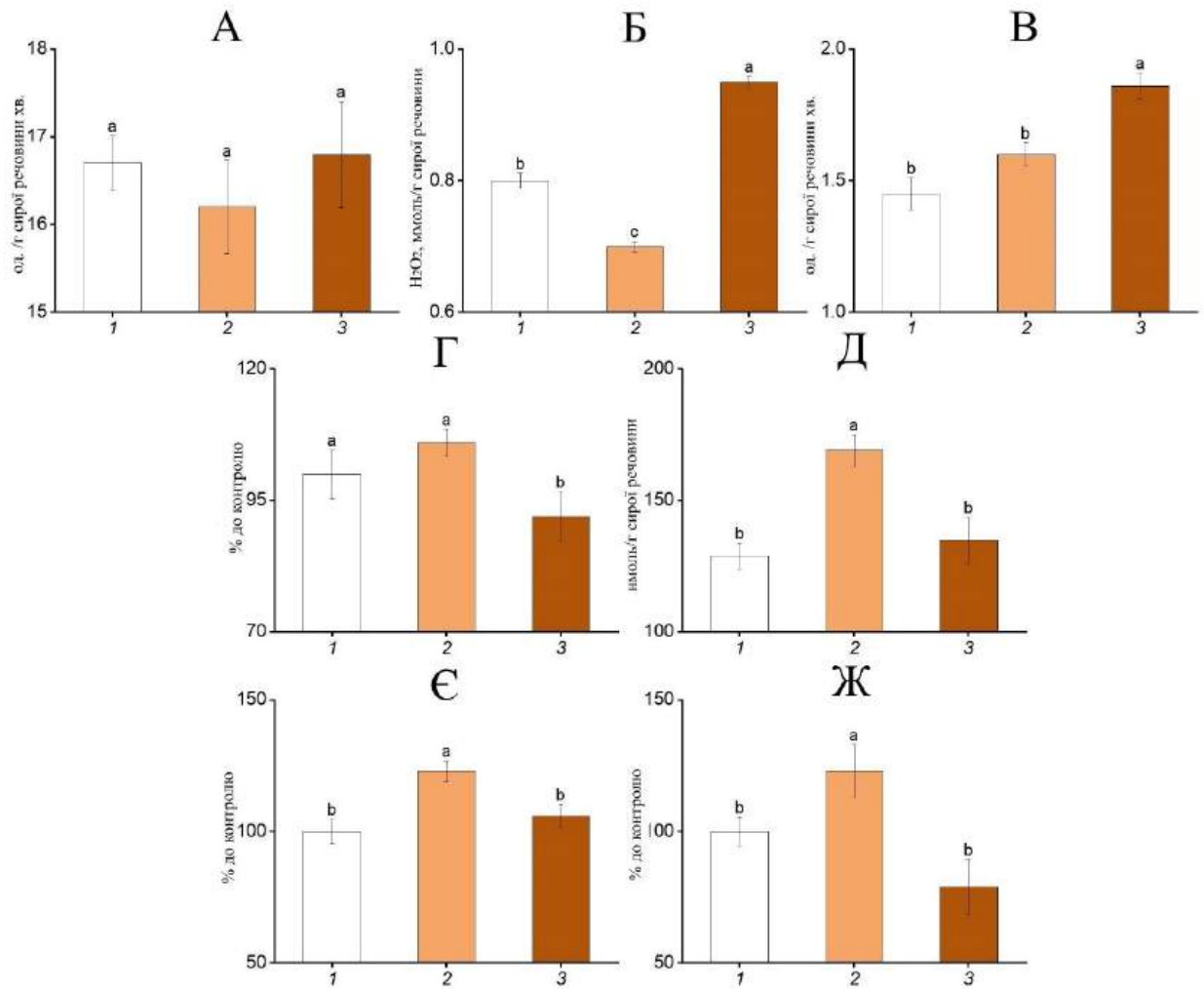


Рис. 4.3. Активність СОД (А), каталази (Б), гваяколпероксидази (В), генерація супероксид-аніон радикала (Г), вміст пероксиду водню (Д), МДА (Є) у коренях проростків та вивільнення з них речовин, що поглинають УФ-В (Ж), через 3 години після 10-хвилинного прогрівання при 45°C.

Примітка. Різними літерами позначені величини, відмінності між якими суттєві при $p \leq 0,05$.

4.1.4. Вміст пероксиду водню та активність антиоксидантних ферментів у коренях проростків пшениці при їх обробці антагоністами АФК і кальцію у поєднанні з мелатоніном. Для з'ясування участі АФК та іонів кальцію у реалізації стрес-протекторної дії мелатоніну проростки перед обробкою мелатоніном піддавали впливу скавенджера пероксиду водню ДМТС, інгібітору НАДФН-оксидази імідазолу або антагоністів кальцію – ЕГТА та неоміцину. Вміст пероксиду водню у коренях у цій серії

експериментів визначали через 1 годину після початку впливу мелатоніну, коли відзначалося максимальне підвищення кількості H_2O_2 (див. рис. 4.1, Б).

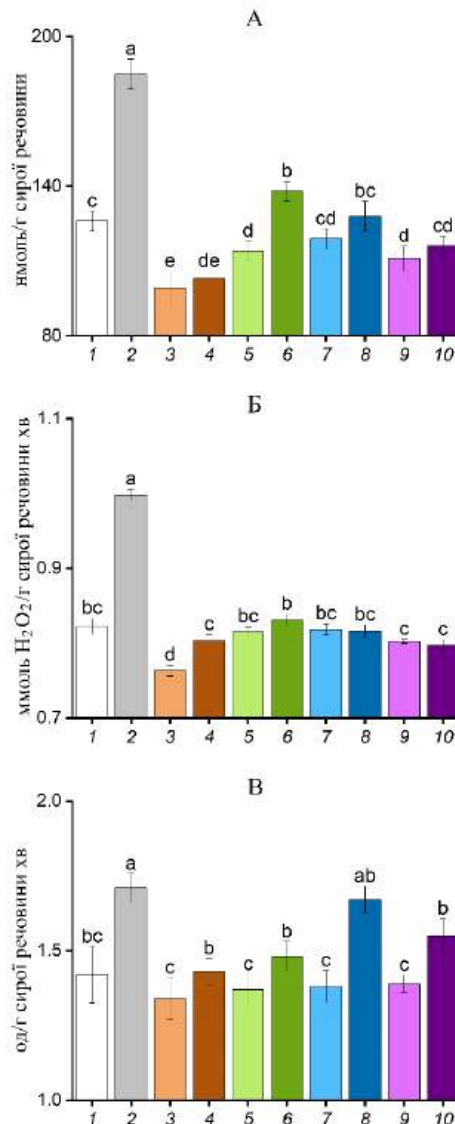


Рис. 4.4. Вміст пероксиду водню (А), активність каталази (Б) і гваяколпероксидази (В) за дії мелатоніну у комбінації з антагоністами АФК і кальцію. 1 – контроль; 2 – мелатонін (1 мкМ); 3 – ДМТС (150 мкМ); 4 – мелатонін (1 мкМ) + ДМТС (150 мкМ); 5 – імідазол (10 мкМ); 6 – мелатонін (1 мкМ) + імідазол (10 мкМ); 7 – ЕГТА (500 мкМ); 8 – мелатонін (1 мкМ) + ЕГТА (500 мкМ); 9 – неоміцин (200 мкМ); 10 – мелатонін (1 мкМ) + неоміцин (200 мкМ). Примітки. Вміст пероксиду водню визначали через 1 год після початку впливу мелатоніну або через 3 год після початку впливу АФК та антагоністів кальцію; активності каталази та гваяколпероксидази визначали через 4 години після початку впливу мелатоніну або через 6 годин після початку впливу антагоністів АФК і кальцію. Різними літерами позначені величини, відмінності між якими суттєві при $p \leq 0,05$.

Обробка проростків ДМТС сама по собі викликала зниження вмісту пероксиду водню в коренях (рис. 4.4, А). При цьому вона повністю усувала прояв ефекту підвищення вмісту пероксиду водню, спричинюваний мелатоніном. Інгібітор НАДФН-оксидази імідазол також викликав деяке зниження вмісту пероксиду водню в коренях, при цьому він значною мірою нівелював підвищення вмісту H_2O_2 , зумовлене дією мелатоніну.

При обробці хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА вміст пероксиду водню в коренях істотно не змінювався (рис. 4.4, А). Однак цей антагоніст надходження кальцію в цитозоль повністю усував ефект підвищення вмісту пероксиду водню в коренях, спричинюване обробкою мелатоніном. Інгібітор фосфоліпази С неоміцин, що обмежує надходження кальцію в цитозоль із внутрішньоклітинних компартментів, викликав деяке зниження вмісту пероксиду водню в коренях (рис. 4.4, А). При комбінованій дії неоміцину та мелатоніну вплив останнього на вміст пероксиду водню в коренях повністю усувався.

Антагоністи АФК та кальцію також змінювали вплив мелатоніну на активність антиоксидантних ферментів. Так, обробка проростків ДМТС знижувала активність каталази в коренях і повністю усувала підвищення активності цього ферменту, спричинюване дією мелатоніну (рис. 4.4, Б). Обробка імідазолом сама по собі істотно не впливала на активність каталази в коренях проростків, проте нівелювала ефект підвищення активності ферменту, спричинений мелатоніном.

Два різні антагоністи надходження кальцію в цитозоль – ЕГТА і неоміцин – самі по собі істотно не впливали на активність каталази, однак повністю усували підвищення активності ферменту в коренях проростків, спричинюване мелатоніном (рис. 4.4, Б).

Активність гваяколпероксидази при обробці проростків ДМТС не змінювалася (рис. 4.4, В). Однак при поєднаній дії ДМТС та мелатоніну активуючий вплив мелатоніну на фермент не виявлявся. Інгібітор НАДФН-

оксидази також істотно не впливав на активність гваяколпероксидази в коренях проростків пшениці, проте усував підвищення активності ферменту, спричинюване мелатоніном.

Антагоністи кальцію – ЕГТА та неоміцин – суттєво не змінювали активність гваяколпероксидази. При цьому обробка коренів неоміцином суттєво знижувала ефект підвищення активності гваяколпероксидази, спричинений мелатоніном, а вплив ЕГТА викликав тенденцію до зменшення активуючої дії мелатоніну (рис. 4.4, В).

4.1.5. Виживаність проростків пшениці після теплового стресу при їх обробці антагоністами АФК та кальцію у поєднанні з мелатоніном.

Обробка проростків ДМТС суттєво не впливала на теплостійкість проростків пшениці (рис. 4.5). У той же час цей скавенджер пероксиду водню усував позитивний вплив мелатоніну на виживаність проростків пшениці після нагріву. При обробці проростків імідазолом їх теплостійкість не змінювалася, при цьому даний інгібітор НАДФН-оксидази нівелював ефект підвищення теплостійкості проростків, викликаний дією мелатоніну.

Обробка проростків антагоністами надходження кальцію в цитозоль – ЕГТА і неоміцином – істотно не позначалася на теплостійкості проростків пшениці. Однак у присутності обох цих сполук вплив мелатоніну на виживаність проростків після стресу не виявлявся (рис. 4.5).

4.1.6. Можливі механізми стрес-протекторного впливу мелатоніну на проростки пшениці за умов теплового стресу.

Як зазначалося, мелатонін є досить потужним антиоксидантом прямої дії. Повідомляється, що одна молекула мелатоніну здатна зв'язувати до 10 вільних радикалів, що може бути вищим за ефективність дії СОД (Ye et al., 2016). Також є відомості, що антиоксидантна активність мелатоніну вища, ніж у аскорбінової кислоти, глутатіону, НАДФН та токоферолу (Yu et al., 2018). Високий вміст ендogenous мелатоніну рослин дозволяє вважати внесок прямої антиоксидантної дії вельми значним (Ahammed et al., 2019).

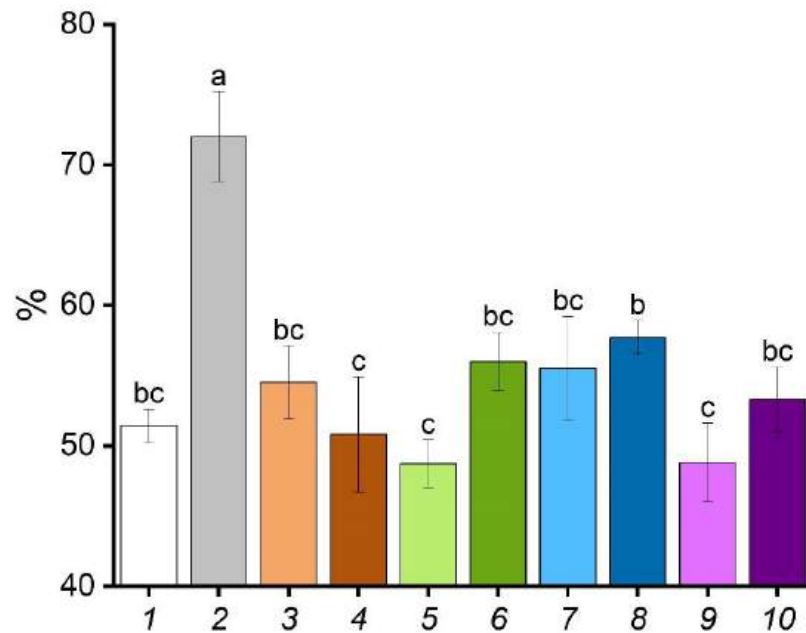


Рис. 4.5. Вживаність проростків пшениці після теплового стресу (45°C, 10 хв) при обробці мелатоніном у поєднанні з антагоністами АФК та кальцію. 1 – контроль; 2 – мелатонін (1 мкМ); 3 – ДМТС (150 мкМ); 4 – мелатонін (1 мкМ) + ДМТС (150 мкМ); 5 – імідазол (10 мкМ); 6 – мелатонін (1 мкМ) + імідазол (10 мкМ); 7 – ДМТС (500 мкМ); 8 – мелатонін (1 мкМ) + ДМТС (500 мкМ); 9 – неоміцин (200 мкМ); 10 – мелатонін (1 мкМ) + неоміцин (200 мкМ). Примітка. Різними літерами позначені величини, відмінності між якими суттєві при $p \leq 0,05$.

Отримані нами результати показують, що мелатонін може мати непряму антиоксидантну дію, зокрема шляхом впливу на активність антиоксидантних ферментів. Так, однією з причин зниження вмісту пероксиду водню в тканинах при дії мелатоніну може бути підвищення активності каталази та гваяколпероксидази, які є основними ферментами, що знешкоджують пероксид водню (Gill, Tuteja, 2010; Kolupaev et al., 2019). Активність цих ферментів у варіанті з обробкою проростків мелатоніном, особливо в період після стресу, виявилася значно вищою, ніж у контролі (рис. 4.2, 4.3).

У роботі Buttar та ін. (2020) під впливом мелатоніну підвищення активності та експресії генів каталази, пероксидази та СОД зареєстровано у дорослих рослин пшениці при тривалій дії теплового стресу. Ефект підвищення обробкою мелатоніном активності гваяколпероксидази та каталази в умовах дії теплового стресу виявлено також у рослин кукурудзи (Li et al., 2019) та сої (Awan et al., 2023).

У той же час нам не вдалося зафіксувати зміни активності ключового антиоксидантного ферменту СОД при обробці проростків мелатоніном, як за відсутності стресу, так і після ушкоджувального прогріву (рис. 4.2, 4.3). Проте у варіанті з мелатоніном у коренях проростків відзначалося зниження генерації супероксидного радикала у період після стресу. Слід зазначити, що схожі феномени спостерігалися і у рослин арабідопсису, оброблених мелатоніном, і підданих дії УФ-В (Haskirli et al., 2021). У цій роботі при обробці мелатоніном спостерігали зниження генерації АФК за відсутності підвищення активності ключових антиоксидантних ферментів – СОД, каталази, неспецифічної пероксидази та аскорбатпероксидази. На думку авторів, однією з причин такого феномену може бути підвищення під впливом мелатоніну активності альтернативної оксидази та, як наслідок, зменшення утворення АФК у мітохондріях. Нами не досліджувалась активність альтернативної оксидази, проте ймовірний вплив мелатоніну на активність цього ферменту у етіюльованих проростків може мати істотний внесок у зменшення генерації АФК, оскільки в етіюльованих об'єктах мітохондрії вважаються одним з головних джерел АФК (Rhoads et al., 2006).

Припускають, що при тепловому стресі саме зменшення окиснювальних пошкоджень, яке досягається за рахунок прямої та (переважно) непрямой антиоксидантної дії мелатоніну, є важливим фактором підвищення стійкості рослин (Hassan et al., 2022). Однак цілком природно, що пом'якшення прояву окиснювального стресу далеко не єдина причина його захисного впливу на рослини, що піддаються дії високих температур. Так, з використанням методів протеоміки показано, що у рослин томату мелатонін сприяє захисту

клітинних білків шляхом індукції БТШ та процесу аутофагії для рефолдингу або деградації денатурованих білків при тепловому стресі (Xu et al., 2016). У рослин пшениці в умовах посухи виявлено посилення експресії генів ліпоксигеназ та ферментів синтезу жасмонової кислоти, а також активація генів ферментів синтезу лігніну, що зміцнює клітинні оболонки (Luo et al., 2023). Крім того, на прикладі пшениці виявлено, що екзогенний мелатонін за участю H_2S як сигнального посередника сприяв активації вуглеводного обміну і пом'якшував інгібування фотосинтезу, спричинюване тепловим стресом (Iqbal et al., 2021).

Цілком ймовірно, фізіологічні ефекти мелатоніну реалізуються за участю багатьох компонентів загальної клітинної сигнальної мережі. У даний час отримані дані, що вказують на залучення до реалізації дії мелатоніну таких посередників як оксид азоту, сірководень, АФК та іони кальцію (Gu et al., 2022). Однак функціональні зв'язки між цими посередниками, їхній внесок у прояв конкретних ефектів мелатоніну залишаються маловивченими. Нами отримані дані, що свідчать про роль кальцію та АФК в індукуванні мелатоніном теплостійкості проростків пшениці та захисту від окиснювальних ушкоджень. Відомо, що завдяки зміні вмісту АФК (насамперед пероксиду водню) формуються сигнали, необхідні активації експресії генів антиоксидантних ферментів та інших систем захисту від окиснювального стресу (Kolupaev et al., 2019). Однак формування такого сигналу, ймовірно, супроводжується зміною кальцієвого гомеостазу (Demidchik et al., 2007).

В умовах наших експериментів обробка мелатоніном спричиняла транзиторне підвищення генерації супероксидного аніон-радикала та вмісту пероксиду водню в коренях проростків (рис. 4.1). Ймовірно, цей ефект є наслідком підвищення активності та/або експресії генів НАДФН-оксидази, оскільки він усувався при обробці проростків інгібітором ферменту імідазолом (рис. 4.4, А). Як уже зазначалося, під впливом мелатоніну ефект підвищення активності НАДФН-оксидази та формування за рахунок цього

АФК сигналу, необхідного для активації експресії генів БТШ та деяких антиоксидантних ферментів, зафіксовано у рослин томату (Gong et al., 2017). У роботі Gong та ін. (2017) також одержано дані про роль денітрозилювання каталітичної субодиниці НАДФН-оксидази у томатів у регуляції її активності під впливом мелатоніну, який здатний зв'язувати оксид азоту. Інший механізм посилення генерації АФК рослинами під дією мелатоніну запропонований нещодавно у роботі Lee та співавт. (2021).

На думку авторів, такий ефект пов'язаний з дією не самого мелатоніну, а продукту його окиснення 2-гідроксимелатоніну. Обробка листків тютюну та арабідопсису 2-гідроксимелатоніном спричиняла значно більше посилення генерації супероксидного аніон-радикала порівняно з обробкою мелатоніном. У той же час розглядати перетворення мелатоніну на 2-гідроксимелатонін як причину посилення генерації АФК клітинами коренів проростків пшениці в умовах наших експериментів поки що можна лише гіпотетично. На порядок нижча концентрація мелатоніну і швидкий прояв ефекту екзогенного мелатоніну на генерацію АФК можуть бути приводом для сумніву в опосередкованому перетворенням на 2-гідроксимелатонін впливі мелатоніну на генерацію АФК коренями проростків пшениці.

Ще однією ймовірною складовою підвищення активності НАДФН-оксидази при обробці рослин мелатоніном може бути її активація іонами кальцію, надходження яких у цитозоль посилюється під дією мелатоніну. Зокрема, такий ефект виявлений у рослин ячменю за умов сольового стресу (Tian et al., 2022). У наших експериментах показано усунення накопичення пероксиду водню в клітинах коренів пшениці антагоністами кальцію, що вказує на залучення цитозольного кальцію як посередника до цього процесу (рис. 4.4, А). Примітно, що активація накопичення пероксиду водню за дії мелатоніну не виявлялася у разі обробки проростків як хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА, так і інгібітором фосфоліпази С, що бере участь у утворенні інозитол-1,4,5-фосфату і тим самим у відкритті внутрішньоклітинних кальцієвих каналів. Також ЕГТА та неоміцин усували

позитивний вплив мелатоніну на виживаність проростків пшениці після теплового стресу (рис. 4.5) та ефект підвищення активності каталази та гваяколпероксидази (рис. 4.4, В, С).

У огляді Khan et al. (2023) запропонована модель, що включає кілька можливих механізмів впливу мелатоніну на кальцієвий гомеостаз. З урахуванням отриманих нещодавно доказів локалізації рецептора мелатоніну CAND2/PMTR1 у плазматичній мембрані припускають, що його зв'язування з G-білком призводить до відкривання кальцієвих каналів, регульованих α -субодиницею гетеротримерного G-білка. Такий ефект може призводити до активації НАДФН-оксидази та посилення генерації АФК. Показано роль цього сигнального механізму в індукованому мелатоніном закриванні продихів (Wei et al., 2018). Також розглядається можливе значення зумовленого мелатоніном накопичення інозитол-1,4,5-фосфату у відкриванні внутрішньоклітинних кальцієвих каналів при адаптації рослин до сольового стресу (Khan et al. 2023). Примітно, що в наших експериментах інгібітор фосфоліпази С неоміцин усував практично всі вивчені ефекти мелатоніну: його вплив на генерацію АФК у клітинах коренів пшениці, активацію антиоксидантних ферментів та розвиток теплостійкості (рис. 4.4, 4.5). Безумовно, що для однозначного висновку про роль кальцієвих каналів, регульованих інозитол-1,4,5-фосфатом, в індукуванні теплостійкості проростків пшениці мелатоніном необхідні прямі дослідження активності фосфоліпази С, вмісту інозитол-1,4,5-фосфату і цитозольного кальцію. Однак дані інгібіторного аналізу вказують на необхідність спеціальних досліджень у цьому напрямі.

Ймовірно, що важливе значення у прояві стрес-протекторної дії мелатоніну має і надходження кальцію в цитозоль із позаклітинного простору. У наших дослідженнях на це вказує значне нівелювання впливу екзогенного мелатоніну на про-/антиоксидатну систему та теплостійкість проростків пшениці в присутності хелатора позаклітинного кальцію ЕГТА (рис. 4.4, 4.5). У літературі є відомості щодо усунення ЕГТА протекторного

впливу мелатоніну на рослини соняшника при сольовому стресі (Mukherjee et al., 2023). Як уже зазначалося, отримано дані і про роль кальцію в регуляції мелатоніном відповіді рослин кавуна на холодний стрес, зокрема, встановлено участь іонних каналів, керованих циклічними нуклеотидами (C1CNGC2), в активації специфічного для холодової адаптації транскрипційного фактора C-REPEAT BINDING FACTOR (CBF). Примітно, що C1CNGC2 задіяні в активації CBF не тільки за впливу екзогенного мелатоніну, а й пероксиду водню. Автори вважають, що індукування холодостійкості відбувається при активації мелатоніном НАДФН-оксидази та кальцієвого сигналіngu (Chang et al., 2021). Таким чином, ймовірно, що мелатонін прямо або опосередковано впливає на різні типи кальцієвих каналів і сприяє надходженню кальцію в цитозоль з різних компартментів. За даними транскриптомного аналізу рослин арабідопсису ідентифіковано активацію мелатоніном експресії щонайменше 14 генів, задіяних у кальцієвому сигналіngu (Weeda et al., 2014). Таким чином, є підстави вважати, що при абіотичних стресах, у тому числі при тепловому, ефекти мелатоніну реалізуються за участю кальцієвих каналів різних типів і включають в себе функціональну взаємодію кальцію з АФК.

4.2. Вплив праймінгу мелатоніном зернівок пшениці і жита на функціонування стрес-протекторних систем за дії високих температур

На даний час на рослинах різних видів зафіксовані протекторні ефекти мелатоніну за умов таких класичних стресів як посуха, засолення, екстремальні температури (Cui et al, 2018; Chang et al, 2021; Nawaz et al, 2021). При цьому, однак, поки що практично відсутні порівняльні дослідження впливу мелатоніну на рослини з різними адаптивними стратегіями, а для окремих культурних рослин стосовно ефектів мелатоніну не отримано навіть феноменологічних даних. Так, в літературі повністю відсутні дані про можливу стрес-протекторну дію мелатоніну на рослини жита, що вирізняються від інших культурних злаків вищою стійкістю до

низьких і високих температур (Koster, Linch, 1992; Kolupaev et al, 2015; 2022; Romanenko et al, 2022), а також до дії прямих агентів окиснювального стресу (Kolupaev et al, 2016).

Зважаючи на це, як модельний об'єкт для частини досліджень стрес-протекторних ефектів мелатоніну використовували етіюльовані проростки пшениці і жита. Відомо, що жито, принаймні на стадії проростків, відрізняється від пшениці більш збалансованою роботою антиоксидантної системи і стійкістю до окиснювального стресу, спричинюваного різними агентами (Kolupaev et al, 2016). У зв'язку з викладеним завдання полягало у порівнянні впливу обробки зернівок мелатоніном на стійкість проростків двох видів злаків до високої температури та функціонування ключових клітинних захисних систем – антиоксидантної та осмопротекторної.

Під впливом високих температур у проростках пшениці та жита відзначалося суттєве підвищення рівня генерації супероксидного аніон-радикала. Зокрема, його продукція у пагонах збільшувалася у 2,50–2,65 рази порівняно з контрольними умовами (рис. 4.6, а). Така інтенсифікація утворення активних форм кисню (АФК) є типовою реакцією рослин на тепловий стрес і може спричинювати окиснювальні пошкодження клітинних структур. Обробка насіння мелатоніном перед пророщуванням зменшувала цей ефект у проростках обох видів злаків, що свідчить про антиоксидантну дію цієї сполуки та її здатність до зниження рівня окиснювального стресу.

Підвищена температура також спричиняла накопичення пероксиду водню у тканинах проростків, що є характерною ознакою активації окиснювального стресу. У пагонах пшениці вміст H_2O_2 зростав приблизно на 33% порівняно з контролем, тоді як у проростках жита цей ефект був менш вираженим (рис. 4.6, б). Попередня обробка мелатоніном значною мірою знижувала індуковане нагрівом накопичення пероксиду водню в проростках пшениці, майже повністю нормалізуючи його рівень. У проростках жита також відзначалася тенденція до зменшення вмісту H_2O_2 під впливом

мелатоніну, хоча ці зміни не були настільки вираженими, як у пшениці (рис. 4.6, б).

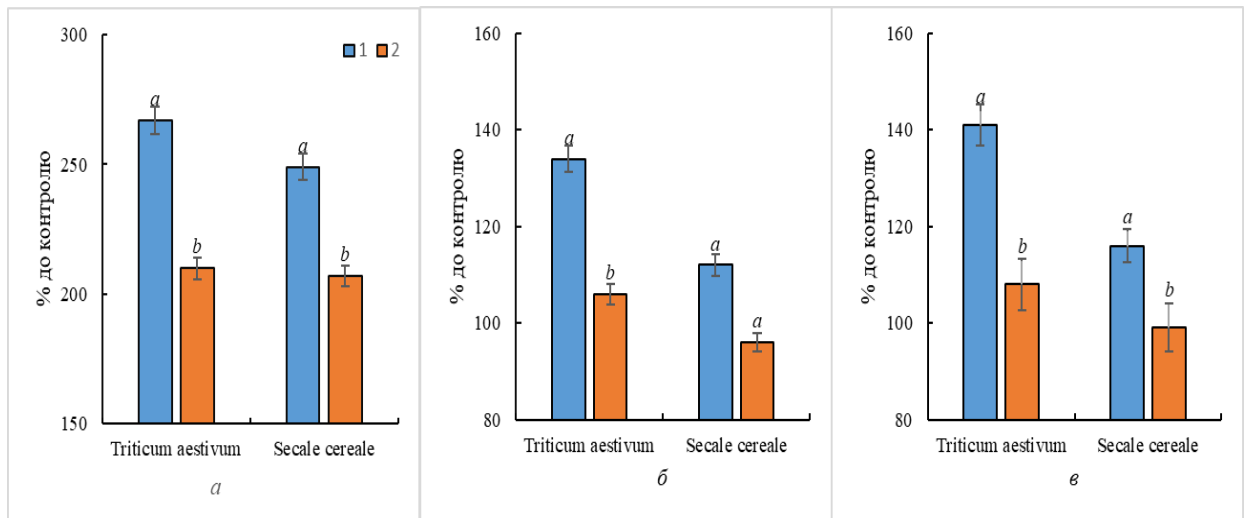


Рис. 4.6. Генерація супероксидного аніон-радикала (а – % до контролю), вміст перексиду водню (б – % до контролю) і вміст МДА (в – % до контролю) у пагонах проростків пшениці і жита. 1 – тепловий стрес (44°C, 6 год); 2 – тепловий стрес + мелатонін (50 мкМ). Примітка. Різними літерами позначені величини, відмінності між якими суттєві при $p \leq 0,05$.

Під впливом високої температури вміст МДА, який є маркером пероксидного окиснення ліпідів, значно зростав у пагонах проростків пшениці, що свідчить про посилення мембранних пошкоджень внаслідок окиснювального стресу (рис. 4.6, в). У проростках жита цей ефект був менш вираженим, і рівень МДА підвищувався незначною мірою. Обробка насіння мелатоніном сприяла зниженню накопичення продуктів пероксидного окиснення ліпідів у стресових умовах. У проростках пшениці вміст МДА зменшувався майже до контрольних значень, що свідчить про потужний захисний ефект мелатоніну. Аналогічна тенденція спостерігалася і у жита, хоча зниження рівня МДА під впливом мелатоніну було менш вираженим (рис.4.6, в).

За теплового стресу активність каталази у пагонах проростків пшениці значно знижувалася, що може вказувати на порушення функціонування антиоксидантної системи внаслідок теплового стресу (рис. 4.6, а). Водночас у

проростків жита істотних змін цього показника не спостерігалось, що свідчить про його відносно стабільну активність у відповідь на дію підвищених температур. Передпосівна обробка насіння мелатоніном сприяла адаптації проростків до стресових умов: у пагонах пшениці активність каталази значно зростала, перевищуючи стресовий варіант приблизно у 1,6 раза. Це вказує на те, що мелатонін активував антиоксидантні механізми, що сприяли ефективнішій детоксикації пероксиду водню. У проростків жита також відзначалося підвищення активності каталази під впливом мелатоніну, проте цей ефект був менш вираженим, що може бути пов'язано з початково вищою толерантністю цього виду до теплового стресу (рис. 4.7, а).

Щодо активності гваяколпероксидази, її реакція на тепловий стрес мала відмінності залежно від виду рослин. У пагонах проростків пшениці цей фермент проявляв тенденцію до зниження активності, що може бути наслідком температурно-індукованого дисбалансу в антиоксидантній системі. Водночас у проростків жита активність гваяколпероксидази після дії високої температури мала незначну тенденцію до підвищення, хоча цей ефект не був статистично вірогідним при $p \leq 0,05$ (рис. 4.7, б).

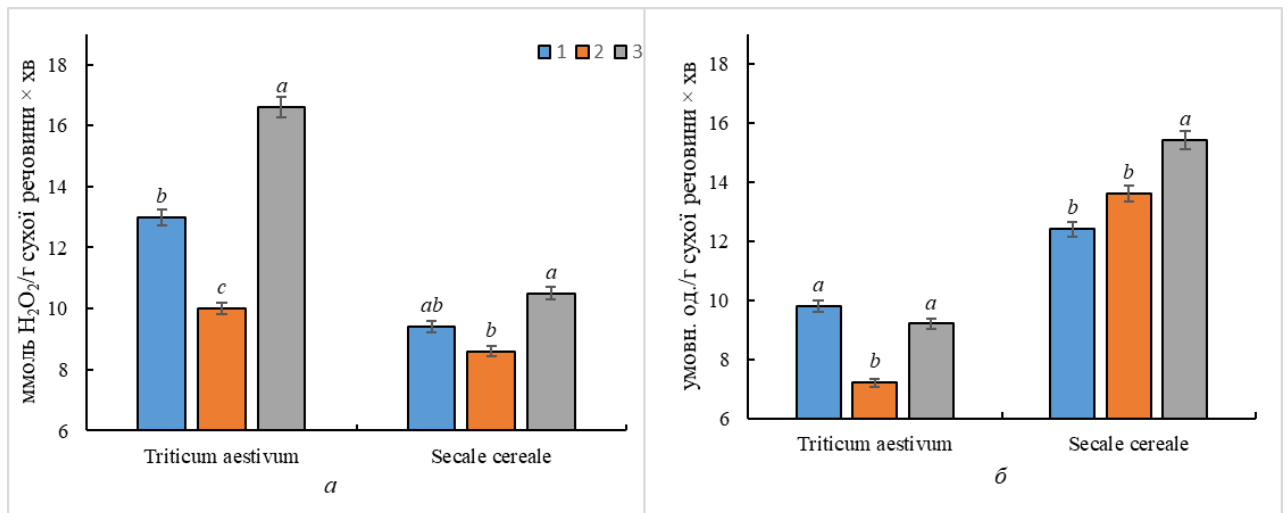


Рис. 4.7. Активність каталази (а – ммоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{г}$ сухої речовини $\times$ хв) і пероксидази (б – умовн. од./г сухої речовини $\times$ хв) ферментів у пагонах проростків пшениці і жита. 1 – контроль; 2 – тепловий стрес (44°C , 6 год); 3 – тепловий стрес + мелатонін (50 мкМ). Примітка. Різними літерами позначені величини, відмінності між якими суттєві при $p \leq 0,05$.

Попередня обробка мелатоніном впливала на активність ензиму по-різному у двох досліджуваних видів. У проростків пшениці спостерігалася її стабілізація – повернення активності гваяколпероксидази до рівня контрольного варіанта, що вказує на регуляторну роль мелатоніну в підтриманні антиоксидантного захисту (рис. 4.7, б). У жита, навпаки, мелатонін сприяв вірогідному підвищенню активності ферменту як порівняно з контролем, так і з варіантом теплового стресу, що свідчить про його можливу роль у посиленні адаптивної відповіді на високі температури.

Тепловий стрес спричиняв певні зміни у вуглеводному обміні проростків досліджуваних злакових культур, що проявлялося у видоспецифічних змінах вмісту розчинних вуглеводів. У пагонах проростків пшениці за дії високої температури відзначалося деяке зниження вмісту цукрів, хоча цей ефект не був статистично вірогідним при $p \leq 0,05$, а лише проявлявся на рівні тенденції (рис. 4.8, а). Такий результат може свідчити про посилене використання цукрів як джерела енергії або структурних компонентів для підтримання життєдіяльності клітин в умовах стресу. Водночас у проростках жита після теплового стресу спостерігалася незначне збільшення вмісту розчинних вуглеводів, що може бути наслідком більш ефективного функціонування механізмів їхнього синтезу або менш інтенсивного їх використання у відповідь на дію високих температур (рис. 4.8, а).

Попередня обробка насіння мелатоніном сприяла значному підвищенню вмісту розчинних вуглеводів у пагонах обох видів за умов теплового стресу. Це може свідчити про важливу роль мелатоніну в підтриманні енергетичного балансу клітин. Оскільки розчинні цукри можуть відігравати не лише роль джерела енергії, а й функціонувати як осмопротектори, їх підвищений вміст у проростках, оброблених мелатоніном, може бути одним із механізмів, що сприяють розвитку теплостійкості рослин.

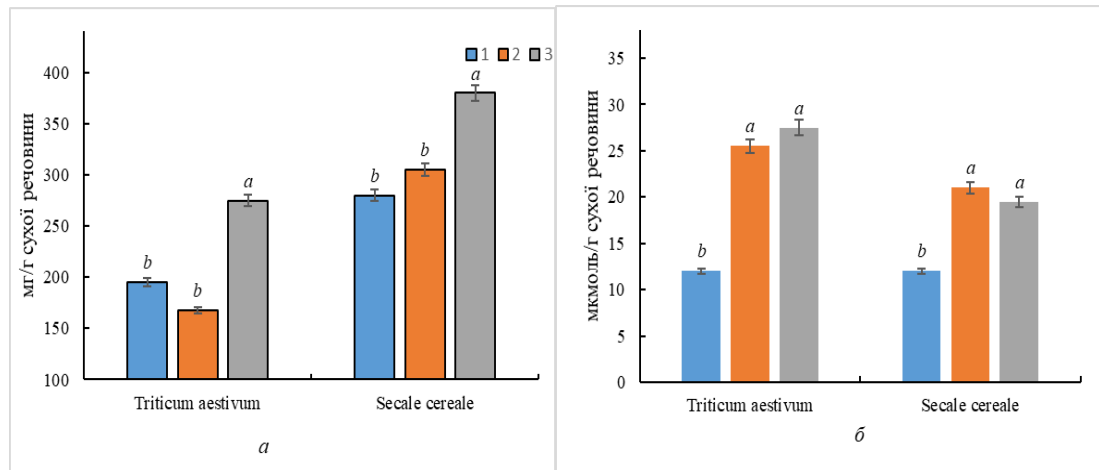


Рис. 4.8. Вміст розчинних вуглеводів (а – мг/г сухої речовини) і проліну (б – мкмоль/г сухої речовини) у пагонах проростків пшениці і жита. 1 – контроль; 2 – тепловий стрес (44°C, 6 год); 3 – тепловий стрес + мелатонін (50 мкМ). Примітка. Різними літерами позначені величини, відмінності між якими суттєві при $p \leq 0,05$.

Під впливом високої температури у пагонах проростків пшениці спостерігалось значне підвищення вмісту проліну, який є одним із ключових осмопротекторних і стрес-захисних метаболітів (рис. 4.8, б). У жита нагрів також викликав накопичення проліну, хоча цей ефект був менш вираженим порівняно з пшеницею. Водночас базовий рівень проліну у жита до дії стресу був дещо вищим, що може свідчити про кращу здатність цього виду до підтримання осмотичного гомеостазу за нормальних умов (рис. 4.8, б).

Попередня обробка зернівок мелатоніном не спричиняла вірогідних змін у вмісті проліну у пагонах проростків обох видів злаків. Це може вказувати на те, що захисна дія мелатоніну за теплового стресу була зумовлена іншими механізмами, такими як активація антиоксидантної системи або регуляція вуглеводного обміну, а не прямим впливом на синтез проліну.

Підвищення теплостійкості за дії екзогенного мелатоніну показано на прикладі ряду рослин з різною таксономічною приналежністю, зокрема, томатів (Xu et al, 2016), райграсу (Zhang et al, 2017), костриці (*Festuca altissima*) (Alam et al, 2018). Нещодавно у двох роботах було досліджено вплив фоліарних обробок мелатоніном на теплостійкість дорослих зелених

рослин пшениці (Buttar et al, 2020; Iqbal et al, 2021). При цьому відзначено, що екзогенний мелатонін пом'якшував ефект інгібування росту, спричинюваний нагрівом, сприяв збереженню пулу хлорофілу і активності рибулозобісфосфаткарбоксилази (Iqbal et al, 2021). Водночас за дії мелатоніну зменшувались прояви окиснювальних пошкоджень, зростала активність супероксиддисмутази (СОД), каталази, аскорбатпероксидази і глутатіонредуктази. Також встановлено посилення мелатоніном експресії відповідних генів антиоксидантних ферментів – *TaCAT*, *TaSOD*, *TaPOD* (Buttar et al, 2020).

У нашій роботі вперше зафіксовано позитивний вплив обробки насіння на теплостійкість пшениці на ранній фазі розвитку. Слід зазначити, що нещодавно було показано посилення проростання зернівок пшениці при низьких температурах за їх обробки мелатоніном, при цьому у проростках підвищувалася активність антиоксидантних ферментів (Zhang et al, 2021). Також виявлено позитивний вплив обробки насіння пшениці мелатоніном на стан антиоксидантної системи і ріст проростків пшениці за токсичної дії хрому (Lei et al, 2021). Однією зі складових стрес-протекторного впливу екзогенного мелатоніну за умов теплового стресу так само є нормалізація про-/антиоксидантного балансу, що виявлялося у зменшенні в стресових умовах показників окиснювальних пошкоджень клітин проростків за одночасного підвищення активності каталази і гваяколпероксидази (рис. 3, 4). У нашій роботі не досліджувалася експресія генів і активність СОД, проте зменшення генерації супероксидного радикала при тепловому стресі у проростків, вирощених із зернівок, оброблених мелатоніном, може вказувати на активацію цього ферменту (рис. 3, а).

Іншою важливою складовою підвищення теплостійкості проростків пшениці мелатоніном, ймовірно, є посилення накопичення в проростках розчинних вуглеводів (рис. 5, а), які за гіпертермії можуть виконувати мембранопротекторні, антиденатураційні, осмопротекторні, антиоксидантні і сигнальні функції (Yatsyshyn et al, 2017; Kolupaev et al, 2023). Посилення

синтезу сахарози та інших розчинних вуглеводів показано і у дорослих рослин пшениці при гіпертермії за їх попередньої фоліарної обробки мелатоніном (Iqbal et al, 2021).

Ще одним мультифункціональним стресовим метаболітом, задіяним в адаптації рослин до теплового стресу, є пролін (Iqbal et al, 2019). У роботі Buttar і співавт. (2020) показано зниження вмісту проліну у листках дорослих рослин пшениці після 6-годинного впливу на них температури 42°C і його підвищення за попередньої обробки мелатоніном. У наших дослідженнях вміст проліну в етіюльованих проростках пшениці після подібного температурного впливу істотно підвищувався (рис. 5, б). При цьому обробка мелатоніном практично не впливала на цей показник. Можна припустити, що метаболізм проліну у рослин пшениці як за гіпертермії, так і за дії мелатоніну залежить від фази їх розвитку. Як уже зазначалося, дані про вплив екзогенного мелатоніну на вміст проліну у рослин різних видів неоднозначні: є відомості як про посилення, так і про зниження його накопичення за стресових умов (Antoniou et al, 2017; Zhang et al, 2021). Такі суперечності можуть бути зумовлені різним рівнем стресового навантаження на рослини і неоднаковим станом їх антиоксидантної системи в цілому. Відомо, що процеси генерації АФК і накопичення проліну функціонально взаємопов'язані (Signorelli et al, 2014). В умовах наших експериментів обробка мелатоніном помітно знижувала генерацію АФК і накопичення продуктів ПОЛ в проростках злаків за умов теплового стресу (рис. 3.3). При цьому відзначалася активація антиоксидантних ферментів та посилення накопичення цукрів. Ймовірно, підтримання рослинами, вирощеними з насіння, обробленого мелатоніном, про-/антиоксидантного балансу не створювало передумов для додаткового посилення накопичення проліну, який досить часто накопичується у рослин за жорстких стресових умов.

У нашій роботі порівнювався вплив обробки мелатоніном на теплостійкість проростків пшениці і жита. Як уже зазначалося, жито, принаймні на стадії проростків, виявляє вищу порівняно з пшеницею

стійкість до окиснювального стресу (Kolupaev et al, 2022), що може бути пов'язане з особливостями функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем. Зокрема, для проростків жита, на відміну від інших злаків, характерна набагато вища активність неспецифічної пероксидази, високий базовий вміст вторинних метаболітів, а також підвищений конститутивний вміст проліну, розчинних вуглеводів і, ймовірно, інших осмолітів (Kolupaev et al, 2022). За умов наших експериментів показано, що обробка зернівок жита мелатоніном спричиняла зменшення рістінгібуючого впливу теплового стресу на проростки (рис. 3.2), однак цей ефект був менш помітним, ніж виявлений у рослин пшениці. При цьому важливо, що в контролі проростки жита виявляли вищу теплостійкість, ніж проростки пшениці. У проростків жита, на відміну від проростків пшениці, за стресових умов показники водного балансу зберігалися майже на рівні контролю і вплив на них мелатоніну був невиразним (рис. 3.3). Натомість у проростків пшениці обробка мелатоніном сприяла збереженню вмісту води, близького до контролю. Ймовірно, причиною таких відмінностей є вищий базовий вміст осмолітів у проростків жита (Kolupaev et al, 2015). Також у проростків жита за умов теплового стресу не проявлялися помітні ознаки розвитку окиснювального стресу: вміст пероксиду водню і МДА зростав незначною мірою (рис. 3). Водночас обробка мелатоніном і у цьому випадку підсилювала функціонування окремих компонентів клітинних протекторних систем, спричиняючи зростання активності каталази, гваяколпероксидази і вмісту цукрів у проростків жита (рис. 4, 5).

Як зазначалося, мелатонін серед інших має властивості потужного антиоксиданту (Arnao, Hernandez-Ruiz, 2015). Цим, принаймні частково, деякі автори пояснюють його стрес протекторну дію. Водночас ефекти, спричинювані обробкою насіння мелатоніном, навряд чи можна пояснити його прямою антиоксидантною дією, оскільки вони пролонговані в часі і виявлялися щонайменше впродовж кількох діб після обробки. Проте можна припустити, що виявлені ефекти мелатоніну зумовлені активацією сигнальної

мережі, одним з компонентів якої є АФК. Так, у томатів виявлено підвищення активності НАДФН-оксидази і вмісту H_2O_2 за обробки мелатоніном (Gong et al, 2017). При цьому інгібітор НАДФН-оксидази дифеніленіодоніум усував підвищення стійкості рослин до теплового і осмотичного стресів, спричинюване мелатоніном. Як уже зазначалося, в наших експериментах обробка проростків скавенджером пероксиду водню ДМТС або інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом усувала як спричинюване мелатоніном посилення генерації пероксиду водню, так і розвиток теплостійкості проростків пшениці, що вказує на роль АФК в реалізації стрес-протекторної дії мелатоніну. Цілком ймовірно, що саме за посередництва АФК відбувається активація компонентів антиоксидантної системи, які причетні до захисту клітин від окиснювальних пошкоджень за умов теплового стресу.

Таким чином, у нашій роботі зафіксовано як подібність, так і відмінності в реакції протекторних систем у двох видів злаків з різною стійкістю до теплового стресу. У проростків пшениці вплив високої температури (44 °C) спричиняв помітний розвиток окиснювального стресу, що виявлялося в істотному збільшенні генерації супероксидного радикала, накопиченні пероксиду водню і продукту ПОЛ МДА. При цьому обробка мелатоніном значно зменшувала ефект зростання всіх цих показників за дії високої температури.

У проростків жита внаслідок теплового стресу істотно зростала тільки генерація супероксидного аніон-радикала, а інші показники окиснювального стресу слабо відрізнялися від контролю. При цьому обробка мелатоніном дещо зменшувала спричинюване нагрівом посилення генерації $\text{O}_2^{\bullet-}$.

У проростків пшениці внаслідок теплового стресу знижувалася активність ключових ферментів, що знешкоджують пероксид водню – каталази і гваяколпероксидази (таблиця). Обробка зернівок пшениці мелатоніном спричиняла значне підвищення активності каталази і сприяла збереженню активності гваяколпероксидази на рівні, близькому до значень контролю. У жита за умов теплового стресу активність досліджуваних

антиоксидантних ферментів істотно не змінювалася, а обробка мелатоніном спричиняла підвищення активності гваяколпероксидази.

Тепловий стрес викликав тенденцію до зменшення вмісту цукрів та істотне зростання вмісту проліну у проростків пшениці. Натомість у проростків жита вміст цукрів зберігався стабільним, а зростання вмісту проліну внаслідок стресу було менш помітним. Обробка мелатоніном призводила до посилення накопичення розчинних вуглеводів у проростків обох видів за стресових умов і майже не впливала на вміст проліну.

В цілому отримані результати вказують на більш істотну модуляцію мелатоніном клітинних протекторних систем у проростків пшениці як об'єкта з меншою порівняно з проростками жита конститутивною теплостійкістю.

4.3 Вплив мелатоніну на стійкість проростків пшениці різних генотипів до модельної посухи

Ефекти мелатоніну можуть залежати не тільки від видових, а й від сортових особливостей рослин. Так, показано, що мелатонін посилював накопичення проліну за посухи у нестійкого сорту пшениці та послаблював у стійкого (Li et al., 2020). Відомо, що адаптивні стратегії сортів пшениці та інших зернових культур можуть суттєво відрізнятися, що може виявлятися у різному внеску в адаптацію до окиснювального стресу, який супроводжує посуху, ферментативних та неферментативних компонентів антиоксидантної системи (Kolupaev et al., 2023a; 2023c).

Незважаючи на велике значення пшениці як продовольчої культури, вплив мелатоніну на її посухостійкість поки що вивчено лише в поодиноких роботах (Cui et al., 2018; Li et al., 2020; Zhang et al., 2023). Особливо фрагментарна інформація про особливості прояву стрес-протекторних ефектів мелатоніну у сортів із різною стратегією адаптації до посухи. Зокрема, відсутні роботи, в яких одночасно вивчався б вплив мелатоніну на

функціонування в стресових умовах антиоксидантної та осмопротекторної систем у етіюльованих проростків сортів пшениці, що відрізняються за посухостійкістю. Зважаючи на це, одним із завдань роботи було порівняння реакцій стрес-протекторних систем 2-4-добових проростків пшениці сортів Тобак (посухостійкий) і Досконала (чутливий) на дію мелатоніну в умовах модельної посухи (обробка 15% ПЕГ 6000).

4.3.1. Вміст маркерів окиснювального стресу за впливу модельної посухи і мелатоніну на проростки пшениці різних генотипів. Інкубація проростків на середовищі з ПЕГ 6000 призводила до значного підвищення концентрації H_2O_2 у тканинах. У стійкого до посухи сорту пшениці Тобак спостерігалось зростання вмісту перекису водню приблизно на 35%, тоді як у чутливого сорту Досконала цей показник збільшувався у 1,5 раза відносно контрольних умов (рис. 4.9, А). Таке зростання рівня H_2O_2 свідчить про більшу чутливість сорту Досконала до посухи, що узгоджується з даними інших досліджень, де вказано на посилення окиснювального стресу в рослин із низькою толерантністю до стресових чинників.

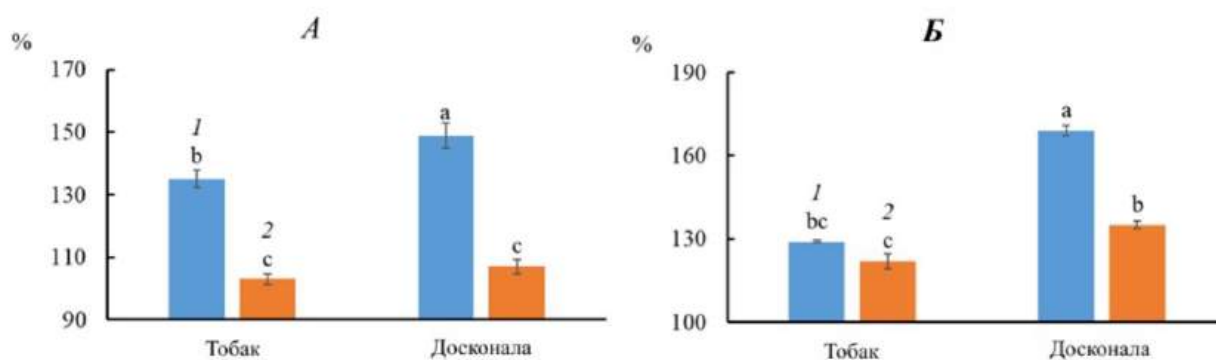


Рис. 4.9. Вміст (% від контролю) перексиду водню (А) та МДА (Б) у пагонах проростків пшениці. 1 — ПЕГ 6000 (15%); 2 — ПЕГ 6000 (15%) + мелатонін (0,5 мМ). Примітка. Різними літерами позначені величини, відмінності між якими суттєві при $p \leq 0,05$.

Обробка проростків мелатоніном в умовах посухи показала виражений захисний ефект, що проявлявся у зменшенні вмісту H_2O_2 у тканинах. У обох сортів пшениці застосування мелатоніну сприяло зниженню вмісту H_2O_2 до рівня, близького до контрольного.

Посуха також спричиняла накопичення ТБК-активних продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), які є маркерами ушкодження мембран. У сорту Тобак вміст продуктів ПОЛ зріс на 30% порівняно з контролем, тоді як у чутливого сорту Досконала цей показник підвищився на 70% (рис. 4.9, Б).

Застосування мелатоніну суттєво знижувало рівень продуктів ПОЛ, особливо у чутливого сорту. У сорту Досконала вміст ТБК-активних сполук зменшився на 35% порівняно зі стресовим варіантом без обробки мелатоніном. У стійкого сорту Тобак ефект мелатоніну був менш вираженим, що свідчить про меншу потребу цього сорту в додатковому антиоксидантному захисті завдяки його природній толерантності до посухи.

4.3.2. Активність антиоксидантних ферментів за впливу модельної посухи і мелатоніну на проростки пшениці різних генотипів. Базальний рівень активності СОД у контрольних умовах був суттєво вищим у сорту Тобак порівняно з сортом Досконала (табл. 4.1). У відповідь на осмотичний стрес активність СОД знижувалася в обох сортів. У сорту Тобак зменшення активності СОД було менш вираженим, що свідчить про стійкість цього сорту до стресових умов. У сорту Досконала зниження активності ферменту було значно сильнішим.

У сорту Тобак обробка мелатоніном сприяла збереженню активності СОД, забезпечуючи її рівень, близький до контрольного.

У сорту Досконала дія мелатоніну була ще більш вираженою. Під його впливом активність СОД не лише відновлювалася до рівня контрольних показників, але й значно перевищувала їх. Це свідчить про стимулюючий ефект мелатоніну, який здатний активувати ферментативну систему навіть у рослин із низьким базальним рівнем захисту.

Табл. 4.1. Активність СОД, каталази та гваяколпероксидази у пагонах проростків пшениці

Експериментальний варіант	Активність СОД (од/г сухої речовини хв)	Активність каталази (ммоль H ₂ O ₂ /г сухої речовини хв)	Активність гваяколпероксидази (од/г сухої речовини хв)
Тобак			
Контроль	62.6±1.6 a	10.8±0.2 c	7.64±0.05 c
ПЕГ 6000 (15%)	35.6±1.8 c	10.3±0.2 c	6.81±0.06 e
ПЕГ 6000 (15%) + Мелатонін(1 мкМ)	48.6±1.1 b	11.0±0.2 c	7.43±0.08 cd
Досконала			
Контроль	30.1±1.7 d	15.8±0.5 a	9.76±0.08 a
ПЕГ 6000 (15%)	20.4±0.7 e	11.9±0.3 bc	7.26±0.03 d
ПЕГ 6000 (15%) + Мелатонін (1 мкМ)	44.4±1.0 b	12.7±0.2 b	8.62±0.06 b

Примітка. Різними літерами позначені величини, відмінності між якими суттєві при $p \leq 0,05$.

Активність каталази у контрольних умовах у двох досліджуваних сортів пшениці суттєво не відрізнялася. За умов посухи, створеної за допомогою ПЕГ 6000, у стійкого сорту Тобак активність ферменту залишалася стабільною. Водночас у чутливого сорту Досконала активність каталази суттєво знижувалася за умов осмотичного стресу.

Обробка проростків мелатоніном мала різний вплив на активність каталази у двох сортів. У сорту Тобак мелатонін не викликав суттєвих змін активності ферменту, що, ймовірно, пов'язано з тим, що базальний рівень каталази був достатнім для забезпечення толерантності до стресу. Водночас у сорту Досконала дія мелатоніну була більш помітною. Обробка мелатоніном частково пом'якшувала негативний вплив посухи на активність каталази. Хоча рівень ферментативної активності у цьому сорті не досягав контрольних

показників, зменшення ступеня її зниження свідчить про захисний ефект мелатоніну.

Активність ГПО за фізіологічно нормальних умов була вищою у сорту Тобак порівняно з сортом Досконала. За умов модельної посухи активність ферменту суттєво знижувалася у обох сортів. Однак ступінь цього зниження відрізнявся: у сорту Досконала спостерігалася значніше зниження активності ГПО, що, ймовірно, пов'язано з його нижчою здатністю до адаптації до посухи. У сорту Тобак зменшення активності було менш вираженим, що свідчить про його більшу толерантність до дії осмотичного стресу.

Обробка мелатоніном позитивно впливала на активність ГПО у обох досліджуваних сортів. У сорту Тобак спостерігалася стабілізація активності ферменту, що дозволило підтримувати його рівень, близький до контрольного. У сорту Досконала вплив мелатоніну був більш вираженим. Обробка мелатоніном частково нівелювала негативний вплив осмотичного стресу на активність ГПО.

Вплив мелатоніну на активність антиоксидантних ферментів може бути пов'язаний із сигнальною функцією мелатоніну, яка включає активацію генів антиоксидантних ферментів, а також стабілізацію їхньої активності за умов окиснювального стресу (Hasanuzzaman et al., 2020). В цілому, як уже зазначалося, на рослинах різних таксономічних груп, включаючи кукурудзу, томати, цитрусові, сою, встановлено, що обробка мелатоніном підвищує активність багатьох антиоксидантних ферментів (у тому числі СОД, пероксидази, аскорбатпероксидази, дегідроаскорбатредуктази, глутатіон S-трансферази).

4.3.3. Вміст низькомолекулярних захисних сполук.

Низькомолекулярні органічні сполуки, такі як пролін, цукри, фенольні сполуки та інші осмопротектори, відіграють важливу роль у адаптації рослин до абіотичних стресів. Вони забезпечують підтримання осмотичного балансу, захищають клітинні макромолекули від деградації, стабілізують білки та

мембранні структури, а також мають антиоксидантні властивості (Ashraf & Foolad, 2007).

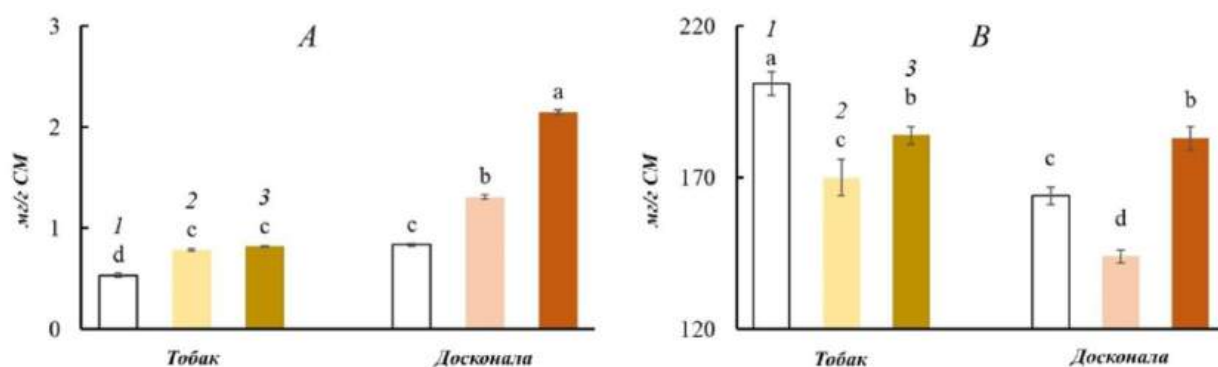


Рис. 4.10. Вміст проліну (A) и цукрів (B) у пагонах проростків пшениці. 1 — контроль; 2 — ПЕГ 6000 (15%); 3 — ПЕГ 6000 (15%) + мелатонін (1 мкМ). Примітка. Різними літерами позначені величини, відмінності між якими суттєві при $p \leq 0,05$.

У контрольних умовах базальний вміст проліну був достовірно нижчим у стійкого сорту Тобак порівняно з чутливим до посухи сортом Досконала (рис. 4.10, A).

За умов модельної посухи, індукованої ПЕГ 6000, вміст проліну зростав в обох сортах, що є типовою реакцією рослин на водний дефіцит. У стійкого сорту Тобак підвищення рівня проліну було менш вираженим порівняно з сортом Досконала, що може свідчити про ефективніші механізми водозбереження, які зменшують потребу у значному накопиченні осмопротекторів.

Обробка мелатоніном мала різний вплив на сорти пшениці. У сорту Тобак мелатонін практично не впливав на рівень проліну за умов стресу. Це може бути пов'язано з тим, що толерантні до посухи рослини вже мають достатньо активні механізми адаптації, які не потребують додаткового регулювання проліну під впливом мелатоніну. У чутливого до посухи сорту Досконала мелатонін мав більш виражений ефект. Його обробка спричиняла значне підвищення вмісту проліну у проростках за умов осмотичного стресу. Ці результати узгоджуються з даними, одержаними для сортів пшениці китайської селекції (Li et al., 2020). У цій роботі показано посилення

мелатоніном накопичення проліну у непосухостійкого сорту та ослаблення такого ефекту у посухостійкого сорту. Зниження стрес-індукованого накопичення проліну при обробці мелатоніном виявлено і у рослин *Trigonella foenum-gracum* (Zamani et al., 2019). В цілому ж, у більшій частині досліджень, проведених на рослинах різних видів, констатується підвищення дією мелатоніну вмісту проліну при стресах, пов'язаних із зневодненням клітин (Buttar et al., 2020; Tiwari et al., 2021; Awan et al., 2023). Також зареєстровано збільшення активності та посилення експресії генів ферментів синтезу проліну під впливом екзогенного мелатоніну (Antoniou et al., 2017). Слід проте відзначити, що накопичення проліну можна розглядати як ознака досить жорсткого стресового впливу. Так, на прикладі етіологованих проростків семи сортів пшениці було виявлено високу кореляцію між накопиченням проліну та продукту ПОЛ МДА при тепловому стресі ($r = 0.91$) (Kolupaev et al., 2023c). Очевидно, стресовий вплив, який створювався в наших експериментах, був критичним для чутливого сорту Досконала. У той же час стійкий сорт Тобак зберігав відносно стабільний вміст проліну. Ймовірно, що під впливом мелатоніну активуються різні складові стрес-протекторних реакцій проростків пшениці та прояв його захисної дії залежить від адаптивних стратегій видів та сортів.

Важливу роль у підтриманні осмотичного балансу та захисті клітин від стресових факторів відіграють розчинні вуглеводи, які поряд з проліном виконують функцію осмопротекторів, регулюючи водний баланс у клітинах. Крім того, вуглеводи відіграють важливу роль у метаболічних процесах, забезпечуючи енергетичний баланс рослинного організму (Kaplan et al., 2007).

У фізіологічно нормальних умовах конститутивний вміст розчинних цукрів у сорту Тобак був значно вищим, ніж у сорту Досконала (рис. 4.10, Б). Високий початковий рівень цукрів у стійких сортів може бути однією з передумов їхньої толерантності до осмотичних стресів, оскільки ці сполуки

відіграють важливу роль у стабілізації клітинних структур і забезпеченні енергетичних потреб під час несприятливих умов (Hummel et al., 2010).

За дії модельної посухи, індукованої ПЕГ 6000, спостерігалось зменшення вмісту цукрів в обох сортах. Проте ступінь зниження концентрації цукрів відрізнявся у двох досліджуваних сортах. У сорту Тобак падіння рівня цукрів було менш вираженим, що свідчить про ефективніші механізми підтримання вуглеводного обміну навіть за умов стресу. Водночас у чутливого сорту Досконала зниження концентрації цукрів було значно сильнішим.

Обробка мелатоніном мала позитивний вплив на вміст розчинних цукрів у проростках пшениці. У стійкого сорту Тобак мелатонін частково нівелював ефект посухи, підтримуючи вміст цукрів на рівні, близькому до контрольного. Це може бути пов'язано з тим, що мелатонін сприяє стабілізації метаболічних процесів і запобігає надмірному використанню вуглеводних ресурсів під час стресу (Arnao & Hernández-Ruiz, 2019). У чутливого до посухи сорту Досконала ефект мелатоніну був ще більш вираженим: у варіанті з поєднанням мелатоніну та осмотичного стресу рівень розчинних вуглеводів перевищував контрольні значення. Це може свідчити про те, що мелатонін активує синтез вуглеводів або сприяє їхньому накопиченню у клітинах, що допомагає підтримувати осмотичний баланс і підвищувати толерантність до посухи. Вирівнювання втрат вмісту цукрів при обробці мелатоніном виявлено у рослин бермудської трави в умовах посухи (Shi et al., 2015). У гречки вміст цукрів у рослин, оброблених мелатоніном, виявився на 60% вищим у порівнянні з необробленими (Tiwari et al., 2023).

Важливими компонентами антиоксидантної системи рослин є фенольні сполуки. Ці вторинні метаболіти здатні нейтралізувати активні форми кисню (АФК), а також беруть участь у зміцненні клітинних стінок, що забезпечує додатковий захист від зневоднення (Michalak, 2006).

Таблиця 4.2. Вміст вторинних метаболітів у проростках пшениці

Експериментальний варіант	Загальний вміст фенольних сполук (мкмоль гальної кислоти/г сухої маси)	Вміст антоціанів (A ₅₃₀ /г сухої речовини)	Вміст флавоноїдів (A ₃₀₀ /г сухої речовини)
Тобак			
Контроль	9.48±0.23 b	0.255±0.003 a	2.05±0.03 b
ПЕГ 6000 (15%)	10.20±0.11 a	0.185±0.003 c	1.55±0.03 d
ПЕГ 6000 (15%) + Мелатонін (1 мкМ)	9.88±0.23 ab	0.220±0.005 b	1.71±0.02 cd
Досконала			
Контроль	9.87±0.13 ab	0.250±0.011 a	2.21±0.05 a
ПЕГ 6000 (15%)	9.67±0.25 ab	0.140±0.005 d	1.65±0.05 d
ПЕГ 6000 (15%) + Мелатонін (1 мкМ)	10.30±0.12 a	0.210±0.011 b	1.84±0.02 c

Примітка. Різними літерами позначені величини, відмінності між якими суттєві при $p \leq 0,05$.

У контрольних умовах сумарний вміст фенольних сполук у пагонах проростків пшениці не демонстрував суттєвих відмінностей між двома сортами: Тобак (стійкий до посухи) та Досконала (чутливий до посухи) (табл. 4.2).

За умов осмотичного стресу, спричиненого дією ПЕГ 6000, було виявлено зміни у вмісті фенольних сполук, які залежали від стійкості сорту. У стійкого сорту Тобак рівень цих сполук дещо збільшувався. Це відповідає літературним даним, які вказують на те, що фенольні сполуки відіграють важливу роль у пристосуванні рослин до посухи та є частиною захисної відповіді на водний дефіцит (Sharma et al., 2019). На відміну від сорту Тобак,

у чутливого до посухи сорту Досконала вміст фенольних сполук при стресі не змінювався.

Обробка мелатоніном по-різному впливала на фенольний профіль обох сортів. У стійкого сорту Тобак спостерігалася лише незначна тенденція до підвищення рівня фенольних сполук після обробки мелатоніном. У чутливого сорту Досконала вплив мелатоніну був більш помітним: відзначалося збільшення вмісту фенольних сполук, хоча цей ефект не був статистично значущим при $p \leq 0,05$. Це може вказувати на те, що мелатонін ініціює часткову активацію захисних механізмів навіть у сортів із низькою стійкістю до посухи, проте рівень цього ефекту може варіювати залежно від інших фізіологічних характеристик рослини.

Вміст антоціанів за дії осмотичного стресу знижувався в обох сортів, але більш істотно у нестійкого сорту Досконала. Обробка мелатоніном значною мірою запобігала цьому ефекту стресу в обох сортів (табл. 4.2). Схожі зміни відбувалися і у вмісті флавоноїдів у обох сортів: він знижувався в умовах осмотичного стресу, а при обробці мелатоніном цей ефект пом'якшувався.

Слід зазначити, що швидку деградацію поліфенольних сполук за умов стресів спостерігали й інших роботах (Zafar et al., 2020). При цьому мелатонін має здатність посилювати накопичення антоціанів та інших поліфенолів з потужною антиоксидантною дією. Так, показано АФК-залежне посилення мелатоніном синтезу антоціанів у плодах груші (Sun et al., 2021). Примітно, що у бермудської трави функціонування двох генів, що контролюють експресію фенілаланін-амонійліази (ключового ферменту синтезу фенольних сполук), пригнічуються під час стресу, спричинюваного посухою, але підвищуються після обробки екзогенним мелатоніном (Ayuyaz et al., 2022). Фоліарна обробка рослин *Fagopyrum tataricum* мелатоніном також викликала багаторазове підвищення активності фенілаланін-амонійліази та збільшення вмісту флавоноїдів в умовах посухи (Hossain et al., 2020). На рослинах різних видів показано посилення синтезу поліфенольних сполук

при обробці мелатоніном в умовах стресової дії УФ-В (Plokhovska et al., 2023).

Висновки до розділу 4

Проведені дослідження дозволили встановити ефект індукування теплостійкості етіолованих проростків пшениці екзогенним мелатоніном. Отримані дані вказують на залучення АФК та іонів кальцію в реалізацію стрес-протекторної дії мелатоніну або продуктів його перетворення: вплив мелатоніну на виживаність проростків після впливу ушкоджувального прогріву усувався антиоксидантом ДМТС, інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом, хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА та інгібітором фосфоліпази С неоміцином. Зазначені сполуки також нівелювали вплив обробки проростків мелатоніном на активність антиоксидантних ферментів.

Порівняння впливу праймінгу насіння мелатоніном на теплостійкість проростків пшениці і жита виявило наявність видових відмінностей його ефектів. На проростки жита мелатонін впливав менш помітно, ніж на проростки пшениці. Обробка насіння мелатоніном перешкоджала розвитку окиснювального стресу, спричинюваного дією високої температури, що виявлялося у зниженні показників генерації супероксидного радикала, вмісту пероксиду водню і малонового діальдегіду у пагонах проростків пшениці і жита. Обробка зернівок обох видів злаків мелатоніном спричиняла підвищення активності каталази на фоні теплового стресу, а також сприяла стабілізації активності пероксидази за стресових умов у пшениці і викликала її підвищення у жита. Крім того, обробка зернівок мелатоніном спричиняла підвищення вмісту розчинних вуглеводів за стресових умов, але істотно не впливала на вміст проліну у пагонах проростків обох видів.

Отримані результати свідчать про суттєві відмінності у функціонуванні захисних механізмів проростків пшениці різних генотипів залежно від їхньої посухостійкості та впливу мелатоніну. Дослідження показали, що стійкий до посухи сорт Тобак і чутливий сорт Досконала відрізняються за рівнем

антиоксидантної активності, накопиченням низькомолекулярних осмопротекторів і загальною фізіологічною відповіддю на осмотичний стрес.

В умовах осмотичного стресу обробка мелатоніном позитивно впливала на накопичення біомаси проростками пшениці. При цьому вона значно пом'якшувала окиснювальні ушкодження шляхом впливу на різні складові антиоксидантної системи. Під впливом мелатоніну стабілізувалася активність ключових ферментів цієї системи — СОД та гваяколпероксидази, а також кількість цукрів, антоціанів та флавоноїдів. Обробка мелатоніном в умовах модельної посухи викликала суттєве підвищення вмісту проліну у нестійкого сорту пшениці. Загалом більш виражену стрес-протекторну дію мелатонін чинив на проростки саме чутливого до посухи сорту пшениці. Таким чином, стрес-протекторна дія мелатоніну пов'язана з нормалізацією функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем за умов посухи і вона певною мірою залежить від сортових особливостей адаптивних стратегій.

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ПРОРОСТАННЯ ЗЕРНІВОК ЗЛАКІВ ЗА НОРМАЛЬНИХ І СТРЕСОВИХ УМОВ

5.1. Механізми активації обробкою мелатоніном проростання зернівок пшениці за умов осмотичного і сольового стресів

Незважаючи на те, що протягом кількох останніх років проведено вже немало досліджень впливу екзогенного мелатоніну на стійкість зернових злаків до осмотичного або сольового стресів, залишаються недостатньо вивченими його ефекти при праймуванні насіння. Методика праймування насіння, адаптована для практичного використання, передбачає не лише замочування насіння у воді або розчинах досліджуваних сполук, а й обов'язкове наступне висушування зернівок до вихідної вологості (Waqas et al., 2019). Такий підхід майже не використовувався при дослідженні стрес-протекторного впливу мелатоніну на зернові злаки. При цьому частіше вивчався вплив обробки насіння мелатоніном не на проростання зернівок в стресових умовах, а на ріст рослин за помірного стресового навантаження. Наприклад, показано, що 4-годинне замочування насіння пшениці у розчинах мелатоніну з їх наступним висівом в ґрунт, що зрошувався морською водою, підвищувало ростові показники, вміст хлорофілу, цукрів і фенольних сполук у листках у 3-тижневих рослин (Sadak, 2016). Проте вказана методика не передбачала повного висушування насіння перед висівом в ґрунт, а також спостереження за проростанням зернівок. Недавно у роботі Ismaeil і співавт. (2024) було показано позитивний вплив обробки мелатоніном на проростання зернівок пшениці за умов сольового стресу. Однак при цьому насіння тривалий час (протягом 20 год) перебувало у розчинах мелатоніну і не висушувалось перед наступним пророщуванням за стресових умов.

У дослідженні Shaheen і спіавт. (2024) повідомляється, що 16-годинна обробка зернівок мелатоніном сприяла їх схожості за умов ґрунтової посухи, а також поліпшувала ростові показники рослин за стресових і нормальних

умов, зменшувала показники генерації АФК і підвищувала активність антиоксидантних ферментів та вміст осмолітів. Однак у цій роботі так само не контролювалась вологість праймованого насіння. Таким чином, у більшості досліджень впливу мелатоніну на проростання зернівок і ріст проростків за стресових умов використовуються методики довготривалого замочування насіння без наступного його висушування або без контролю вологості. Такі методики не є наближеними до практичного використання. Крім того, відомо, що довготривале замочування насіння при праймуванні може спричиняти протрузії корінця (Sen et al., 2021). Водночас повідомляється, що висушування може бути додатковим чинником, який підвищує стійкість проростків, що розвиваються з праймованого насіння (Waqas et al., 2019).

У зв'язку з викладеним досліджували вплив процедури «класичного» праймінгу зернівок пшениці розчинами мелатоніну (3-годинна обробка і висушування) на їх проростання і ріст проростків за умов модельних посухи та сольового стресу, а також метаболізм вуглеводів і окремі показники стану антиоксидантної системи. В експериментах використовували насіння пшениці сорту Етана.

5.1.1. Вплив мелатоніну на схожість зернівок та біомасу проростків пшениці. У контрольному варіанті та варіанті з обробкою мелатоніном за відсутності впливу стресорів схожість зернівок пшениці сягала майже 100 % (рис. 5.1). За модельної посухи, створюваної ПЕГ 6000, вона знижувалася майже до 64%, а за дії сольового стресу – до 56 %. Попередня обробка мелатоніном підвищувала відносну кількість пророслого насіння на 12 і 17% за умов посухи і сольового стресу, відповідно.

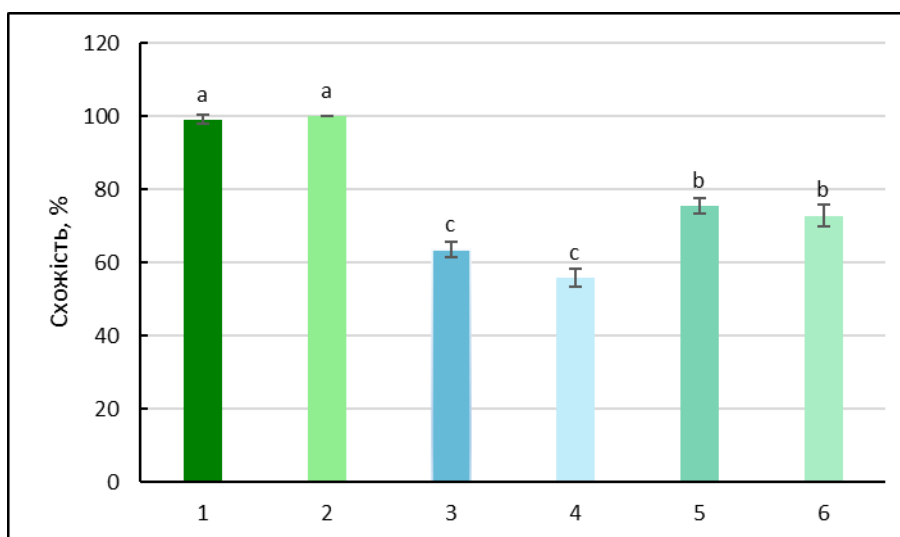


Рис. 5.1. Схожість зернівок пшениці за дії осмотичних стресів і мелатоніну. 1 – контроль; 2 – мелатонін (20 мкМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – NaCl (150 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (15%) + мелатонін, (20 мкМ); 6 – NaCl (150 мМ) + мелатонін (20 мкМ). Тут і на рис. 5.3-5.5: однаковими літерами позначені величини, відмінності між якими не достовірні при $p \leq 0,05$.

Попередня обробка насіння мелатоніном сприяла покращенню проростання в стресових умовах: кількість пророслих зернівок підвищувалася на 12% у варіанті з осмотичним стресом та на 17% за дії сольового навантаження. За відсутності дії стресових чинників обробка насіння мелатоніном спричиняла тенденцію до збільшення маси органів проростків, однак цей ефект не був вірогідним при $p \leq 0,05$ (табл. 5.1). Під впливом модельної посухи і особливо сольового стресу різко знижувалася біомаса пагонів проростків пшениці (в 4,3 і 4,9 раза, відповідно) (рис. 5.2). Маса коренів також істотно знижувалася. В цілому відзначалося більш ніж 2-разове зменшення загальної біомаси проростків (табл. 5.1). Обробка мелатоніном значно пом'якшувала інгібування росту органів проростків, спричинюване посухою і сольовим стресом (рис. 5.2, табл. 5.1). Примітно, що під впливом стресових чинників також значно зменшувалося співвідношення мас пагонів і коренів. При цьому за умов посухи обробка зернівок мелатоніном помітно підвищувала це співвідношення, що також вказує на стрес-протекторну дію мелатоніну. Слід зауважити, що за сольового стресу такий його ефект був менш помітним.

Таблиця 5.1. Біомаса органів проростків пшениці
за дії осмотичних стресів і мелатоніну

Варіант	Маса пагона, мг	Маса кореня, мг	Загальна маса проростка	Співвідношен я мас (пагін/корені)
Контроль	24,5±0,8 а	46,4±1,4 а	70,9±1,6 а	0,528
Мелатонін, 20 мкМ	26,3±0,9 а	48,0±2,0 а	74,3±2,2 а	0,548
ПЕГ 6000, 15%	5,7±0,3 с	29,6±1,1 с	35,3±1,1 с	0,192
NaCl, 150 мМ	5,0±0,2 с	26,6±1,2 с	31,6±1,2 с	0,188
ПЕГ 6000, 15% + мелатонін, 20 мкМ	8,0±0,2 б	37,6±1,4 б	45,6±1,4 б	0,213
NaCl, 150 мМ + мелатонін, 20 мкМ	6,9±0,3 bc	35,7±1,3 б	42,6±1,3 б	0,193

Примітка. Однаковими літерами позначені величини, відмінності між якими не достовірні при $p \leq 0,05$.

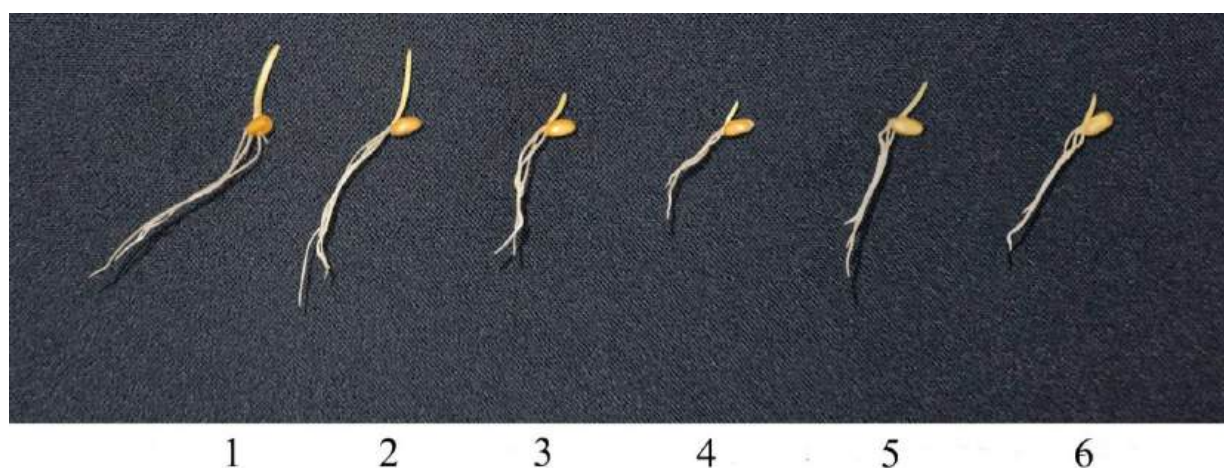


Рис. 5.2. Фенотип 3-добових проростків пшениці за дії мелатоніну і стресових чинників. 1 – контроль; 2 – мелатонін (20 мкМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – NaCl (150 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (15%) + мелатонін, (20 мкМ); 6 – NaCl (150 мМ) + мелатонін (20 мкМ).

5.1.2. Активність амілази у зернівках за дії стресових факторів та мелатоніну. Обробка мелатоніном за відсутності дії стресових чинників не впливала на загальну активність амілази у зернівках 2-добових проростків злаків (рис. 5.3). Посуха і сольовий стрес приблизно однаковою мірою інгібували активність ферменту у зернівках. Попередня обробка мелатоніном достовірно пом'якшувала негативний вплив посухи на активність амілази, проте слабо впливала на прояв ефекту сольового стресу (рис. 5.3).

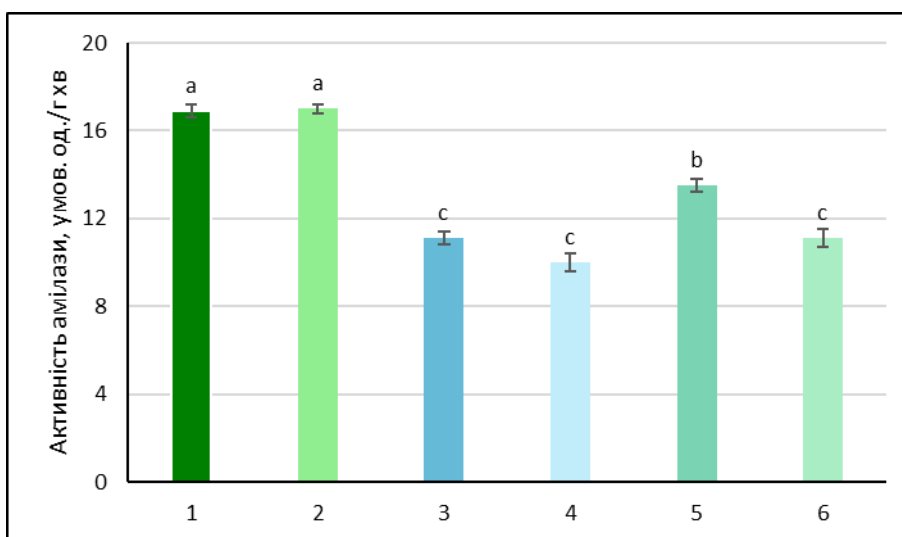


Рис. 5.3. Загальна активність амілази у зернівках пшениці за дії осмотичних стресів і мелатоніну. 1 – контроль; 2 – мелатонін (20 мкМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – NaCl (150 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (15%) + мелатонін, (20 мкМ); 6 – NaCl (150 мМ) + мелатонін (20 мкМ).

5.1.3. Вміст розчинних вуглеводів і проліну у пагонах проростків пшениці. За відсутності стресових чинників обробка мелатоніном істотно не впливала на сумарний вміст цукрів у пагонах проростків пшениці (рис. 5.4, А). Модельний стрес посухи і особливо дія NaCl істотно знижували вміст розчинних вуглеводів у пагонах. Попередня обробка зернівок мелатоніном за умов осмотичного стресу підвищувала вміст цукрів у пагонах майже до рівня контролю, за умов сольового стресу вміст цукрів у варіанті з праймінгом мелатоніном також зростав, хоча і не досягав значень контролю.

Вміст проліну у пагонах проростків, отриманих з насіння, праймованого мелатоніном, не відрізнявся від контролю (рис. 5.4, Б). Стреси посухи і особливо засолення істотно підвищували вміст проліну у пагонах проростків. Передстресовий праймінг насіння мелатоніном не впливав на вміст проліну за умов сольового стресу, а за умов стресу посухи навіть трохи зменшував цей показник, хоча такий ефект не був достовірним за $p \leq 0,05$ (рис. 5.4, Б).

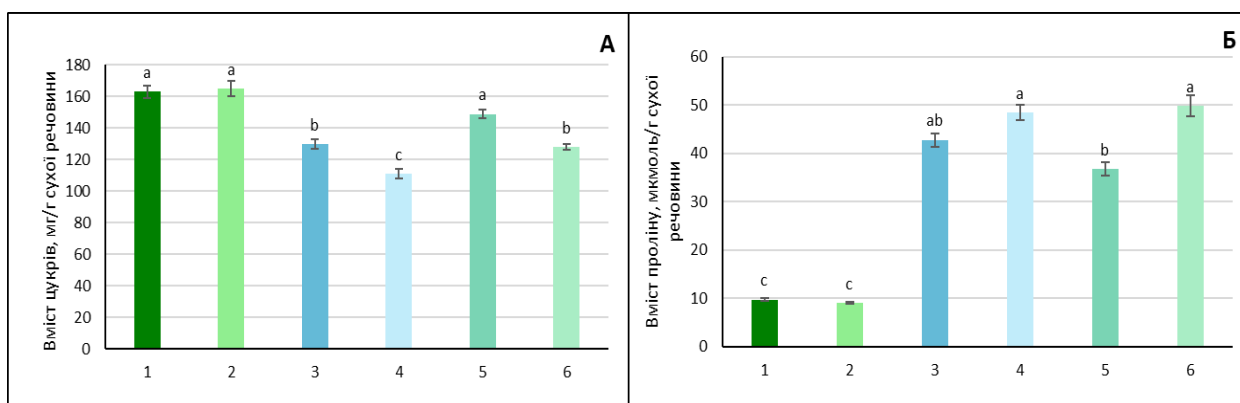


Рис. 5.4. Вміст цукрів (А) і проліну (Б) у пагонах проростків пшениці за дії осмотичних стресів і мелатоніну. 1 – контроль; 2 – мелатонін (20 мкМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – NaCl (150 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (15%) + мелатонін, (20 мкМ); 6 – NaCl (150 мМ) + мелатонін (20 мкМ).

5.1.4. Рівень генерації АФК та інтенсивність ПОЛ у пагонах проростків пшениці. Обробка насіння мелатоніном не впливала на генерацію супероксидного аніон-радикала пагонами проростків пшениці за фізіологічно нормальних умов (рис. 5.5, А). Стреси посухи і особливо засолення спричиняли різке посилення генерації $O_2^{\cdot-}$ тканинами пагонів. Попередній праймінг мелатоніном повністю усував такий прояв окиснювального стресу за умов посухи. Водночас за умов сольового стресу обробка мелатоніном лише частково зменшувала посилення утворення супероксидного аніон-радикала. Обробка мелатоніном за відсутності стресових впливів дещо зменшувала вміст H_2O_2 у пагонах проростків, хоча цей ефект був не достовірним при $p \leq 0,05$ (рис. 5.5, В). Під впливом осмотичного і сольового стресів відзначалося підвищення вмісту H_2O_2 у пагонах, а попередня обробка мелатоніном пом'якшувала цей ефект.

За обробки насіння мелатоніном вміст одного з кінцевих продуктів ПОЛ – МДА – у пагонах проростків пшениці істотно не змінювався (рис. 5.5, В). Осмотичний і особливо сольовий стрес призводили до посилення інтенсивності ПОЛ у пагонах, що виявлялося у підвищенні вмісту МДА. Праймінг насіння мелатоніном помітно зменшував спричинюване стресорами накопичення продукту ПОЛ у пагонах проростків (рис. 5.5, В).

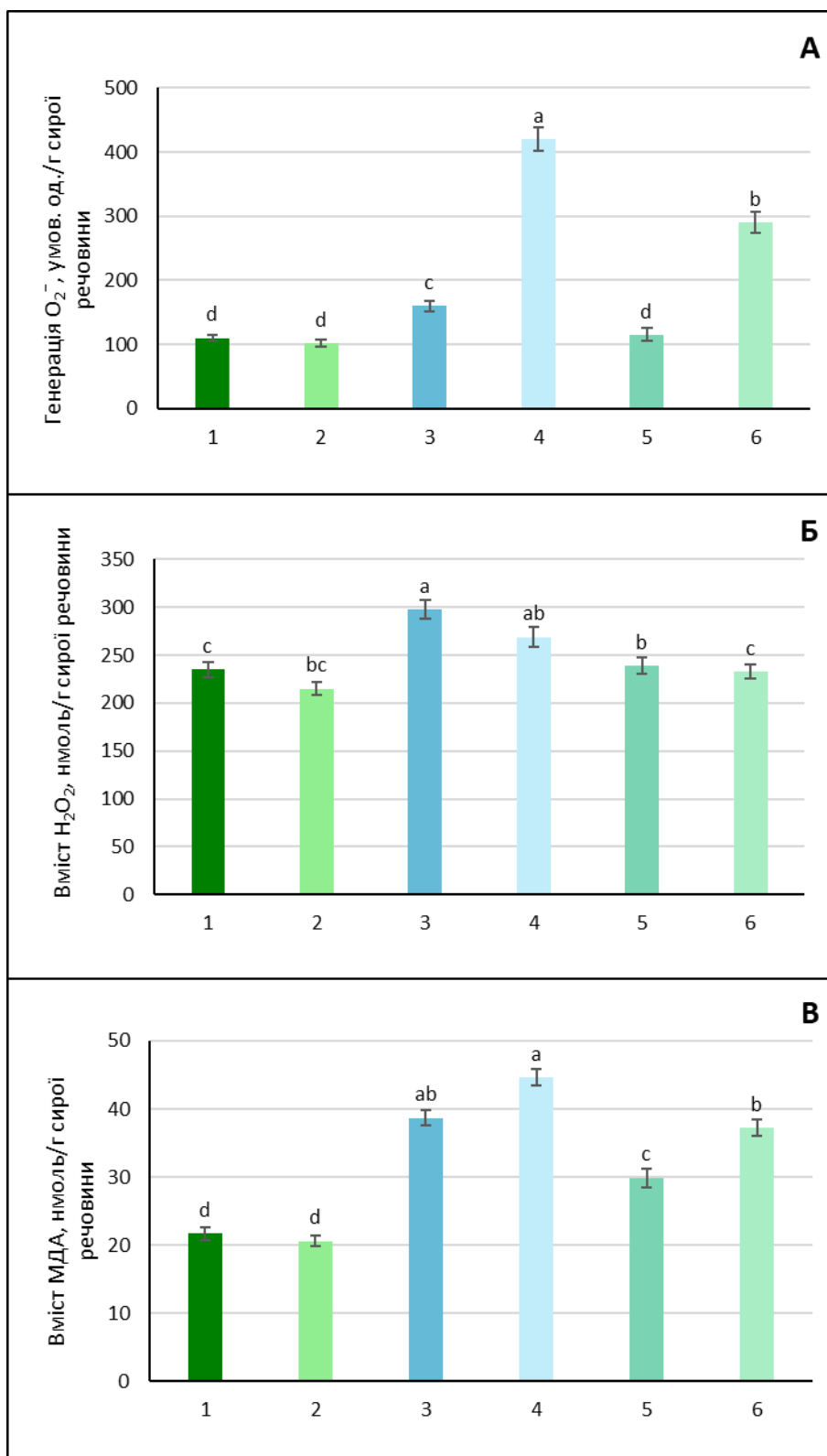


Рис. 5.5. Генерація супероксидного аніон-радикала (А) , вміст пероксиду водню (Б) і малонового діальдегіду (В) у пагонах проростків пшениці за дії осмотичних стресів і мелатоніну. 1 – контроль; 2 – мелатонін (20 мкМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – NaCl (150 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (15%) + мелатонін, (20 мкМ); 6 – NaCl (150 мМ) + мелатонін (20 мкМ).

5.1.5. Активність каталази і гваяколпероксидази у пагонах проростків пшениці. У пагонах проростків, отриманих із зернівок, праймованих мелатоніном, за відсутності дії стресорів відзначалося підвищення активності каталази (рис. 5.6, А). Осмотичний і сольовий стреси спричиняли приблизно однакове зниження активності ферменту. Водночас обробка насіння мелатоніном наближувала активність каталази до рівня контролю.

Активність ГПО у варіанті з обробкою насіння мелатоніном за фізіологічно нормальних умов дещо підвищувалася (рис. 5.6, Б). Ще більш помітне зростання активності ферменту відзначалося за впливу модельної посухи і сольового стресу. Обробка насіння мелатоніном помітно зменшувала спричинюване осмотичним стресом підвищення активності ГПО, проте не змінювала цей показник за умов сольового стресу.

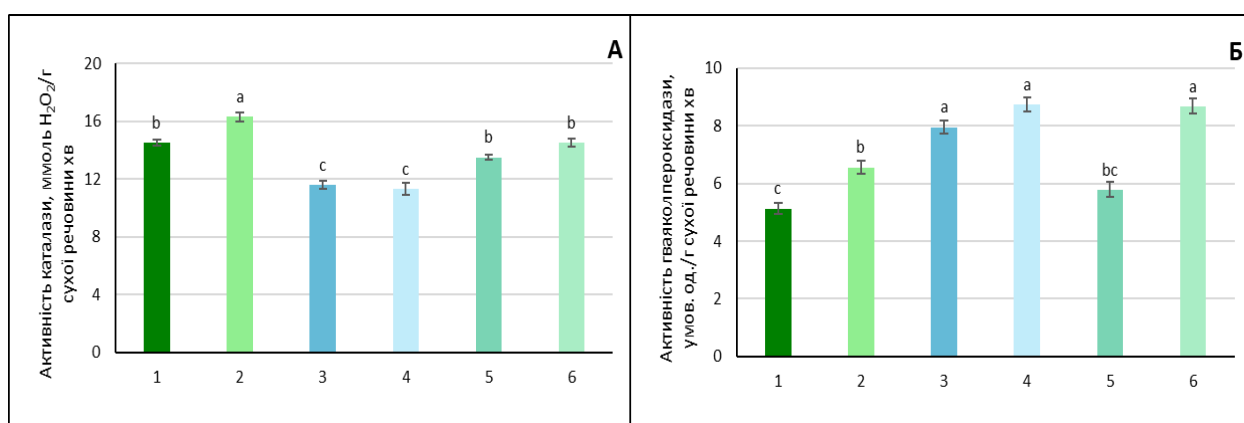


Рис. 5.6. Активність каталази (А) і ГПО (Б) у пагонах проростків пшениці за дії осмотичних стресів і мелатоніну. 1 – контроль; 2 – мелатонін (20 мкМ); 3 – ПЕГ 6000 (15%); 4 – NaCl (150 мМ); 5 – ПЕГ 6000 (15%) + мелатонін, (20 мкМ); 6 – NaCl (150 мМ) + мелатонін (20 мкМ).

5.1.6. Кореляційний аналіз впливу мелатоніну на проростання зернівок пшениці за стресових умов та біохімічні показники. Показники схожості насіння і біомаси пагонів дуже тісно корелювали між собою ($p \leq 0,01$) (рис. 5.7). Також вони перебували у тісній прямій кореляції з активністю амілази у зернівках та вмістом цукрів у пагонах. Цілком закономірною видається і дуже висока кореляція вмісту цукрів з активністю амілази,

оскільки надходження розчинних вуглеводів у пагін етіюльованих проростків залежить насамперед від інтенсивності гідролізу запасного крохмалю.

	Схожість	Загальна маса проростка	Активність амілази	Вміст цукрів	Вміст проліну	Генерація O_2^-	Вміст H_2O_2	Вміст МДА	Активність каталази	Активність ГПО
Схожість										
Загальна маса проростка	0,992**									
Активність амілази	0,975**	0,978**								
Вміст цукрів	0,950**	0,929**	0,972**							
Вміст проліну	-0,938**	-0,963**	-0,979**	-0,918**						
Генерація O_2^-	-0,732	-0,683	-0,777	-0,890*	0,717					
Вміст H_2O_2	-0,764	-0,749	-0,687	-0,661	0,578	0,333				
Вміст МДА	-0,978**	-0,965**	-0,988**	-0,993**	0,940**	0,831*	0,721			
Активність каталази	0,885*	0,863*	0,792	0,795	-0,706	-0,555	-0,914*	-0,837*		
Активність ГПО	-0,764	-0,736	-0,851*	-0,883*	0,794	0,821*	0,471	0,855*	-0,489	

Рис. 5.7. Кореляційний аналіз Пірсона зв'язків між впливом посухи, засолення і мелатоніну на ростові і біохімічні показники. * - вірогідно при $p \leq 0,01$; ** - вірогідно при $p \leq 0,05$.

На відміну від вмісту цукрів, вміст проліну у пагонах проростків перебував у дуже високій зворотній кореляції з показниками схожості зернівок та біомаси пагонів (рис. 8), що дозволяє розглядати накопичення проліну як ознаку інтенсивного стресового впливу посухи і засолення при проростанні зернівок. При цьому вміст проліну також перебував у тісній зворотній кореляції з активністю амілази і вмістом цукрів.

Показники генерації АФК (супероксидного аніон-радикала і пероксиду водню) перебували у зворотній кореляції з показниками схожості і біомаси пагонів, однак величини коефіцієнтів кореляції виявилися невірогідними за $p \leq 0,05$ (рис. 5.7). Водночас інтегральний показник окиснювального стресу (вміст кінцевого продукту ПОЛ – МДА) перебував у вірогідній при $p \leq 0,01$ зворотній кореляції з показниками проростання зернівок і біомаси пагонів, що дозволяє розглядати окиснювальний стрес як один із чинників, що перешкоджає проростанню зернівок і росту проростків. Також вміст МДА

перебував у тісній зворотній залежності з показниками, що характеризують мобілізацію запасного крохмалю зернівок – активністю амілази і вмістом цукрів.

Активність одного з ключових антиоксидантних ферментів – каталази – перебувала у прямій кореляції з показником схожості насіння ($p \leq 0,05$, рис. 5.7). Також активність цього ферменту мала вірогідну зворотну кореляцію з вмістом МДА і H_2O_2 , що вказує на його внесок у захист клітин від окиснювального стресу. Водночас активність ГПО була у зворотній кореляції зі схожістю насіння і біомасою пагонів, хоча її величини виявилися не вірогідними за $p \leq 0,05$. Примітно, що активність ГПО виявилася у прямій кореляції з величинами генерації супероксидного аніон-радикала і вмісту МДА, а також у зворотній кореляції з активністю амілази і вмістом цукрів (рис. 5.7).

Праймінг зернівок пшениці мелатоніном помітно підвищував їх схожість та біомасу органів проростків при проростанні насіння за умов осмотичного і сольового стресів (рис. 5.1, 5.2, табл. 5.2). Такі результати узгоджуються з недавно отриманими даними Shaheen і співавт (2024), які засвідчують позитивний вплив праймінгу зернівок мелатоніном в концентраціях 1-5 мг/л на показники проростання насіння пшениці і накопичення біомаси при осмотичному стресі, створюваному ПЕГ 6000. Однак у цій роботі використовувалась методика довготривалого (16-годинного) праймування насіння. Водночас виявлені нами ефекти цілком порівнювані і з даними про позитивний вплив праймінгу мелатоніном в концентрації 20 мкМ насіння тритикале на його проростання і ріст проростків за умов осмотичного стресу (Guo et al., 2022).

Зовсім недавно отримано ще ряд даних стосовно впливу праймінгу насіння на стійкість зернових злаків до осмотичних стресів, однак у цих дослідженнях використано інші методики обробки насіння мелатоніном. Так, у роботі Fu і співавт. (2024) показано, що праймінг насіння пшениці 100 мкМ мелатоніном посилював ріст коренів і пагонів молодих рослин за дії слабких

осмотичного (2% ПЕГ 6000) і сольового (0,1% NaCl) стресів. При цьому авторами використовувалась методика довготривалого (12-годинного) праймування насіння і стресові навантаження, які істотно не впливали на проростання насіння. Позитивні ефекти праймінгу насіння пшениці мелатоніном зафіксовані і у роботі Ismaeil і співавт (2024), в якій праймовані зернівки пророщували за дії сильного сольового стресу (300 мМ NaCl). У цьому дослідженні відзначено збільшення показників швидкості проростання та лінійних розмірів органів проростків за стресових умов під впливом мелатоніну. Однак слід зауважити, що у даній роботі обробка насіння мелатоніном також була довготривалою (20 год) і не передбачала висушування насіння перед його пророщуванням за стресових умов. Отже, незважаючи на великий обсяг досліджень впливу обробки мелатоніном насіння пшениці і споріднених злаків, дотепер майже відсутні роботи, в яких спосіб обробки зернівок був би наближеним до практичних технологій. У нашій роботі вперше показано, що істотний стрес-протекторний вплив мелатоніну, який призводить до підвищення схожості насіння і росту проростків пшениці за умов модельних посухи і засолення, проявляється і після повного висушування зернівок, праймованих розчинами мелатоніну (рис. 5.1, 5.2, табл. 5.1).

Слід зауважити, що у деяких публікаціях повідомляється про позитивний вплив праймінгу з наступним висушуванням насіння на стійкість інших видів рослин. Так, показано що 6-годинна обробка зернівок кукурудзи мелатоніном в концентраціях діапазону 250-1000 мкМ з подальшим висушуванням підвищувала схожість насіння і ростові показники проростків в умовах модельної посухи, створюваної ПЕГ 6000 (Muhammad et al., 2023). Також показано, що праймінг насіння сої мелатоніном в концентраціях від 20 до 300 мкМ протягом 6 год з наступним висушуванням підвищував швидкість проростання насіння і біомасу проростків за дії сольового стресу (Awan et al., 2023). Таким чином, є підстави вважати, що використання мелатоніну саме у

технологіях праймінгу насіння може бути реальним інструментом регуляції стійкості рослин різних видів, принаймні на ранніх фазах розвитку.

Однією зі складових пригнічення проростання насіння злаків за умов осмотичного і сольового стресів може бути зниження активності амілази у зернівках. Саме такий ефект спостерігався і у наших експериментах. Обробка зернівок мелатоніном помітно зменшувала інгібування активності амілази, спричинюване осмотичним стресом, за умов сольового стресу такий ефект виявлявся на рівні тенденції (рис. 5.3). Ці результати в цілому узгоджуються з даними роботи Ismaeil і співавт. (2024), в якій показано помітне нівелювання спричинюваного сольовим стресом пригнічення активності α - і β -амілаз у зернівках за їх попередньої обробки мелатоніном.

Як уже зазначалося, гідроліз запасного крохмалю амілазою є ключовою передумовою для надходження розчинних вуглеводів в органи проростка. У наших експериментах відзначалася дуже висока пряма кореляція між активністю амілази у зернівках і вмістом цукрів у пагонах (рис. 5.7). Водночас активність амілази і вміст цукрів тісно корелювали з показниками схожості насіння і біомаси проростків. При цьому обробка мелатоніном достовірно підвищувала вміст розчинних вуглеводів у пагонах за обох типів стресу (рис. 5.4). Слід зауважити, що позитивний вплив мелатоніну на вміст цукрів у тканинах проростків пшениці за умов сольового стресу показаний також ще у кількох незалежних дослідженнях (Chen et al., 2020; Zhang et al., 2022; Ismaeil et al., 2024). Ефекти підвищення активності амілази і вмісту цукрів за стресових умов в об'єктах, оброблених мелатоніном, можуть бути наслідком спричинюваних ним глибоких змін гормонального балансу. Зокрема, показано, у кукурудзи праймінг зернівок мелатоніном призводив до підвищення вмісту гіберелінів та 2-індолілоцтової кислоти (ІОК), що у свою чергу посилювало експресію генів, пов'язаних з метаболізмом крохмалю і сахарози (Wang et al., 2024). Роль гіберелінів і до певної міри ІОК у проростанні насіння, у тому числі за стресових умов вивчена досить добре (Kosakivska et al., 2022), а останніми роками доповнюється важливими

відомостями про участь специфічних сигнальних білків в реалізації впливу вказаних гормонів на метаболізм запасних вуглеводів (Sghayar et al., 2023; Alybayev et al., 2024).

Підвищення вмісту розчинних вуглеводів у пагонах проростків, отриманих із зернівок, праймованих мелатоніном, напевно є важливою складовою його стрес-протекторної дії. Розчинні вуглеводи, які в етіюльованих проростках надходять із зернівок завдяки активації гідролізу крохмалю, виконують не лише пластичні та енергетичні функції, а й стрес-протекторні і можливо регуляторні. Цілком очевидним є їхній внесок у підвищення осмотичного тиску, що необхідно для адаптації до посухи і сольового стресу. Також розчинні вуглеводи виконують мембранопротекторні й антиоксидантні функції (Kolupaev et al., 2023b). Показано, що екзогенна глюкоза спричиняла інгібування проростання зернівок пшениці за оптимальних умов, проте істотно посилювала ріст коренів і пагонів при пророщуванні за умов сольового стресу, також у присутності глюкози підвищувалась активність антиоксидантних ферментів і зменшувалися показники окиснювальних пошкоджень (Hu et al., 2012).

Не виключено, що зменшення окиснювальних пошкоджень у проростків, отриманих із зернівок, праймованих мелатоніном, принаймні частково може бути зумовлено впливом мелатоніну на накопичення розчинних вуглеводів. Водночас відомо, що мелатонін, маючи безпосередні антиоксидантні властивості, також здатний активувати антиоксидантну систему, діючи як сигнальна молекула (Taboada et al., 2023).

У наших експериментах обробка зернівок мелатоніном попереджала спричинюване осмотичним і сольовим стресами зниження активності каталази у пагонах проростків (рис. 5.6). Відомо, що каталаза дуже ефективно знешкоджує високі концентрації H_2O_2 у тканинах (Scandalios, 1997). Примітно, що в умовах наших експериментів відзначалася висока зворотна кореляція між активністю каталази і вмістом гідроген пероксиду та МДА у пагонах проростків ($r = -0,914$ та $-0,837$, відповідно). З активністю каталази

також добре корелювали величини схожості насіння і біомаси проростків (рис. 5.7). Такі результати можна тлумачити як свідчення значного внеску каталази у регуляцію про-/антиоксидантної рівноваги за дії праймінгу насіння мелатоніном. Натомість у наших експериментах не виявлено вірогідної кореляції між показниками проростання насіння і активності іншого ферменту, задіяного у знешкодженні гідроген пероксиду – ГПО. Більше того, зафіксовано вірогідну пряму кореляцію між активністю ГПО і генерацією супероксидного аніон-радикала пагонами проростків пшениці (рис. 5.6). Це може вказувати на функціонування цього ферменту не як антиоксиданту, а як прооксиданту. Відомо, що ГПО може не тільки знешкоджувати АФК, а й брати участь в генерації супероксидного радикала (Kolupaev, Karpets, 2014). При цьому переключення ферменту з антиоксидантних на прооксидантні функції може залежати від субстратного оточення, рН та деяких інших чинників.

Ще однією складовою реакцій-відповідей на дію стресорів і екзогенного мелатоніну, яку важко інтерпретувати однозначно, є зміна вмісту проліну у пагонах проростків пшениці. Стресові чинники – ПЕГ 6000 і NaCl – викликали класичну реакцію підвищення вмісту проліну (рис. 4, В). Однак обробка насіння мелатоніном, позитивно впливаючи на проростання зернівок і ріст проростків за стресових умов, практично не змінювала вміст проліну при сольовому стресі і дещо знижувала його за умов осмотичного стресу, створюваного ПЕГ 6000. Як уже зазначалося, у наших експериментах мелатонін при його надходженні через корені за дії на проростки пшениці ПЕГ 6000 сприяв підвищенню вмісту проліну у нестійкого сорту і не змінював цей показник у стійкого сорту (див. гл. 4). Про відсутність змін вмісту проліну у окремих сортів пшениці за дії мелатоніну в умовах сольового стресу повідомляється і у роботі Zhang і співавт. (2022). Більше того, при дослідженні процесів проростання зернівок сорго різних генотипів було встановлено сильну зворотну кореляцію між схожістю за умов засолення і накопиченням проліну (Thakur, Sharma, 2005). Автори припускають, що

синтез проліну може бути адаптивною стратегією рослин для попередження проростання зернівок у стресовому середовищі.

Водночас у ряді досліджень повідомляється про позитивний вплив екзогенного проліну на проростання зернівок і ріст рослин за умов осмотичного і сольового стресів. Наприклад, праймінг зернівок рису екзогенним проліном у низьких концентраціях сприяв їх проростанню за умов сольового стресу (Singh et al., 2018). Екзогенне застосування проліну зменшило спричинюване посухою інгібування росту *Brassica napus*, поліпшуючи показники водного режиму, вмісту хлорофілу і попереджаючи розвиток окиснювального стресу (Jurkonienė et al., 2023). В цілому обговорення внеску модуляцій вмісту проліну в процеси адаптації рослин до осмотичних стресів виходить за рамки теми нашого дослідження. Варто лише зауважити, що, незважаючи на здатність рослин істотно підвищувати вміст проліну за стресових умов, відомо і про інгібування росту та інших функцій рослин за надлишкового вмісту проліну, а також про високу токсичність продуктів його метаболізму (Meena et al., 2019). Ймовірно, що ефекти проліну (захисні або ріст-інгібувальні) залежатимуть від його клітинної компартментації та складної функціональної взаємодії з іншими компонентами стрес-протекторних систем.

5.2. Вплив мелатоніну на проростання зернівок жита і тритикале зі зниженою схожістю

Зниження схожості насіння у процесі зберігання – загальновідомий факт. Інтенсивність процесу старіння насіння та втрати ним схожості залежить від умов збирання, висушування та зберігання насіння (Hong, Ellis, 1996). У зв'язку з цим пошук прийомів, що підвищують схожість насіння, є важливим практичним завданням. В Україні її актуальність посилюється через активні воєнні дії, через які часто відсутні можливості витримування технологічних регламентів зберігання насіння.

Однією з головних причин зниження схожості насіння при їх неправильному зберіганні та прискореному старінні є порушення цілісності мембран, зумовлене утворенням у клітинах АФК і, як наслідок, активацією ПОЛ (Kurek et al., 2019).

У низці досліджень проводяться паралелі між процесами проростання зернівок та стресовою реакцією рослини (Hoekstra et al., 1999; Kranner et al., 2010). Подібність між цими процесами полягає в тому, що вони супроводжуються сприйняттям зовнішніх сигналів (насамперед про зміни температури та вологості), активацією сигнальної мережі та трансдукцією сигналів до генетичного апарату (Paparella et al., 2015). Також відомо, що швидке поглинання води може супроводжуватися різким переходом мембран з гелевого стану в рідкокристалічний та діяти як стресовий фактор (Hoekstra et al., 1999). Процеси проростання насіння супроводжуються посиленням генерації АФК, які беруть участь у формуванні редокс-сигналів, необхідних для зростання проростка (Kranner et al., 2010). Однак, посилене утворення АФК у насінні може бути однією з головних причин їхнього старіння (Kurek et al., 2019; Zhang et al., 2021). Відомо, що цей процес зумовлює характерне для старіння насіння карбонілювання білків (Rajjou et al., 2008). Також АФК-індукований окиснювальний стрес може призводити до пошкодження ДНК (Kurek et al., 2019; Afzal, 2023). Для старіючого насіння зазвичай характерний дисбаланс між утворенням АФК та його знешкодженням антиоксидантною системою (Zhang et al., 2021). У зв'язку з цим вважається, що використання антиоксидантів як праймувальних агентів може пом'якшити прояв окиснювального стресу та підвищити схожість старого насіння (Deng et al., 2017).

Мелатонін є одним з потужних антиоксидантів і регуляторів функціонування антиоксидантної системи рослин. Тому можна очікувати його позитивний вплив на проростання насіння. На цей час отримано дані про позитивний вплив мелатоніну на процеси проростання старіючого

насіння вівса (Yan et al., 2020), кукурудзи (Deng et al., 2017; Su et al., 2018) та різних видів бобових (Yu et al., 2021).

Насіння жита, а також міжродового гібриду жита та пшениці тритикале належить до чутливих до дії несприятливих факторів (Hong, Ellis, 1996). Наприклад, зародки насіння жита особливо чутливі до зміни вологості, що може спричиняти у них фрагментацію мембран (Sargent et al., 1981).

Одне із завдань нашої роботи передбачало вивчення впливу обробки мелатоніном на проростання насіння тритикале і жита з низькою схожістю та стан антиоксидантної системи проростків. Використовували насіння, яке зазнало прискореного старіння через вплив неналежного зберігання у неконтрольованих умовах. Як референсний вплив, що підвищує схожість насіння (Namdari, Baghbani, 2017), використовували гідропраймінг.

5.2.1. Схожість насіння тритикале та жита. У контрольному варіанті схожість насіння тритикале та жита була вкрай низькою, складаючи лише 39,3% і 29,7% відповідно (рис. 5.8). Гідропраймінг сприяв підвищенню кількості пророслого насіння як у тритикале, так і у жита. Застосування мелатоніну для обробки насіння виявилось ще більш ефективним, ніж гідропраймінг. Найбільш значне підвищення кількості нормально пророслого насіння відзначалося при використанні мелатоніну в концентрації 20 мкМ для обох культур (рис. 5.8).

5.2.2. Біомаса органів проростків тритикале та жита. Біомаса проростків є важливим показником їх фізіологічного стану та життєздатності. Встановлено, що гідропраймінг сприяв збільшенню маси пагонів у проростків тритикале та жита. Однак застосування мелатоніну в усіх досліджених концентраціях забезпечувало більш значне підвищення біомаси пагонів тритикале у порівнянні з гідропраймінгом (табл. 5.2).

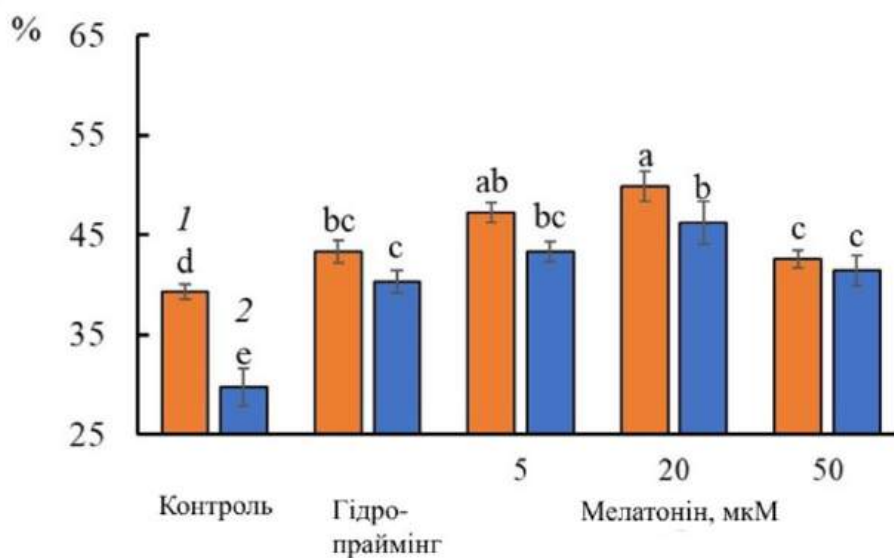


Рис. 5.8. Вплив праймінгу мелатоніном та гідропраймінгу на схожість насіння (%) тритикале (1) та жита (2). Примітка. Наведено середні значення та їх стандартні похибки для трьох повторень; різні літери над стовпчиками вказують на достовірні відмінності ($p \leq 0,05$).

Таблиця 5.2. Вплив гідропраймінгу та праймінгу мелатоніном на біомасу пагонів, коренів та всього проростка тритикале та жита

Варіант	Маса пагона (мг)	Маса кореня (мг)	Маса проростка (мг)
<i>×Triticosecale</i>			
Контроль	8.65 ± 0.20	21.8 ± 0.7	30.1 ± 1.6
Гідропраймінг	11.2 ± 0.33	22.9 ± 0.3	34.1 ± 1.6
Мелатонін, 5 мкМ	13.3 ± 0.59	23.3 ± 0.4	36.6 ± 0.9
Мелатонін, 20 мкМ	14.2 ± 0.47	24.6 ± 1.0	38.8 ± 1.9
Мелатонін, 50 мкМ	13.2 ± 0.64	22.8 ± 0.5	36.0 ± 0.6
<i>Secale cereale</i>			
Контроль	7.55 ± 0.24	12.5 ± 1.7	20.1 ± 2.3
Гідропраймінг	8.70 ± 0.12	15.3 ± 0.5	24.0 ± 0.7
Мелатонін, 5 мкМ	8.90 ± 0.07	15.9 ± 2.0	24.8 ± 2.8
Мелатонін, 20 мкМ	11.0 ± 0.28	20.9 ± 2.1	31.9 ± 2.5
Мелатонін, 50 мкМ	10.4 ± 0.60	15.8 ± 0.4	26.2 ± 0.3
HIP _{0.05}	0.97	1.6	1.9

Під впливом гідропраймінгу маса коренів суттєво збільшувалася лише у жита (табл. 5.2). Праймінг насіння жита мелатоніном у концентрації 20 мкМ викликав вірогідне підвищення біомаси коренів щодо контролю та варіанта з гідропраймінгом. Така ж концентрація мелатоніну (20 мкМ) була ефективною і для росту коренів у проростків тритикале (табл. 5.2).

При оцінці впливу гідропраймінгу та праймінгу насіння мелатоніном на біомасу проростків в цілому можна констатувати значне підвищення цього показника у проростків обох видів злаків при всіх способах передпосівної обробки. При цьому праймінг насіння тритикале мелатоніном в усіх концентраціях викликав ефекти, значно більші порівняно з гідропраймінгом. У той же час вплив праймінгу насіння жита мелатоніном на загальну біомасу проростків жита значно відрізнявся від впливу гідропраймінгу при використанні концентрацій 20 і 50 мкМ, але не 5 мкМ (табл. 5.2). В цілому ж вплив мелатоніну в концентрації 20 мкМ був найбільш ефективним як на схожість насіння, так і на формування проростків з насіння для обох видів злаків (рис. 5.9). У зв'язку з цим при подальшій оцінці показників, що характеризують стан антиоксидантної системи в проростках мелатонін використовували тільки в концентрації 20 мкМ.

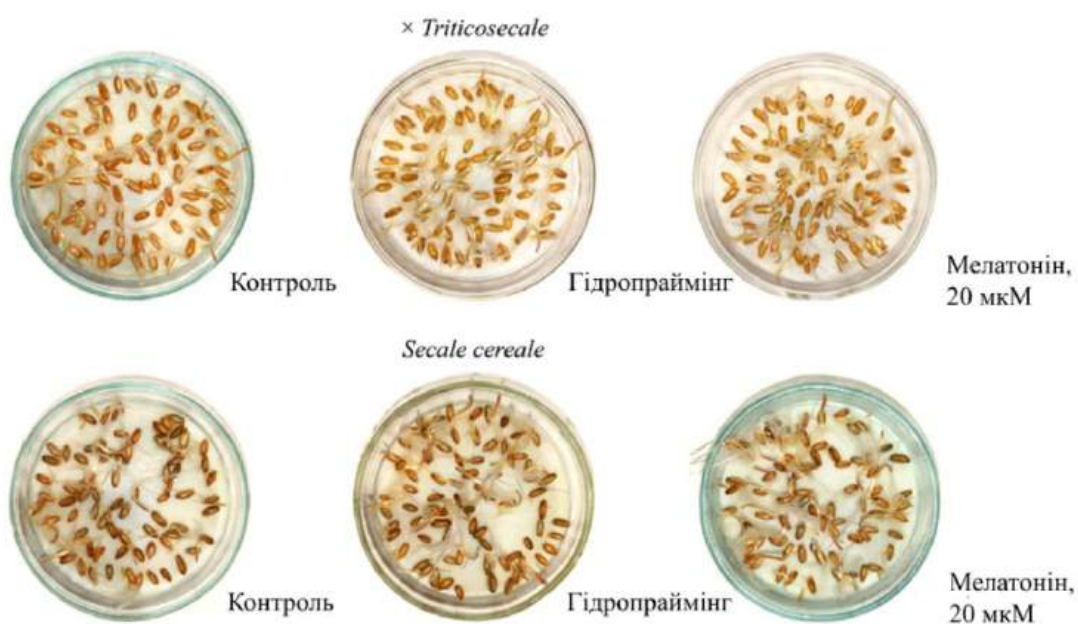


Рис. 5.9. Стан 3-денних проростків тритикале та жита, отриманих з витриманого насіння.

5.2.3. Генерація активних форм кисню та рівень пероксидного окиснення ліпідів у проростках. Проростки двох видів злаків відрізнялися за базовим рівнем генерації супероксидного аніон-радикала, у жита цей показник виявився вищим, ніж у тритикале (рис. 5.10, А).

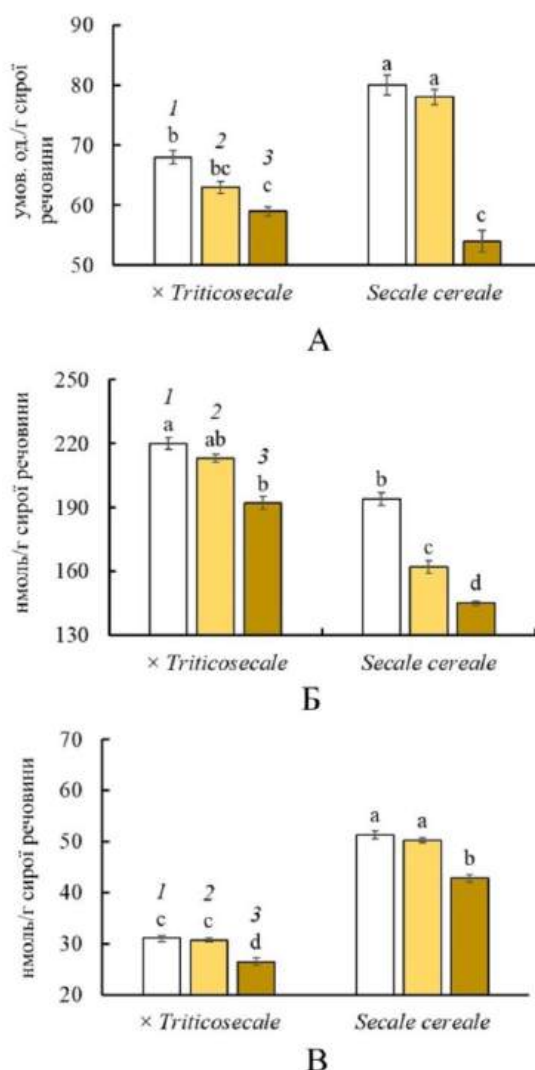


Рис. 5.10. Генерація супероксидного аніон-радикалу (А), пероксиду водню (Б) та вміст МДА (В) у проростках тритикале та жита. 1 - контроль; 2 - гідропраймінг; 3 - мелатонін, 20 мкМ. Примітка. Наведено середні значення та їхні стандартні похибки для трьох повторень; різні літери над стовпчиками вказують на достовірність відмінностей ($p \leq 0,05$).

У пагонах проростків, отриманих з насіння, підданих гідропраймінгу, генерація O_2^- значно не відрізнялася від контролю в обох культур. У той же час у проростків тритикале і жита, вирощеного з насіння, праймованого

мелатоніном, генерація супероксидного аніон-радикала була на 13 і 32% нижчою, ніж у відповідних контрольних варіантах (рис. 5.10, А).

Вміст пероксиду водню в пагонах проростків жита у варіанті з гідропраймінгом був значно нижчим, ніж у контролі, в той же час у тритикале такий ефект виявлявся слабо (рис. 5.10, В). Обробка насіння мелатоніном спричиняла зниження вмісту пероксиду водню в пагонах проростків обох видів.

Уміст продукту ПОЛ МДА вищим виявився у проростків жита (рис. 5.10, С). Гідропраймінг не впливав на цей показник у обох видів злаків. У той же час обробка насіння мелатоніном викликала значне зниження вмісту МДА у проростках проростків тритикале та жита (рис. 5.10, С).

5.2.4. Активність антиоксидантних ферментів. Активність СОД у пагонах проростків обох видів суттєво не відрізнялася (рис. 5.11, А). Під впливом гідропраймінгу вона не змінювалася у тритикале, але підвищувалася у жита. В обох видів злаків у проростках, вирощених із насіння, оброблених мелатоніном, активність ферменту була вищою, ніж у контролі та варіантах з гідропраймінгом.

Активність каталази в пагонах проростків тритикале та жита контрольних варіантів, як і активність СОД, не відрізнялася (рис. 5.11, В). У варіанті з гідропраймінгом вона не змінювалася у тритикале, але збільшувалася в жита. Праймінг насіння тритикале мелатоніном викликав підвищення активності каталази відносно контролю та варіанта з гідропраймінгом. У той же час у жита у варіанті з мелатоніном активність ферменту була приблизно такою самою, як у варіанті з гідропраймінгом.

Активність гваяколпероксидази в контрольних варіантах у жита була більш ніж у 2 рази вищою, ніж у тритикале (рис. 5.11, С). Гідропраймінг слабо впливав на активність ферменту у тритикале, але викликав її підвищення в пагонах проростків жита. Обробка мелатоніном спричиняла значне підвищення активності гваяколпероксидази у тритикале. У проростків жита праймінг мелатоніном також викликав підвищення активності

ферменту, проте цей ефект був менш суттєвим у порівнянні з гідропраймінгом.

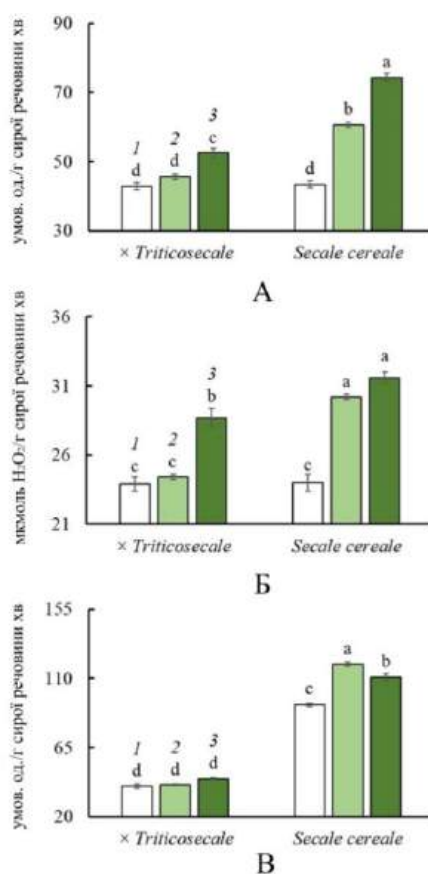


Рис. 5.11. Активність супероксиддисмутази (А), каталази (Б) та гваяколпероксидази (В) у проростках тритикале та жита. 1 - контроль; 2 - гідропраймінг; 3 - мелатонін, 20 мкМ. Примітка. Наведено середні значення та їхні стандартні похибки для трьох повторень; різні літери над стовпчиками вказують на достовірність відмінностей ($p \leq 0,05$).

5.2.5. Вміст антоціанів у пагонах проростків. Проростки жита відрізнялися значно вищим вмістом антоціанів у контрольному варіанті порівняно з проростками тритикале (рис. 5.12). Під впливом гідропраймінгу цей показник збільшувався в обох видів злаків. Ще більш істотне підвищення вмісту антоціанів у пагонах як проростків тритикале, так і жита, спостерігалось у варіанті з праймінгом мелатоніном.

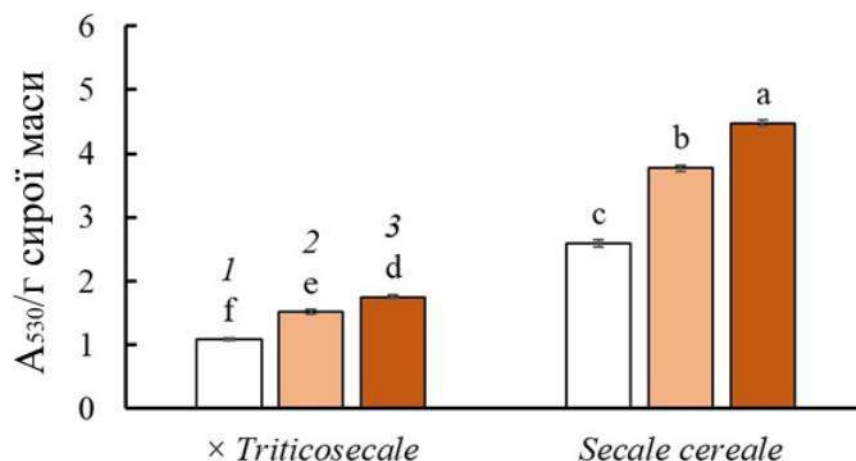


Рис. 5.12. Вміст антоціанів у пагонах проростків тритикале та жита. 1 - контроль; 2 - гідропраймінг; 3 - мелатонін, 20 мкМ. Примітка. Наведено середні значення та їх стандартні похибки для трьох повторень; різні літери над стовпчиками вказують на достовірність відмінностей ($p \leq 0,05$).

5.2.6. Можливі механізми впливу мелатоніну на проростання насіння злаків з низькими посівними якість. Проведені нами дослідження свідчать про посилення проростання насіння тритикале та жита з порушеною схожістю та активацію росту проростків під впливом праймінгу мелатоніном. При цьому ефекти обробки мелатоніном значно перевершували вплив гідропраймінгу, який вважається одним із найпростіших способів підвищення схожості насіння різних сільськогосподарських культур і використовується як референсний варіант при оцінці ефективності інших прийомів індукування проростання насіння (Paparrella et al., 2015; Waqas et al., 2019). Слід зазначити, що прояв будь-якої фізіологічної активності мелатоніну на тритикале та житі раніше майже не вивчався. Так, стосовно тритикале відома лише одна робота, в якій показано посилення проростання насіння з нормальною схожістю, але на тлі посухи (Guo et al., 2022). У той же час здатність мелатоніну індукувати проростання насіння, у тому числі має низьку схожість, показано на ряді інших видів рослин (Dawood, 2018). Так, праймінг мелатоніном підвищував схожість насіння вівса, яка була попередньо знижена шляхом прискореного старіння, спричинюваного

тривалою дією високої температури (Yan et al., 2020). При цьому обробка мелатоніном зменшувала показники окислювального стресу (зміст H_2O_2 і МДА) та усувала зниження активності СОД, каталази, аскорбатпероксидази та глутатіонредуктази в зародках насіння, спричинюване старінням. Також показано, що обробка мелатоніном викликала істотні зміни в протеомі проростаючого насіння, зокрема збільшення вмісту 96 білків. Крім того, у праймованому мелатоніном насінні активувався метаболізм амінокислот та синтез фенілпропаноїдів (Yan et al., 2021). Подібні результати були отримані і в експериментах з насінням кукурудзи, схожість яких була порушена короточасним впливом температури 70°C та підвищеної вологості (Deng et al., 2017). У цій роботі також зафіксовано позитивний вплив мелатоніну на активність СОД та каталази. Обробка насіння рису мелатоніном збільшувала їх схожість, сприяла посиленому росту рослин на ранніх фазах розвитку, а також підвищувала загальну продуктивність рослин у ході онтогенезу (Tuagi et al., 2023).

Отримані нами результати дозволяють вважати тритикале і жито культурами, чутливими до дії мелатоніну. У той же час його вплив на проростання насіння і ріст проростків цих культур був хоча і схожим, проте мав помітну специфіку. Так, вплив мелатоніну на проростання насіння тритикале був помітнішим порівняно з насінням жита. У тритикале вплив мелатоніну навіть у мінімальній концентрації значно перевищував ефект гідропраймінгу, тоді як у жита значущий при $p \leq 0.05$ ефект зафіксований тільки для концентрації 20 мкМ (рис. 5.8). Позитивний вплив мелатоніну на біомасу проростків тритикале також проявлявся при всіх використаних концентраціях, а у жита ефект низької концентрації мелатоніну не відрізнявся від дії гідропраймінгу (табл. 5.2).

Виявлено і деяку специфіку впливу мелатоніну на активність антиоксидантних ферментів у проростках. Так, мелатонін викликав підвищення активності СОД у обох злаків, проте у жита цей ефект був значно помітнішим (рис. 5.11). У той же час, обробка мелатоніном підвищувала

активність каталази у тритикале, але не впливала на цей показник у жита (рис. 5.11). І, навпаки, у жита у варіанті з мелатоніном активність пероксидази підвищувалася, а у тритикале вона не змінювалася (рис. 5.11).

Рослини жита відрізняються від інших культурних злаків інтенсивним вторинним метаболізмом, високим вмістом фенольних сполук та флавоноїдів, зокрема антоціанів (Kolupaev et al., 2022b). Вміст антоціанів у пшенично-житнього гібриду тритикале також вищий, ніж у інших злаків, при цьому накопичення антоціанів вважається їхньою важливою реакцією на дію стрес-факторів (Kolupaev et al., 2020). Цілком можливо, що одним з важливих механізмів посилення антиоксидантного захисту в насінні, що проростає, під впливом праймінгу мелатоніном є накопичення антоціанів. Цей показник суттєво збільшувався під впливом мелатоніну у проростках обох видів злаків, особливо у жита (рис. 5.12).

Отже, обробка насіння мелатоніном викликала підвищення активності антиоксидантних ферментів у проростках тритикале і жита та накопичення в них антоціанів. Таке посилення функціонування антиоксидантної системи, очевидно, значно зменшувало прояв окиснювального стресу, що було зафіксовано за зниженням генерації АФК у проростках та зменшенням вмісту МДА. У свою чергу ці процеси, ймовірно, відігравали важливу роль у нормалізації проростання насіння. Механізми посилення мелатоніном функціонування антиоксидантної системи потребують спеціальних досліджень. Можливо, підвищення активності антиоксидантних ферментів під впливом мелатоніну зумовлене посиленням експресії їх генів за допомогою формування відповідних сигналів.

Безумовно, позитивний вплив праймінгу мелатоніном на проростання старого насіння тритикале та жита мелатоніном не обмежується лише його впливом на вивчений нашої роботі стан антиоксидантної системи. Дія мелатоніну, мабуть, тією чи іншою мірою зачіпає багато регуляторних систем, включаючи гормональну (Li et al., 2017), і багато метаболічних процесів, у тому числі гідроліз запасних біополімерів (Cui et al., 2017; Lei et al., 2021), що

важливо для проростання. Можна сподіватися, що подальше вивчення видових особливостей функціонування цих систем у різних злаків, у тому числі тритикале та жита, дозволить використовувати мелатонін як нову регулярну молекулу рослин для цілеспрямованого коригування їх функцій.

Висновки до розділу 5

Праймінг зернівок пшениці мелатоніном за умов модельної посухи (вплив ПЕГ 6000) і сольового стресу підвищував їх схожість, посилював ріст проростків, а також збільшував співвідношення між біомасою пагонів і коренів. При цьому обробка мелатоніном пом'якшувала спричинюване стресами інгібування амілази і сприяла накопиченню розчинних вуглеводів у пагонах проростків. Під впливом мелатоніну зменшувалися показники генерації АФК і прояву окиснювальних пошкоджень у клітинах пагонів проростків пшениці. Водночас обробка мелатоніном сприяла збільшенню активності одного з ключових антиоксидантних ферментів – каталази. Отже, короткочасна обробка зернівок пшениці розчинами мелатоніну з наступним висушуванням до вихідної вологості може бути практичним інструментом для підвищення схожості насіння і стійкості рослин до стресів, що спричиняють зневоднення.

Праймінг старого насіння тритикале і жита мелатоніном істотно підвищував їх схожість, а також посилював ріст проростків. Дія мелатоніну значно перевершувала ефекти гідропраймінгу насіння, який також підвищував їх схожість. Однією з причин підвищення схожості старого насіння тритикале та жита під впливом мелатоніну може бути пом'якшення окислювального стресу, що супроводжує проростання насіння. На це вказує зменшення генерації супероксидного аніон-радикала та вмісту пероксиду водню і МДА у проростках, а також підвищення в них активності антиоксидантних ферментів та вмісту антоціанів, відомих потужною антиоксидантною дією.

ВИСНОВКИ

Праймінг насіння зернових злаків мелатоніном або обробка ним проростків спричиняє помітне підвищення стійкості до дії абіотичних стресорів. Ефекти мелатоніну реалізуються за участі АФК та іонів кальцію як сигнальних посередників. Обробка зернівок мелатоніном підвищує схожість злаків з низькими посівними якостями та позитивно впливає на проростання насіння за несприятливих умов. Стрес-протекторні ефекти мелатоніну проявляються за дії чинників різної природи (високих температур, модельної посухи або засолення), за різної сили стресових впливів (потенційно летальний або помірний, що спричиняє інгібування росту, а не загибель рослин) і характерні для різних видів і сортів зернових злаків, хоча прояв таких ефектів залежить від генотипу рослин. Використання екзогенного мелатоніну може бути ефективним інструментом для регулювання росту і стійкості злаків у практиці рослинництва.

1. Обробка мелатоніном (надходження через корені) спричиняла підвищення виживаності проростків пшениці після потенційно летального нагріву (10-хвилинний прогрів проростків у водяному термостаті за температури 45°C). Такий ефект супроводжувався зменшенням окиснювальних ушкоджень проростків і підвищенням активності антиоксидантних ферментів.

2. Індукування теплостійкості проростків пшениці екзогенним мелатоніном відбувається за участі АФК та іонів кальцію як сигнальних посередників. На це вказує транзиторне підвищення генерації коренями супероксидного аніон-радикала і пероксиду водню, яке усувалося хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА та неоміцином – інгібітором залежного від фосфоліпази С надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів. Водночас практично не відбувалося індукованого

мелатоніном посилення генерації АФК, активації антиоксидантних ферментів і підвищення теплостійкості проростків за їх попередньої обробки антиоксидантом ДМТС та інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом.

3. Праймінг насіння мелатоніном зменшував інгібування росту проростків пшениці і жита, спричинюване дією помірного теплового стресу (6-годинний вплив температури 44°C у повітряному термостаті), що поєднувався з помірною повітряною посухою (вологість повітря 42-45%). При цьому обробка мелатоніном сприяла підтриманню близького до значень контролю вмісту води в органах проростків. У проростків пшениці вказані ефекти мелатоніну проявлялися більш помітно, ніж у проростків жита.

4. Обробка насіння пшениці і жита мелатоніном перешкоджала розвитку окиснювального стресу, спричинюваного дією високої температури і зневоднення, що виявлялося у зниженні показників генерації супероксидного радикала, вмісту пероксиду водню і малонового діальдегіду у пагонах проростків пшениці і жита. Також обробка зернівок обох видів злаків мелатоніном спричиняла підвищення активності каталази та сприяла стабілізації активності пероксидази на фоні теплового стресу у пшениці і викликала її підвищення у жита. Крім того, обробка зернівок мелатоніном спричиняла підвищення вмісту розчинних вуглеводів за дії високої температури.

5. В умовах імітованої ґрунтової посухи (вплив на корені осмотичного стресу, створюваного ПЕГ 6000) обробка мелатоніном пом'якшувала інгібування накопичення біомаси проростками пшениці, а також окиснювальні ушкодження клітин. За впливу мелатоніну стабілізувалася активність ключових антиоксидантних ферментів, а також кількість розчинних вуглеводів і вторинних метаболітів. Водночас обробка мелатоніном в умовах модельної посухи викликала суттєве підвищення вмісту проліну у нестійкого сорту пшениці і не впливала на цей показник у стійкого. В цілому більш помітний стрес-протекторний вплив мелатонін чинив на проростки чутливого до посухи сорту пшениці.

6. Праймінг зернівок пшениці мелатоніном за умов осмотичного і сольового стресів підвищував їх схожість. При цьому обробка насіння мелатоніном пом'якшувала спричинюване стресами інгібування амілази у проростаючих зернівках, сприяла накопиченню цукрів у пагонах і пом'якшувала прояв окиснювального стресу при проростанні зернівок у несприятливих умовах.

7. Обробка мелатоніном насіння тритикале і жита, яке попередньо піддавалося прискореному старінню внаслідок неналежного зберігання у неконтрольованих умовах, істотно підвищувала схожість та посилювала ріст проростків. Цей ефект може бути пов'язаний з перешкоджанням обробкою мелатоніном розвитку окислювального стресу, що супроводжує проростання насіння. Про це свідчить підвищення в проростках, отриманих з праймованого мелатоніном насіння, активності СОД і каталази та вмісту антоціанів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- 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 і генетика*. 2023. 55, № 2. С. 119—141. <https://doi.org/10.15407/frg2023.02.119>
- Agathokleous E, Zhou B, Xu J, Ioannou A, Feng Z, Saitanis CJ, Frei M, Calabrese EJ, Fotopoulos V. Exogenous application of melatonin to plants, algae, and harvested products to sustain agricultural productivity and enhance nutritional and nutraceutical value: A meta-analysis. *Environmental Research* (2021) 200:111746.
- Ahammed GJ, Xu W, Liu A, Chen S. Endogenous melatonin deficiency aggravates high temperature-induced oxidative stress in *Solanum lycopersicum* L. *Environmental and Experimental Botany* (2019) 161:303-311.
- Ahmad S, Kamran M, Ding R, Meng X, Wang H, Ahmad I, Fahad S, Han Q. Exogenous melatonin confers drought stress by promoting plant growth, photosynthetic capacity and antioxidant defense system of maize seedlings. *PeerJ* (2019) 7:e7793. <https://doi.org/10.7717/peerj.7793>
- Ahmad S, Su W, Kamran M, Ahmad I, Meng X, Wu X, Javed T, Han Q (2020) Foliar application of melatonin delay leaf senescence in maize by improving the antioxidant defense system and enhancing photosynthetic capacity under semi-arid regions. *Protoplasma* 257:1079–1092. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01491-3>
- Akula R, Mukherjee S. New insights on neurotransmitters signaling mechanisms in plants. *Plant Signaling & Behavior* (2020) 15(6):1737450. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1737450>
- Alam M N, Zhang L, Yang L , Islam M R, Liu Y, Luo H, Yang P, Wang Q, Chan Z. (2018). Transcriptomic profiling of tall fescue in response to heat stress and

- improved thermotolerance by melatonin and 24-epibrassinolide. *BMC Genomics* 19 (1), art. 224. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4588-y>
- Altaf MA, Shahid R, Ren MX, Mora-Poblete F, Arnao MB, Naz S, Anwar M, Altaf MM, Shahid S, Shakoor A, Sohail H, Ahmar S, Kamran M, Chen JT. Phytomelatonin: An overview of the importance and mediating functions of melatonin against environmental stresses. *Physiologia Plantarum* (2021) 172 (2), pp. 820-846. <https://doi.org/10.1111/ppl.13262>
- Alybayev S, Smekenov I, Kuanbay A, Sarbassov D, & Bissenbaev A. (2024). Gibberellic-acid-dependent expression of α -amylase in wheat aleurone cells is mediated by target of rapamycin (TOR) signaling. *Current Plant Biology*, 37, 100312. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2023.100312>
- Antoniou C, Chatzimichail G, Xenofontos R, Pavlou JJ, Panagiotou E, Christou A, Fotopoulos V. Melatonin systemically ameliorates drought stress-induced damage in *Medicago sativa* plants by modulating nitro-oxidative homeostasis and proline metabolism. *Journal of Pineal Research* (2017) 62(4), 10.1111/jpi.12401. <https://doi.org/10.1111/jpi.12401>
- Arnao MB, and Hernández-Ruiz J. Melatonin and reactive oxygen and nitrogen species: a model for the plant redox network. *Melatonin Research* (2019a) 2, 152–168. doi: 10.32794/11250036
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2013) Growth conditions determine different melatonin levels in *Lupinus albus* L. *J Pineal Res* 55:149–155. <https://doi.org/10.1111/jpi.12055>
- Arnao MB, Hernandez-Ruiz J (2015) Functions of melatonin in plants: a review. *J Pineal Res* 59:133–150. <https://doi.org/10.1111/jpi.12253>
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J. Melatonin: A New Plant Hormone and/or a Plant Master Regulator?. *Trends in Plant Science* (2019b) 24(1):38-48.
- Arora D, Bhatla SC. Melatonin and nitric oxide regulate sunflower seedling growth under salt stress accompanying differential expression of Cu/ZnSOD and MnSOD. *Free Radical Biology and Medicine* Med. (2017), 106, 315–328.

- Arora D, Bhatla SC. Nitric oxide triggers a concentration-dependent differential modulation of superoxide dismutase (FeSOD and Cu/ZnSOD) activity in sunflower seedling roots and cotyledons as an early and long. *Plant Signaling & Behavior* (2015) 10 (10), e1071753. doi: 10.1080/15592324.2015.1071753
- Arora D, Jain P, Singh N, Kaur H, Bhatla, SC. Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants. *Free Radical Biology and Medicine* (2016) 50 (3), 291–303. doi: 10.3109/10715762.2015.1118473
- Ashraf M, & Foolad M R. (2007). Improving plant abiotic-stress resistance by exogenous application of osmoprotectants glycine, betaine and proline. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206-216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.08.007>
- Awan SA, Khan I, Wang Q, Gao J, Tan X and Yang F (2023) Pre-treatment of melatonin enhances the seed germination responses and physiological mechanisms of soybean (*Glycine max* L.) under abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* 14:1149873. doi: 10.3389/fpls.2023.1149873
- Ayyaz A, Shahzadi AK, Fatima S, Yasin G, Zafar Z Ul, Athar HR, Farooq MA. Uncovering the role of melatonin in plant stress tolerance. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* (2022) 34:335–346 <https://doi.org/10.1007/s40626-022-00255-z>
- Back K, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin biosynthesis in plants: Multiple pathways catalyze tryptophan to melatonin in the cytoplasm or chloroplasts. *Journal of Pineal Research* (2016) 61, 426–437.
- Back K. Melatonin metabolism, signaling and possible roles in plants. *The Plant Journal* (2021) 105, pp. 376-391. <https://doi.org/10.1111/tpj.14915>
- Barrs H, Weatherley P (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust J Biol Sci* 15(3):413–428.
- Bates LS, Walden RP, Tear GD (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39:205–210. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>

- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírveda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intralaboratory 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*, 95:204-209.
- Boroday Y.S., Lykholat T.Y., Lykholat Y.V. (2023). Dynamics of SOD activity and accumulation of TBA-active products in the process of ontogeny of some sod-forming plants in a megalopolis. *Ecology and Noospherology*, 34(2), 112-116. <https://doi.org/10.15421/032317>
- Buttar ZA, Wu SN, Arnao MB, Wang C, Ullah I, Wang C. Melatonin suppressed the heat stress-induced damage in wheat seedlings by modulating the antioxidant machinery. *Plants (Basel)* (2020) 9 (7), art. 809. <https://doi.org/10.3390/plants9070809>
- Byeon Y, Back K. Melatonin synthesis in rice seedlings in vivo is enhanced at high temperatures and under dark conditions due to increased serotonin N-acetyltransferase and N-acetylserotonin methyltransferase activities. *Journal of Pineal Research* (2014) 56, pp. 189-195. <https://doi.org/10.1111/jpi.12111>
- Byeon Y, Lee HY, Hwang OJ, Lee HJ, Lee K, Back K. Coordinated regulation of melatonin synthesis and degradation genes in rice leaves in response to cadmium treatment. *Journal of Pineal Research* (2015) 58 (4), pp. 470-478. <https://doi.org/10.1111/jpi.12232>
- Cannon AE, Chapman KD. Lipid Signaling through G Proteins. *Trends in Plant Science* (2021), 26, 720–728.
- Cao L, Jin XJ, Zhang YX. Melatonin confers drought stress tolerance in soybean (*Glycine max* L.) by modulating photosynthesis, osmolytes, and reactive oxygen metabolism. *Photosynthetica* (2019) 57: 812–819
- Chang J, Guo Y, Li J, Su Z, Wang C, Zhang R, Wei C, Ma J, Zhang X, Li H. Positive Interaction between H₂O₂ and Ca²⁺ Mediates Melatonin-Induced CBF Pathway and Cold Tolerance in Watermelon (*Citrullus lanatus* L.). *Antioxidants* (2021), 10, 1457. <https://doi.org/10.3390/antiox10091457>

- Chen L, Liu L, Lu B, Ma T, Jiang D, Li J, et al. (2020) Exogenous melatonin promotes seed germination and osmotic regulation under salt stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *PLoS ONE* 15(1): e0228241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228241>
- Chen Z, Xie Y, Gu Q, Zhao G, Zhang Y, Cui W, Xu S, Wang R and Shen W, The Atrboh F-dependent regulation of ROS signaling is required for melatonin-induced salinity tolerance in *Arabidopsis*, *Free Radical Biology and Medicine* (2017) <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.009>
- Choi GH, Lee HY, Back K. Chloroplast overexpression of rice caffeic acid O-methyltransferase increases melatonin production in chloroplasts via the 5-methoxytryptamine pathway in transgenic rice plants. *Journal of Pineal Research* (2017) 63:e12412. doi: 10.1111/jpi.12412
- Colombage R, Singh MB, Bhalla PL (2023) Melatonin and abiotic stress tolerance in crop plants. *Int J Mol Sci* 24:7447. <https://doi.org/10.3390/ijms24087447>
- Cui G, Sun F, Gao X, Xie K, Zhang C, Liu S, Xi Y (2018) Proteomic analysis of melatonin-mediated osmotic tolerance by improving energy metabolism and autophagy in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta* 248(1):69–87. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2881-2>
- Cui G, Zhao X, Liu S, Sun F, Zhang C, Xi Y. Beneficial effects of melatonin in overcoming drought stress in wheat seedlings. *Plant physiology and biochemistry* (2017) 118, 138–149. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.014>
- Damalas CA, Koutroubas SD. Exogenous application of salicylic acid for regulation of sunflower growth under abiotic stress: a systematic review. *Biologia* (2022) 77, 1685–1697 <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01020-y>
- Daryanto S, Wang L, Jacinthe PA. Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. *PLoS One* (2016) 11(5): e0156362. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156362>]
- Demidchik V, Shabala SN, Davies JM Spatial variation in H₂O₂ response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal Ca²⁺ flux and plasma membrane Ca²⁺

- channels. *Plant J.* (2007) 49(3), pp. 377–386. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02971.x>
- Deng B, Yang K, Zhang Y, Li Z. Can antioxidant's reactive oxygen species (ROS) scavenging capacity contribute to aged seed recovery? Contrasting effect of melatonin, ascorbate and glutathione on germination ability of aged maize seeds. *Free Radical Res.*, (2017) 51(9–10), pp/ 765–771. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1375>
- Dey P, Pattanaik D, Mohapatra D, Saha D, Dash D, Mishra A. et al. Gasotransmitters signaling and their crosstalk with other signaling molecules under diverse stress conditions in plants. *South Afr. J. Bot.* (2024) 169, pp. 119–133. doi: 10.1016/j.sajb.2024.03.041
- Dos Reis SP, Lima AM, De Souza. C.R.B. Recent Molecular Advances on Downstream Plant Responses to Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences* (2012) 13, 8628–8647.
- Dubbels R, Reiter R J, Klenke E, Goebel A, Schnakenberg E, Ehlers C, Schiwara HW, Schloot W. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pineal Research* . (1995) 18, pp. 28-31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1995.tb00136.x>
- Fan J, Xie Y, Zhang Z, Chen L (2018) Melatonin: a multifunctional factor in plants. *Int J Mol Sci* 19:1528. <https://doi.org/10.3390/ijms19051528>
- Fawzi M M, & El-Fouly M Z. (1979). α -Amylase activity in serum: A new method for its determination and its application to clinical studies. *Clinica Chimica Acta*, 96(2), 237-243. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(79\)90308-3](https://doi.org/10.1016/0009-8981(79)90308-3)
- Ford PC. Reactions of NO and nitrite with heme models and proteins. *Inorganic Chemistry* (2010) 49: 6226–6239.
- Fu Y, Li P, Si Z, Ma S, Gao Y. Seeds Priming with Melatonin Improves Root Hydraulic Conductivity of Wheat Varieties under Drought, Salinity, and Combined Stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 5055. <https://doi.org/10.3390/ijms25095055>

- Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* (2010) V. 48. P. 909-930.
- Goldstein J L, & Jennings I H. (1975). A new and sensitive method for the determination of amylase activity in serum. *Journal of Clinical Pathology*, 28(2), 132-135. <https://doi.org/10.1136/jclinpath.28.2.132>
- Gong B, Yan Y, Wen D, Shi Q. Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidase: a novel downstream signaling pathway in melatonin-induced stress tolerance in *Solanum lycopersicum* . *Physiologia Plantarum* . (2017) 160(4), 396–409. doi:10.1111/ppl.12581
- Gu Q, Xiao Q, Chen Z, Han Y. Crosstalk between melatonin and reactive oxygen species in plant abiotic stress responses: An update. *International Journal of Molecular Sciences* (2022) 23:5666. <https://doi.org/10.3390/ijms23105666>
- Guo Y, Li D, Liu L, Sun H, Zhu L, Zhang K, Zhao H, Zhang Y, Li A, Bai Z, Tian L, Dong H and Li C (2022) Seed Priming With Melatonin Promotes Seed Germination and Seedling Growth of Triticale hexaploide L. Under PEG-6000 Induced Drought Stress. *Front. Plant Sci.* 13:932912. doi: 10.3389/fpls.2022.932912
- Gupta A, Rico-Medina A, Caño-Delgado AI. The physiology of plant responses to drought. *Science* (2020) 368: 266-269. <https://doi.org/10.1126/science.aaz7614>
- Hasanuzzaman M, Nahar K, & Fujita M. (2020). Regulation of Antioxidant Defense System by Melatonin in Plants. In: Khan, M.I.R., Perveen, R., & Sytar, O. (Eds.), *Melatonin: Biosynthesis, Physiological Effects, and Applications* (pp. 143-162). Springer. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-2031-5_11
- Haskirli H, Yilmaz O, Ozgur R, Uzilday B, Turkan I. Melatonin mitigates UV-B stress via regulating oxidative stress response, cellular redox and alternative electron sinks in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*. 2021, 182:112592. doi: 10.1016/j.phytochem.2020.112592.

- Hassan MU, Ghareeb RY, Nawaz M, Mahmood A, Shah AN, Abdel-Megeed A, Abdelsalam NR, Hashem M, Alamri S, Thabit MA, Qari SH. Melatonin: A Vital Pro-Tectant for Crops against Heat Stress: Mechanisms and Prospects. *Agronomy* (2022) 12:1116. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051116>
- Hattori A, Migitaka H, Iigo M, Itoh M, Yamamoto K, Ohtani-Kaneko R, Hara M, Suzuki T, Reiter RJ. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochemistry and Molecular Biology International* (1995) 35, 627–634.
- Haydari M, Maresca V, Rigano D, Taleei A, Shahnejat-Bushehri AA, Hadian J, Sorbo S, Guida M, Manna C, Piscopo M, Notariale R, De Ruberto F, Fusaro L, Basile A. Salicylic acid and melatonin alleviate the effects of heat stress on essential oil composition and antioxidant enzyme activity in *Mentha × piperita* and *Mentha arvensis* L. *Antioxidants (Basel)* (2019) 8 (11), art. 547. <https://doi.org/10.3390/antiox8110547>
- He Y, & He Y. (2020). Cadmium-induced Melatonin Synthesis in Rice: The Role of Nitric Oxide (NO) and Its Scavenger cPTIO. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(1), 134-146.
- Hoekstra F, & Crowe J H. (1999). Membrane phase transitions are responsible for imbibitional damage in germinating seeds. *Seed Science Research*, 9(2), 121–128. <https://doi.org/10.1017/S0960258599000169>
- Hong T D, & Ellis R H. (1996). A Protocol to Determine Seed Storage Behaviour. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI).
- Hossain MS, Li J, Sikdar A, Hasanuzzaman M, Uzizerimana F, Muhammad I, Yuan Y, Zhang , Wang C, Feng B. Exogenous melatonin modulates the physiological and biochemical mechanisms of drought tolerance in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn). *Molecules* (2020) 25(12):2828. <https://doi.org/10.3390/molecules25122828>
- Hu M, Shi Z, Zhang Z, Zhang Y, & Li H. (2012). Effects of exogenous glucose on seed germination and antioxidant capacity in wheat seedlings under salt

- stress. *Plant Growth Regulation*, 68(2), 177–188.
<https://doi.org/10.1007/s10725-012-9705-3>
- Hummel J, Elsheery N, Fekete M., & Szabó J. (2010). Physiological role of soluble sugars in plant response to abiotic stress. *Journal of Plant Physiology*, 42(2), 168-173.
- Hung KT, Hsu YT, Kao CH (2006) Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves. *Physiol Plant* 127:293–303.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00662.x>
- Imran M, Khan AL, Mun B-G, Bilal S, Shaffique S, Kwon E-H, Kang S-M, Yun B-W, Lee I-J, Melatonin and nitric oxide: Dual players inhibiting hazardous metal toxicity in soybean plants via molecular and antioxidant signaling cascades, *Chemosphere* 2022 308, Part 3, 136575,
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136575>
- Imran, M., Latif Khan, A., Shahzad, R., Aaqil Khan, M., Bilal, S., Khan, A., Kang, S. M., & Lee, I. J. (2021). Exogenous melatonin induces drought stress tolerance by promoting plant growth and antioxidant defence system of soybean plants. *AoB PLANTS*, 13(4):plab026.
<https://doi.org/10.1093/aobpla/plab026>
- Iqbal N, Fatma M, Gautam H, Umar S, Sofo A, D’ippolito I, Khan NA. The Crosstalk of Melatonin and Hydrogen Sulfide Determines Photosynthetic Performance by Regulation of Carbohydrate Metabolism in Wheat under Heat Stress. *Plants* (2021) 10, 1778. <https://doi.org/10.3390/plants10091778>
- Iqbal N, Fatma M, Khan NA, Umar S (2019) Regulatory role of proline in heat stress tolerance: modulation by salicylic acid. In: Khan MIR, Reddy PS, Ferrante A, Khan NA (eds) *Plant Signaling Molecules*. Elsevier, 437–448 pp.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00027-7>.
- Isayenkov SV. Physiological and molecular aspects of salt stress in plants. *Cytol Genet* (2012) 46(5):302-318.
- Ismaeil FM, Ahmed SEE, Jabereldar AA, El Naim AM, Ibrahim EA, Ahmed EEBM. Effects and Mechanisms of Melatonin Priming on Seedlings

- Establishment of two Wheat Cultivars under Salt Stress. *Asian Basic and Applied Research Journal* (2022) 4(1), 339–351. Retrieved from <https://globalpresshub.com/index.php/ABAARJ/article/view/1680>
- Ismaeil FM, Ahmed SEE, Jabereldar AA, El-Naim AM, Ahmed EEBM. Alleviation of salt stress on seed germination and seedling growth in wheat by seed priming with melatonin. *Discovery Agriculture* 2024; 10: e8da1557 doi: <https://doi.org/10.54905/disssi.v10i21.e8da1557>
- Ismaeil, F. M., Ahmed, S. E. E., Jabereldar, A. A., Ibrahim, E. A., & El-Naim, A. M. Effects of Melatonin Priming on Seed Germination of Wheat under Salt Stress. *Asian Journal of Advances in Agricultural Research*, 19(3): 1-14, 2022; Article no.AJAAR.91336
- Jahan MS, Shu S, Wang Y, Chen Z, He M, Tao M, Sun J, Guo S. Melatonin alleviates heat-induced damage of tomato seedlings by balancing redox homeostasis and modulating polyamine and nitric oxide biosynthesis. *BMC plant biology* (2019) 19(1), 414. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1992-7>
- Jalili S, Ehsanpour AA, Javadirad SM. Melatonin improves salt tolerance of in vitro root culture of alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Biologia* (2022) <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01275-5>
- Jiang X, Li H, Song X. Seed Priming with Melatonin Effects on Seed Germination and Seedling Growth in Maize under Salinity Stress. *Pakistan Journal of Botany* (2016) 48(4), 1345-1352.
- Jin G, Liu F, Ma H, Hao S, Zhao Q, Bian Z, Jia Z, Song S. Two G-protein-coupled-receptor candidates, Cand2 and Cand7, are involved in Arabidopsis root growth mediated by the bacterial quorum-sensing signals N-acyl-homoserine lactones. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2012) 417, 991–995.
- Jurkonienė, S., Mockevičiūtė, R., Gavelienė, V., Šveikauskas, V., Zareyan, M., Jankovska-Bortkevič, E., Jankauskienė, J., Žalnierius, T., & Kozeko, L. (2023). Proline Enhances Resistance and Recovery of Oilseed Rape after a

- Simulated Prolonged Drought. *Plants*, 12(14), 2718.
<https://doi.org/10.3390/plants12142718>
- Kacperska A. Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity. *Physiologia Plantarum* (2004) 122: 159–168.
- Kaya C, Higgs D, Ashraf M, Alyemeni MN, Ahmad P. Integrative roles of nitric oxide and hydrogen sulfide in melatonin-induced tolerance of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants to iron deficiency and salt stress alone or in combination. *Physiologia Plantarum* (2019a) doi:10.1111/ppl.12976
- Kaya C, Okant M, Ugurlar F, Alyemeni MN, Ashraf M, Ahmad P. Melatonin-mediated nitric oxide improves tolerance to cadmium toxicity by reducing oxidative stress in wheat plants. *Chemosphere* (2019b) 225, 627–638.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.026>
- Kaye Y, Golani Y, Singer Y, Leshem Y, Cohen G, Ercetin M, Gillaspay G, Levine A. Inositol polyphosphate 5-phosphatase7 regulates the production of reactive oxygen species and salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* (2011) 157: 229–241
- Ke Q, Ye J, Wang B, Ren J, Yin L, Deng X and Wang S (2018) Melatonin Mitigates Salt Stress in Wheat Seedlings by Modulating Polyamine Metabolism. *Front. Plant Sci.* 9:914.doi: 10.3389/fpls.2018.00914
- Keunen, E., Peshev, D., & Vangronsveld, J. (2020). Role of Soluble Sugars in Metabolism and Sensing Under Abiotic Stress. In: Shanker A., Shanker C., Venkateswarlu B. (eds) *Abiotic Stress in Plants*. Springer, Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-61153-8_14
- Khan A, Pan X, Najeeb U, Fahad S, Zahoor R, Luo H. Coping with drought: stress and adaptive mechanisms, and management through cultural and molecular alternatives in cotton as vital constituents for plant stress resilience and fitness. *Biol Res* 51, 47 (2018). <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0198-z>
- Khan MSS, Ahmed S, Ikram AU, Hannan F, Yasin MU, Wang J, Zhao B, Islam F, Chen J. Phytomelatonin: A key regulator of redox and phytohormones

- signaling against biotic/abiotic stresses. *Redox biology* (2023) 64, 102805. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102805>
- Kolupaev Y, Yemets A, Yastreb TO., Blume Y. Functional interaction of melatonin with gasotransmitters and ROS in plant adaptation to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science* (2024), 15:1505874. doi: 10.3389/fpls.2024.1505874
- Kolupaev YE, Horielova EI, Yastreb TO, Ryabchun NI (2020) State of antioxidant system in triticales seedlings at cold hardening of varieties of different frost resistance. *Cereal Res Commun* 48(2):165–171. <https://doi.org/10.1007/s42976-020-00022-3>
- Kolupaev YE, Yastreb TO, Salii AM, Kokorev AI, Ryabchun NI, Zmiievskia OA, Shkliarevskiy MA (2022) 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/za.2022.109.040>
- Kolupaev YE, Yastreb TO, Shvidenko NV, Karpets YV (2012) Induction of heat resistance of wheat coleoptiles by salicylic and succinic acids: connection of the effect with the generation and neutralization of reactive oxygen species. *Appl Biochem Microbiol* 48(5):500–505. <https://doi.org/10.1134/S0003683812050055>
- Kolupaev YE, Makaova BE, Ryabchun NI, Kokorev AI, Sakhno TV, Sakhno Y, Yastreb TO, Marenych MM. (2022). Adaptation of cereal seedlings to oxidative stress induced by hyperthermia. *Agriculture and Forestry*, 68 (4): 7-18. doi:10.17707/AgricultForest.68.4.01
- Kolupaev YuE, Blume YaB. Plant Adaptation to Changing Environment and its Enhancement. *Open Agriculture Journal* (2022) 16(Suppl-1, M1): e187433152208251. <https://doi.org/10.2174/18743315-v16-e2208251>
- Kolupaev YuE, Karpets YuV, Dmitriev AP. Signal mediators in plants in response to abiotic stress: calcium, reactive oxygen and nitrogen species. *Cytology and Genetics* (2015) 49: 338–348.

- Kolupaev YuE, Karpets YuV, Kabashnikova LF. Antioxidative System of Plants: Cellular Compartmentalization, Protective and Signaling Functions, Mechanisms of Regulation (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* (2019) 55, 441–459
<https://doi.org/10.1134/S0003683819050089>
- Kolupaev YuE, Karpets YuV, Yastreba TO, Shemet SA, Bhardwaj R. Antioxidant system and plant cross-adaptation against metal excess and other environmental stressors. In: Landi M, Shemet SA, Fedenko VS, eds. *Metal toxicity in higher plants*. New York: Nova Science Publishers (2020) p. 21-66.
- Kolupaev YuE, Karpets YuV. Participation of reactive oxygen species in formation of induced resistances of plants to abiotic stressors. In: M. Suzuki & S. Yamamoto (Eds.), *Handbook on Reactive Oxygen Species (ROS): Formation Mechanisms, Physiological Roles and Common Harmful Effects*. New York: Nova Science Publishers (2013) pp. 109-136
- Kolupaev YuE, Kokorev AI, Dmitriev AP. Polyamines: Involvement in Cellular Signaling and Plant Adaptation to the Effect of Abiotic Stressors. *Cytology and Genetics* (2022) 56, 148–163
<https://doi.org/10.3103/S0095452722020062>
- Kolupaev YuE, Taraban DA, Karpets YuV, Makaova BE, Ryabchun NI, Dyachenko AI, Dmitriev OP. Induction of Cell Protective Reactions of *Triticum aestivum* and *Secale cereale* to the Effect of High Temperatures by Melatonin. *Cytology and Genetics* (2023a) 57, 117–127
<https://doi.org/10.3103/S0095452723020068>
- Kolupaev YuE, Yastreba TO, Dmitriev AP. Signal mediators in the implementation of jasmonic acid's protective effect on plants under abiotic stresses. *Plants* (2023a) 12(14), 2631. doi: 10.3390/plants12142631
- Kolupaev YuE, Yemets AI, Yastreba TO, Blume YB. The role of nitric oxide and hydrogen sulfide in regulation of redox homeostasis at extreme temperatures in plants. *Frontiers in Plant Science* (2023c) 14:1128439. doi: 10.3389/fpls.2023.1128439

- Kosakivska IV, Vedenicheva NP, Babenko LM, Voytenko LV, Romanenko KO, Vasyuk VA. Exogenous phytohormones in the regulation of growth and development of cereals under abiotic stresses. *Molecular Biology Reports* (2022) 49(1): 617-628.
- Koster KL, Lynch DV (1992) Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. *Plant Physiol* 98(1):108–113. <https://doi.org/10.1104/pp.98.1.108>.
- Kranner I, Minibayeva FV, Beckett RP, Seal CE. (2010). What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytol.*, 188(3), pp. 655-73. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x>
- Kryzhanovsky V. (2019). Agronomic and biological characteristics of winter wheat varieties at the Mankivka Variety Testing Station. *Reports of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine*, 6, 15-21
- Kurek K, Plitta-Michalak B, & Ratajczak E. (2019). Reactive Oxygen Species as Potential Drivers of the Seed Aging Process. *Plants*, 8(6), 120. <https://doi.org/10.3390/plants8060120>
- Kurek M, Kocsy G, & Szalai G. (2019). Importance of safeguarding genome integrity in germination and seedling establishment. *Journal of Experimental Botany*, 70(12), 3095–3108. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz128>
- Lamotte O, Astier J, Besson-Bard A, & Métraux J.-P. (2014). Protein S-nitrosylation: specificity and identification strategies in plant cells. *Frontiers in Chemistry*, 2, 114.
- Lee HY, Back K. 2-Hydroxymelatonin, Rather Than Melatonin, Is Responsible for RBOH-Dependent Reactive Oxygen Species Production Leading to Premature Senescence in Plants. *Antioxidants* (2021) 10, 1728. <https://doi.org/10.3390/antiox10111728>
- Lee HY, Back K. The phytomelatonin receptor (PMRT1) Arabidopsis CAND2 is not a bona fide G protein-coupled melatonin receptor. *Melatonin Research* (2020) 3, 177–186

- Lee, H.Y. & Back, K. (2016). Mitogen-activated protein kinase pathways are required for melatonin-mediated defense responses in plants. *J. Pineal Res.*, 60, No. 3, pp. 327-335. <https://doi.org/10.1111/jpi.12314>
- Lei K, Sun S, Zhong K, Li S, Hu H, Sun C, Zheng Q, Tian Z, Dai T, Sun J. Seed soaking with melatonin promotes seed germination under chromium stress via enhancing reserve mobilization and antioxidant metabolism in wheat. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2021. 220. Art. 112241. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112241>
- Li C, Tan DX, Liang D, Chang C, Jia D, Ma F. Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behaviour in two *Malus* species under drought stress. *Journal of Experimental Botany* (2015) 66 (3), pp. 669-680. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru476>
- Li D, Batchelor WD, Zhang D, Miao H, Li H, Song S, et al. (2020) Analysis of melatonin regulation of germination and antioxidant metabolism in different wheat cultivars under polyethylene glycol stress. *PLoS ONE* 15(8):e0237536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237536>
- Li D, Zhang D, Wang H, Li Y, Li R. Physiological response of plants to polyethylene glycol (PEG-6000) by exogenous melatonin application in wheat. *Zemdirbyste-Agriculture* (2017) 104 (3), pp. 219-228. <https://doi.org/10.13080/z-a.2017.104.028>
- Li J, Liu J, Zhu T, Zhao C, Li L, & Chen M. (2019). The role of melatonin in salt stress responses. *Et International journal of molecular sciences*, 20(7), 1735. doi:10.3390/ijms20071735
- Li Y, Liu Y, Jin L, Peng R. Crosstalk between Ca²⁺ and other regulators assists plants in responding to abiotic stress. *Plants* (2022) 11, 1351
- Li ZG, Xu Y, Bai LK, Zhang SY, Wang Y. Melatonin enhances thermotolerance of maize seedlings (*Zea mays* L.) by modulating antioxidant defense, methylglyoxal detoxification, and osmoregulation systems. *Protoplasma* (2019) 256, 471–490 <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1311-4>

- Liao L, Zhou Y, Xu Y, Zhang Y, Liu X, Liu B, et al. Structural and molecular dynamics analysis of plant serotonin N-Acetyltransferase reveal an acid/base-assisted catalysis in melatonin biosynthesis. *Angewandte Chemie International Edition* (2021) 133, 12127–12133. doi: 10.1002/ange.202100992
- Liu J, Shabala S, Zhang J, Ma G, Chen D, Shabala L, Zeng F, Chen ZH, Zhou M, Venkataraman G, Zhao Q. Melatonin improves rice salinity stress tolerance by NADPH oxidase-dependent control of the plasma membrane K⁺ transporters and K⁺ homeostasis. *Plant, Cell & Environment* (2020a) 43 (11), pp. 2591–2605. <https://doi.org/10.1111/pce.13759>
- Liu N, Gong B, Jin Z, Wang X, Wei M, Yang F, Li Y, Shi Q. Sodic alkaline stress mitigation by exogenous melatonin in tomato needs nitric oxide as a downstream signal. *Journal of Plant Physiology* (2015) 186–187, 68–77.
- Luo M, Wang D, Delaplace P, Pan Y, Zhou Y, Tang W, Chen K, Chen J, Xu Z, Ma Y, Chen M (2023) Melatonin enhances drought tolerance by affecting jasmonic acid and lignin biosynthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol Biochem* 202:107974. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107974>
- Manchester LC, Coto-Montes A, Boga JA, Andersen LPH, Zhou Z, Galano A, Vriend J, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *Journal of Pineal Research* (2015) 59, 403–419
- Mannino G, Pernici C, Serio G, Gentile C, Berteà C M. Melatonin and Phytomelatonin: Chemistry, Biosynthesis, Metabolism, Distribution and Bioactivity in Plants and Animals—An Overview. *International Journal of Molecular Sciences* (2021) 22, 9996. <https://doi.org/10.3390/ijms22189996>
- Martinez V, Nieves-Cordones M, Lopez-Delacalle M, Rodenas R, Mestre TC, Garcia-Sanchez F, Rubio F, Nortes PA, Mittler R, Rivero RM. Tolerance to stress combination in tomato plants: new insights in the protective role of melatonin. *Molecules* (2018) 23 (3), art. 535. <https://doi.org/10.3390/molecules23030535>

- Matyukha V.L., Semenov S.S., Yaroshenko S.S., Didur O.O, Khromykh N.O., Lykholat Y.V. (2023). Factors impact on Winter wheat yield and grain quality in the Northern Steppe Zone of Ukraine. *Journal of Environmental Research, Engineering and Management*, 79 (4), 39-46. <https://10.5755/j01.ere.m.79.4.33482>
- Meena M, Divyanshu K, Kumar S, Swapnil P, Zehra A, Shukla V, Yadav M, & Upadhyay, RS. (2019). Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*, 5(12), e02952. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02952>
- Meng JF, Xu TF, Wang ZZ, Fang YL, Xi ZM, Zhang ZW. The ameliorative effects of exogenous melatonin on grape cuttings under water-deficient stress: antioxidant metabolites, leaf anatomy, and chloroplast morphology. *Journal of pineal research* (2014) 57(2), 200–212. <https://doi.org/10.1111/jpi.12159>
- Michalak A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants grown under stress conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 58(2), 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.07.003>.
- Mishra V, Singh P, Tripathi DK, Corpas FJ, Singh VP. Nitric oxide and hydrogen sulfide: An indispensable combination for plant functioning. *Trends in Plant Science* (2021) 26(12): 1270-85.
- Muhammad I, Yang L, Ahmad S, Farooq S, Khan A, Muhammad N, Ullah S, Adnan M, Ali S, Liang Q P, & Zhou X B. (2023). Melatonin-priming enhances maize seedling drought tolerance by regulating the antioxidant defense system. *Plant physiology*, 191(4), 2301–2315. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad027>
- Mukherjee Soumya, Khan MN, Mathur P. Exogenous calcium (Ca²⁺) and verapamil-sensitive Ca²⁺ channel activity differentially modulates melatonin-mediated regulation of endogenous hydrogen sulphide (H₂S) homeostasis, and L-cysteine desulphhydrase (LDES) activity in NaCl-stressed etiolated

- sunflower seedlings. *South African Journal of Botany* (2023) 152 124-135.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.11.029>
- Mur LAJ, Mandon J, Persijn S, et al. Nitric oxide in plants: An assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants* (2013) 5(0):pls052
- Nabaei M, Amooaghaie R. Nitric oxide is involved in the regulation of melatonin-induced antioxidant responses in *Catharanthus roseus* roots under cadmium stress. *Botany* (2019) 97(12): 681-690. <https://doi.org/10.1139/cjb-2019-0107>
- Nawaz K, Chaudhary R, Sarwar A, Ahmad B, Gul A, Hano C, Abbasi BH, Anjum S. Melatonin as master regulator in plant growth, development and stress alleviator for sustainable agricultural production: current status and future perspectives. *Sustainability* (2021) 13, art. 294.
<https://doi.org/10.3390/su13010294>
- Nogués S, & Baker NR. (2000). A simple and rapid method for anthocyanin determination in plant tissues. *Plant, Cell & Environment*, 23(10), 1103-1108.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00608.x>
- Paparella S, De Micco V, & Aronne G. (2015). Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant Biology*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1784-y>
- Plokhovska SH, Kravets EA, Yemets AI, Blume YB. Crosstalk Between Melatonin and Nitric Oxide in Plant Development and UV-B Stress Response. In: S. Kataria, V. Pratap Singh (eds.), *UV-B Radiation and Crop Growth, Plant Life and Environment Dynamics* (2023) (pp.319-339) https://doi.org/10.1007/978-981-19-3620-3_15
- Rajjou L, Lovigny Y, Groot SPC, Belghaz M, Job C, Job D. (2008). Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: a comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiol.*, 148, pp. 620-641.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.123141>
- Raza A, Charagh S, García-Caparrós P, Rahman MA, Ogwugwa VH, Saeed F, Jin W (2022) Melatonin-mediated temperature stress tolerance in plants. *GM*

Crops & Food 13(1):196–217.

<https://doi.org/10.1080/21645698.2022.2106111>

- Raza A, Salehi H, Rahman MA, Zahid Z, Madadkar Haghjou M, Najafi-Kakavand S, Charagh S, Osman HS, Albaqami M, Zhuang Y, Siddique KHM, Zhuang W. Plant hormones and neurotransmitter interactions mediate antioxidant defenses under induced oxidative stress in plants. *Frontiers in Plant Science* (2022) 13:961872. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.961872>
- Rehaman A, Mishra AK, Ferdose A, Per TS, Hanief M, Jan AT, Asgher M. Melatonin in Plant Defense against Abiotic Stress. *Forests* (2021) 12, 1404. <https://doi.org/10.3390/f12101404>
- Rhoads DM, Umbach AL, Subbaiah CC, Siedow JN (2006) Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol* 141(2):357–366. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079129>
- Romanenko KO, Babenko LM, Smirnov OE, Kosakivska IV (2022) Antioxidant protection system and photosynthetic pigment composition in *Secale cereale* subjected to short-term temperature stresses. *Open Agric J* 16: e187433152206273. <https://doi.org/10.2174/18743315-v16-e220627>.
- Sadak M S. (2016). Mitigation of salinity adverse effects of on wheat by grain priming with melatonin. *International Journal of ChemTech Research*, 9(2), 85-97.
- Sagisaka S (1976) The occurrence of peroxide in a perennial plant *Populus Gelrica*. *Plant Physiol* 57(2):308–309. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.308>
- Sako K, Nguyen MH, Seki M. Advances in chemical priming to enhance abiotic stress tolerance in plants. *Plant and Cell Physiology* (2020) 61(12), pp. 1995-2003. <https://doi.org/pcp/pcaa119>
- Santolini J, André F, Jeandroz S, Wendehenne D. Nitric oxide synthase in plants: where do we stand? *Nitric. Oxide* (2017) 63, pp. 30–38. doi: 10.1016/j.niox.2016.09.005

- Scandalios, J. G. (1997). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(3), 359–378. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00317-8)
- Sen A, Johnson R, Puthur JT. Seed priming: A Cost-effective Strategy to Impart Abiotic Stress Tolerance. In: Husen A. (ed.), *Plant Performance Under Environmental Stress*, Springer Nature Switzerland AG 2021, p. 459. https://doi.org/10.1007/978-3-030-78521-5_18
- Sghayar S, Debez A, Lucchini G, Abruzzese A, Zorrig W, Negrini N, Morgutti S, Abdelly C, Sacchi GA, Pecchioni N, Vaccino P. (2023). Seed priming mitigates high salinity impact on germination of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by improving carbohydrate and protein mobilization. *Plant Direct*, 7(6), e497. <https://doi.org/10.1002/pld3.497>
- Shaheen S, Lalarukh I, Ahmad J, Zulqadar S A, Alharbi S A, Hareem M, & Ansari M J. (2024). Physio-biochemical mechanism of melatonin seed priming in stimulating growth and drought tolerance in bread wheat. *BMC Plant Biology*, 24(1), 918. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05639-8>
- Sharafi Y, Aghdam MS, Luo Z , Jannatizadeh A, Razavi F, Fard R, Farmani B. Melatonin treatment promotes endogenous melatonin accumulation and triggers GABA shunt pathway activity in tomato fruits during cold storage. *Scientia Horticulturae* (2019) 254 222–227. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.056>
- Sharma P, Jha R, Dubey R, & Pessarakli M. (2019). Role of phenolic compounds in plant responses to environmental stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 159, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.01.009>.
- Shi H, Jiang C, Ye T, Tan DX, Reiter RJ, Zhang H, Liu R, Chan Z. Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L). Pers.] by exogenous melatonin. *Journal of experimental botany* (2015b) 66(3), 681–694. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru373>

- Shi H, Tan DX, Reiter RJ, Ye T, Yang F, Chan Z. Melatonin induces class A1 heat-shock factors (HSFA1s) and their possible involvement of thermotolerance in Arabidopsis. *Journal of Pineal Research* (2015a) 58 (3), pp. 335-342. <https://doi.org/10.1111/jpi.12219>
- Shi Y, Ding Y, Yang S. Molecular Regulation of CBF Signaling in Cold Acclimation. *Trends in plant science* (2018) 23(7), 623–637. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.002>
- Shkliarevskiy MA, Karpets YV, Kolupaev YE, Lugovaya AA, Dmitriev AP (2020) Calcium-dependent changes in cellular redox homeostasis and heat resistance of wheat plantlets under influence of hemin (carbon monoxide donor). *Cytol Genet* 54(6):522–530. <https://doi.org/10.3103/S0095452720060109>
- Shreya S, Supriya L, Padmaja G. Melatonin induces drought tolerance by modulating lipoxygenase expression, redox homeostasis and photosynthetic efficiency in *Arachis hypogaea* L. *Frontiers in Plant Science* (2022) 13:1069143. doi: 10.3389/fpls.2022.106914
- Siddiqui MH, Alamri S, Al-Khaishany MY, Khan MN, Al-Amri A, Ali HM, Alaraidh IA, Alsahli AA. Exogenous Melatonin Counteracts NaCl-Induced Damage by Regulating the Antioxidant System, Proline and Carbohydrates Metabolism in Tomato Seedlings. *International journal of molecular sciences* (2019) 20(2), 353. <https://doi.org/10.3390/ijms20020353>
- Signorelli S, Coitino EL, Borsani O, Monsa J (2014) Molecular mechanisms for reactions between OH radicals and proline. *J Phys Chem* 118(1):137–147. <https://doi.org/10.1021/jp407773u>.
- Singh M, Singh A K, Nehal N, & Sharma N. (2018). Effect of proline on germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) under salt stress. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1), 2449-2452.
- Sun H, Cao X, Wang X, Zhang W, Li W, Wang X, Liu S, Lyu D. RBOH-dependent hydrogen peroxide signaling mediates melatonin-induced anthocyanin biosynthesis in red pear fruit. *Plant Science* (2021) 313, 111093.

- Sun L, Li X, Wang Z, Sun Z, Zhu X, Liu S, Song F, Liu F, Wang Y. Cold priming induced tolerance to subsequent low temperature stress is enhanced by melatonin application during recovery in wheat. *Molecules* (2018) 23 (5), art. 1091. <https://doi.org/10.3390/molecules23051091>
- Sun Q, Zhang N, Wang J, Zhang H, Li D, Shi J, Li R, Weeda S, Zhao B, Ren S, Guo Y D. Melatonin promotes ripening and improves quality of tomato fruit during postharvest life. *Journal of Experimental Botany* (2015) 66 (3), pp.657-668. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru332>
- Sun Y, Ma C, Kang X, Zhang L, Wang J, Zheng S, Zhang T. Hydrogen sulfide and nitric oxide are involved in melatonin-induced salt tolerance in cucumber. *Plant Physiology and Biochemistry* (2021) 167, 101–112.
- Sung M, Hsu Y, Hsu Y (2009) Hypersalinity and hydrogen peroxide upregulation of gene expression of antioxidant enzymes in *Ulva fasciata* against oxidative stress. *Mar Biotechnol* 11:199–209. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9134-5>
- Talaat NB. Polyamine and nitrogen metabolism regulation by melatonin and salicylic acid combined treatment as a repressor for salt toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant Growth Regulation* (2021) 95, pp. 315-329. <https://doi.org/10.1007/s10725-021-00740-6>
- 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. doi:10.1016/j.jaridenv.2005.01.005
- Tian X, He X, Xu J, Yang Z, Fang W, Yin Y. Mechanism of calcium in melatonin enhancement of functional substance-phenolic acid in germinated hulless barley. *RSC Advances* (2022) 12 29214–29222
- Tiwari RK, Lal MK, Kumar R, Chourasia KN, Naga KC, Kumar D, Das SK, Zinta G. Mechanistic insights on melatonin-mediated drought stress mitigation in plants. *Physiologia plantarum* (2021) 172(2), 1212–1226. <https://doi.org/10.1111/ppl.13307>

- Tiwari S, Kaur N, & Kumar A. (2023). Exogenous melatonin improves growth, biochemical parameters, and yield of buckwheat under drought stress by modulating antioxidant defense mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, 205, 105072. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105072>.
- Torres MA, Dangl JL, Jones JD. Arabidopsis gp91phox homologue AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2002) 99: 517–522.
- Turk H, Genisel M. Melatonin-related mitochondrial respiration responses are associated with growth promotion and cold tolerance in plants. *Cryobiology* (2020) 92, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.11.006>
- Tyagi S, Kaur P, & Singh R. (2023). Seed priming with melatonin induces rhizogenesis and modulates physiological and biochemical responses in rice (*Oryza sativa* L.) under stress conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 189, 104567.
- 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.
- Wang J, Lv P, Yan D, Zhang Z, Xu X, Wang T, Wang Y, Peng Z, Yu C, Gao Y. Exogenous Melatonin Improves Seed Germination of Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Salt Stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 8436. <https://doi.org/10.3390/ijms23158436>
- Wang J, Yan D, Liu R, Wang T, Lian Y, Lu Z, Hong Y, Wang Y, Li R. The Physiological and Molecular Mechanisms of Exogenous Melatonin Promote the Seed Germination of Maize (*Zea mays* L.) under Salt Stress. *Plants* 2024, 13, 2142. <https://doi.org/10.3390/plants13152142>

- Wang LF, Li TT, Zhang Y, Guo JX, Lu KK, Liu WC. CAND2/PMTR1 Is Required for Melatonin-Conferred Osmotic Stress Tolerance in Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences* (2021) 22, 4014.
- Wang Y, Cheng P, Zhao G, Li L, Shen W. Phytomelatonin and gasotransmitters: a crucial combination for plant physiological functions, *Journal of Experimental Botany* (2022a)Volume 73, Issue 17, Pages 5851–5862, <https://doi.org/10.1093/jxb/erac159>
- Waqas M, Korres NE, Khan MD, Nizami Al.-S, Deebea F, Ali I, Hussain H. (2019). Advances in the concept and methods of seed priming. In: Hasanuzzaman M., Fotopoulos V. (eds.), *Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings*. Springer Nature Singapore Pte Ltd., pp. 11-41. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8625-1_2
- Weeda S, Zhang N, Zhao X, Ndip G, Guo Y, Buck GA, Fu C, Ren S (2014) Arabidopsis transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems. *PLoS ONE* 9:e93462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093462>
- Wei J, Li DX, Zhang JR, Shan C, Rengel Z, Song ZB, Chen Q. Phytomelatonin receptor PMTR1-mediated signaling regulates stomatal closure in Arabidopsis thaliana. *Journal of Pineal Research* (2018) 65, e12500.
- Xu W, Cai SY, Zhang Y, Wang Y, Ahammed GJ, Xia XJ, Shi K, Zhou YH, Yu JQ, Reiter RJ, Zhou J. Melatonin enhances thermotolerance by promoting cellular protein protection in tomato plants. *Journal of pineal research* (2016) 61(4), 457–469. <https://doi.org/10.1111/jpi.12359>
- Yan H, Li Q, Park S.-C, & Xu H. (2020). Melatonin Priming Alleviates Aging-Induced Germination Inhibition by Regulating β -oxidation, Protein Translation, and Antioxidant Metabolism in Oat (*Avena sativa* L.) Seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1898.
- Yang Q, Peng Z, Ma W, Zhang S, Hou S, Wei J, Dong S, Yu X, Song Y, Gao W, et al. Melatonin functions in priming of stomatal immunity in *Panax*

- notoginseng and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* (2021) 187, 2837–2851.
- Yang X, Chen J, Ma Y, Huang M, Qiu T, Bian H, Han N, Wang J. Function, Mechanism, and Application of Plant Melatonin: An Update with a Focus on the Cereal Crop, Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Antioxidants* (2022) 11, 634. <https://doi.org/10.3390/antiox11040634>
- Yastreb I, Klymchuk D, & Klymchuk O. (2024). Modification of the Method for Determining Amylase Activity in Plant Samples. *Journal of Plant Physiology*, 281, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2024.04.005>
- Yatsyshyn VYu, Kvasko AYu, Yemets AI (2017) Genetic approaches in research on the role of trehalose in plants. *Cytol Genet* 51(5):371–383. <https://doi.org/10.3103/S0095452717050127>.
- Ye J, Wang S, Deng X, Yin L, Xiong B, Wang X (2016) Melatonin increased maize (*Zea mays* L.) seedling drought tolerance by alleviating drought-induced photosynthetic inhibition and oxidative damage. *Acta Physiol Plant* 38(2):1–13. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2045-y>
- Yemets AI, Karpets YuV, Kolupaev YuE, Blume YB. Emerging technologies for enhancing ROS/RNS homeostasis. In: *Reactive oxygen, nitrogen and sulfur species in plants: Production, metabolism, signaling and defense mechanisms*,. John Wiley & Sons Ltd (2019) vol. 2. p. 873-922.
- Yu Y, Lv Y, Shi Y, Li T, Chen Y, Zhao D, Zhao Z (2018) The role of phyto-melatonin and related metabolites in response to stress. *Molecules* 23(8):1887. <https://doi.org/10.3390/molecules23081887>
- Yu, Y., Wang, X., Zhang, L., & Ke, S. (2021). Melatonin Enhances Seed Germination and Seedling Growth of Alfalfa Under Salt Stress via Alleviating Oxidative Damage and Regulating Gene Expression. *Frontiers in Plant Science*, 12, 702875.
- Yun BW, Feechan A, Yin M. et al. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* (2011) 478: 264–268.

- Zafar S, Akhtar M, Perveen S, Hasnain Z, & Khalil A. (2020). Attenuating the adverse aspects of water stress on wheat genotypes by foliar spray of melatonin and indole-3-acetic acid. *Physiology and Molecular Biology of Plants: An International Journal of Functional Plant Biology*, 26(9):1751-1762.
- Zamani Z, Amiri H, Ismaili A. Improving drought stress tolerance in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) by exogenous melatonin. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology* (2019) 154(5), 643–655. doi:10.1080/11263504.2019.1674398
- Zeng W, Mostafa S, Lu Z, Jin B. Melatonin-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Frontiers in Plant Science* (2022) 13:847175. doi: 10.3389/fpls.2022.847175
- Zhang H, Liu L, Wang Z, Feng G, Gao Q, Li X. Induction of Low temperature tolerance in wheat by pre-soaking and parental treatment with melatonin. *Molecules* (2021b) 26, art. 1192. <https://doi.org/10.3390/molecules26041192>
- Zhang HJ, Zhang N, Yang RC, Wang L, Sun QQ, Li DB, et al. Melatonin promotes seed germination under high salinity by regulating antioxidant systems, ABA and GA 4 interaction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Pineal Research* (2014a) 57, 269–279. doi: 10.1111/jpi.12167
- Zhang J, Shi Y, Zhang X et al (2017) Melatonin suppression of heat-induced leaf senescence involves changes in abscisic acid and cytokinin biosynthesis and signaling pathways in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Environ Exp Bot* 138:36–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.012>.
- Zhang N, Zhang HJ, Zhao B, Sun QQ, Cao YY, Li R, Wu XX, Weeda S, Li L, Ren S, Reiter RJ, Guo YD. The RNA-seq approach to discriminate gene expression profiles in response to melatonin on cucumber lateral root formation. *Journal of Pineal Research* (2014b) 56 (1), pp. 39-50. <https://doi.org/10.1111/jpi.12095>
- Zhang X, Li M, Zhang L, Jia H, & Wang L. (2023). Melatonin Increases Drought Resistance through Regulating the Root Morphology, Photosynthetic

- Capacity, and Antioxidant Metabolism in Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy*, 13(7), 1881.
- Zhang Y, Fan Y, Rui C, Zhang H, Xu N, Dai M, Chen X, Lu X, Wang D, Wang J, Wang J, Wang Q, Wang S, Chen C, Guo L, Zhao L, Ye W Melatonin Improves Cotton Salt Tolerance by Regulating ROS Scavenging System and Ca²⁺ Signal Transduction. *Frontiers in Plant Science* (2021a) 12:693690. doi: 10.3389/fpls.2021.693690
- Zhang Z, Guo L, Sun H, Wu J, Liu L, Wang J, Wang B, Wang Q, Sun Z, Li D. Melatonin Increases Drought Resistance through Regulating the Fine Root and Root Hair Morphology of Wheat Revealed with RhizoPot. *Agronomy* (2023) 13, 1881. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071881>
- Zhang Z, Liu L, Li H, Zhang S, Fu X, Zhai X, Yang N, Shen J, Li R and Li D (2022) Exogenous Melatonin Promotes the Salt Tolerance by Removing Active Oxygen and Maintaining Ion Balance in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front. Plant Sci.* 12:787062. doi: 10.3389/fpls.2021.787062
- Zhao D, Wang H, Chen S, Yu D, Reiter R J. Phytomelatonin: an emerging regulator of plant biotic stress resistance. *Trends in Plant Science* (2021) 26 70–82.
- Zhao G, Zhao Y, Yu X, Kiprotich F, Han H. Guan R, Wang R, Shen W. Nitric oxide is required for melatonin-enhanced tolerance against salinity stress in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings. *International Journal of Molecular Sciences* (2018) 19 (7), art. 1912. <https://doi.org/10.3390/ijms19071912>.
- Zhao K, Fan H, Zhou S, Song J (2003) Study on the salt and drought tolerance of *Suaeda salsa* and *Kalanchoe claigremontiana* under iso-osmotic salt and water stress. *Plant Sci* 165(4):837–844. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00282-6).
- Zhou C, Liu Z, Zhu L, Ma Z, Wang J, Zhu J. Exogenous melatonin improves plant iron deficiency tolerance via increased accumulation of polyamine-mediated nitric oxide. *International Journal of Molecular Sciences* (2016) 17(11):1777