



<https://doi.org/10.15407/ukrbotj82.02.128>

RESEARCH ARTICLE

Вплив праймінгу мелатоніном на проростання зернівок, метаболізм вуглеводів і стан антиоксидантної системи у *Triticum aestivum* (Poaceae) за умов посухи та сольового стресу

Дмитро А. ТАРАБАН^{1,2} , Юрій В. КАРПЕЦЬ¹ , Тетяна О. ЯСТРЕБ² ,
Ганна А. ЛУГОВА¹ , Віктор М. ПИСАРЕНКО³ , Юрій Є. КОЛУПАЄВ^{2,3*} 

¹ Державний біотехнологічний університет,
вул. Алчевських 44, Харків 61022, Україна

² Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України,
проспект Героїв Харкова 142, Харків 61060, Україна

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

* Автор для листування: plant_biology@ukr.net

Реферат. Обробка рослин мелатоніном (*N*-ацетил-5-метокситриптамін) може підвищувати стійкість рослин за дії абіотичних стресів різної природи, у тому числі посухи та засолення. Однак недостатньо дослідженим залишається вплив праймінгу мелатоніном зернівок злаків, зокрема пшениці, на їхнє проростання і стан протекторних систем проростків за дії осмотичних стресів, що й визначило мету роботи. Оцінювали вплив 3-годинної інкубації зернівок озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* 'Етана') у розчині мелатоніну в концентрації 20 мкМ з наступним їхнім висушуванням на схожість насіння, ріст проростків і стан їхньої антиоксидантної та осмопротекторної систем за дії модельної посухи (15% ПЕГ з мол. масою 6000 Да) або засолення (150 мМ NaCl). За впливу ПЕГ 6000 і особливо NaCl відзначалося зниження схожості насіння та інгібування росту проростків. Попередня обробка зернівок розчинами мелатоніну істотно пом'якшувала ці ефекти. Стресові чинники спричиняли зниження активності амілази у зернівках і вмісту цукрів у пагонах проростків, а обробка насіння мелатоніном усувала ці ефекти. Також праймінг мелатоніном зменшував генерацію пагонами проростків активних форм оксигену та накопичення продукту пероксидного окиснення ліпідів малонового діальдегіду за стресових умов. Висока позитивна кореляція показників проростання зернівок і росту пагонів з активністю амілази, вмістом цукрів і активністю каталази вказує на внесок змін метаболізму вуглеводів та функціонування антиоксидантної системи у реалізацію стрес-протекторної дії мелатоніну. Водночас показники вмісту проліну перебували у зворотній кореляції зі схожістю насіння і ростом та прямій кореляції з величинами генерації активних форм оксигену та вмісту малонового діальдегіду, що характеризують розвиток окиснювального стресу. Зроблено висновок про перспективність праймінгу насіння пшениці мелатоніном для посилення гермінативних процесів за несприятливих умов.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, антиоксидантна система, мелатонін, насіння, посуха, проростання, сольовий стрес, стійкість

ARTICLE HISTORY. Submitted 05 December 2024. Revised 31 March 2025. Published 18 April 2025

CITATION. Taraban D.A., Karpets Yu.V., Yastreba T.O., Lugova A.A., Pysarenko V.M., Kolupaev Yu.E. 2025. Effect of melatonin priming on seed germination, carbohydrate metabolism, and antioxidant system in *Triticum aestivum* (Poaceae) under drought and salt stress. *Ukrainian Botanical Journal*, 82(2): 128–143. [In Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj82.02.128>

© M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine, 2025

© Publisher PH "Akademperiodyka" of the NAS of Ukraine, 2025

This is an open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Вступ

Останніми роками одним із магістральних напрямів функціональної біології рослин стало вивчення ролі нової групи сполук, умовно об'єднаних терміном "рослинні нейротрансмітери" (Akula, Mukherjee, 2020). До них зокрема належать мелатонін, серотонін, дофамін, ацетилхолін, γ -аміномасляна кислота, які добре відомі насамперед як медіатори передачі нервового збудження у тварин (Raza et al., 2022). Проте всі ці сполуки є мультифункціональними метаболітами рослин. Особливо динамічно накопичуються знання про функції у рослин мелатоніну (*N*-ацетил-5-метокситриптамін) (Colombage et al., 2023; Taboada et al., 2023). Останнім часом він розглядається як ще один індолий гормон, який утворюється зі спільного з ауксином попередника — триптофану (Li et al., 2019). Показано вплив мелатоніну на фізіологічні процеси у рослин на різних етапах онтогенезу (проростання насіння, розвиток коренів, старіння листків, цвітіння, визрівання плодів тощо) (Pan et al., 2023; Zhao, Hu, 2023; Wang et al., 2024). Водночас мелатонін розглядається не тільки як гормон росту рослин, скільки як стресовий метаболіт з прямими (передусім антиоксидантними) та опосередкованими протекторними ефектами (Fan et al., 2018; Arnao, Hernández-Ruiz, 2019). Останні зумовлені тісними функціональними зв'язками мелатоніну з ключовими молекулами-посередниками, тобто активним залученням у сигнальну мережу і регуляцію адаптивних реакцій. Саме це створює підстави вважати мелатонін не лише стресовим метаболітом, а й ще одним гормоном рослин (Arnao, Hernández-Ruiz, 2019).

Показано, що реакція рослин на дію стрес-факторів різної природи часто супроводжується підвищенням вмісту ендogenous мелатоніну (Hassan et al., 2022). Водночас у численних дослідженнях за обробки екзогенним мелатоніном зафіксовані ефекти підвищення стійкості рослин різних таксономічних груп до дії різноманітних абіотичних стресорів, зокрема екстремальних температур, посухи, засолення, важких металів, УФ та ін. (Agathokleous et al., 2021; Tiwari et al., 2021; Zeng et al., 2022; Kolupaev et al., 2024a). Захисні ефекти мелатоніну пов'язують як із посиленням неспецифічних (загальних) реакцій (активацією антиоксидантної

системи, накопиченням мультифункціональних стресових метаболітів тощо), так і досить специфічних (наприклад, посиленням експресії холодочутливих генів сімейств CBF і COR, транскрипційних факторів генів теплового шоку, а також генів аквапоринів) (Fu et al., 2024; Kolupaev et al., 2024a).

Зауважимо, що увага багатьох дослідників сфокусована саме на з'ясуванні впливу мелатоніну на стійкість рослин до осмотичних стресів (Siddiqui et al., 2019; Yadav et al., 2022). Зокрема, позитивні ефекти мелатоніну на стійкість рослин до посухи можуть бути зумовлені регуляцією ним стану антиоксидантної системи (наприклад, активацією експресії генів аскорбат-глутатіонового циклу) (Cui et al., 2017) у поєднанні з впливом на енергетичні процеси (активація експресії генів ряду ферментів гліколізу) (Cui et al., 2018). Важливою складовою впливу мелатоніну на стійкість рослин до зневоднення є і модуляція вмісту проліну (Zamani et al., 2019; Li et al., 2020) та інших низькомолекулярних сполук (Hossain et al., 2020; Ayyaz et al., 2022). Також за умов сольового стресу мелатонін бере участь у стабілізації вмісту іонів в клітинах (Ismail et al., 2024).

Зернові злаки вирізняються високою чутливістю до екзогенного мелатоніну і стали поширеними об'єктами, що використовуються в дослідженнях його стрес-протекторної дії. Такі дані отримано на різних видах за умов посухи й засолення. За умов осмотичного стресу, створеного ПЕГ 6000, показано підвищення індексу проростання зернівки пшениці та зменшення інгібування їхнього лінійного росту при додаванні в середовище 300 мкМ мелатоніну (Li et al., 2020). У дослідному варіанті відзначалося зростання активності супероксиддисмутази і зменшення спричинюваних сольовим стресом пошкоджень плазматичної мембрани.

За сольового стресу у водній культурі додавання мелатоніну до живильного розчину сприяло проростанню зернівки пшениці та росту органів проростків, однак такі ефекти були характерні не для всіх досліджуваних сортів (Zang et al., 2022). У гідропонній культурі також відзначався позитивний вплив додавання мелатоніну на ріст проростків пшениці при сольовому стресі. Показово, що ці ефекти супроводжувалися посиленням синтезу ендogenous мелатоніну та збільшенням вмісту поліамінів (Ke et al., 2018).

Додавання мелатоніну до розчину NaCl, на якому пророщували зернівки пшениці, зменшувало негативний вплив стресу, при цьому відзначалося зростання вмісту гіберелінів у проростках (Wang et al., 2022). На прикладі проростків кукурудзи, підданих сольовому стресу, показано вплив мелатоніну на експресію генів, пов'язаних з метаболізмом крохмалю та сахарози (Wang et al., 2024). Фолярна обробка проростків пшениці мелатоніном зменшувала інгібування їхнього росту, спричинюване дією NaCl, підвищувала активність антиоксидантних ферментів у листках (Yan et al., 2023) та підсилювала експресію генів транспортерів Na⁺ (Khan et al., 2024).

Незважаючи на те, що протягом останніх років проведено чимало досліджень впливу екзогенного мелатоніну на стійкість зернових злаків до осмотичного або сольового стресів, залишаються недостатньо вивченими його ефекти при праймуванні насіння. Методика останнього, 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 найчастіше 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 їхнім наступним висівом у ґрунт, зрошуваний морською водою, підвищувало ростові показники, вміст хлорофілу, цукрів і фенольних сполук у листках 3-тижневих рослин (Sadak, 2016). Проте вказана методика не передбачала повного висушування насіння перед висівом у ґрунт, а також спостереження за проростанням зернівок. Недавно було показано позитивний вплив обробки мелатоніном на проростання зернівок пшениці за умов сольового стресу (Ismail et al., 2024). Однак при цьому насіння тривалий час (протягом 20 год) перебувало у розчинах мелатоніну і не висушувалося перед наступним пророщуванням за стресових умов.

У недавньому дослідженні (Shaheen et al., 2024) повідомлялося, що 16-годинна обробка зернівок мелатоніном сприяла їхній схожості за умов ґрунтової посухи, а також поліпшувала

ріст рослин за стресових і нормальних умов, зменшувала показники генерації активних форм оксигену (АФО) та підвищувала активність антиоксидантних ферментів і 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 придатні для 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 метою роботи було дослідження впливу процедури "класичного" праймінгу зернівок пшениці розчинами мелатоніну (відносно короткочасна обробка та висушування) на їхнє проростання і ріст проростків за умов модельних посухи та сольового стресу, а також метаболізм вуглеводів і окремі показники стану антиоксидантної системи.

Матеріали та методи

Рослинний матеріал та його обробка

В експериментах використовували насіння озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту 'Етана' / 'Etana' (заявник "Дойче Заатфеределунг АГ" (Deutsche Saatveredelung AG), Німеччина) генерації 2023 року. Цей сорт — один з найпоширеніших іноземних сортів, вирощуваних в Україні (<https://agroportal.ua/news/rastenievodstvo/nazvano-naypopulyarnishi-sorti-pshenici-v-ukrajini>). Повідомляється про його відносно високу посухостійкість у польових умовах (Kryzhanovsky, 2019). Проте дані про стійкість цього сорту на ранніх фазах розвитку до осмотичних стресів у факторостатних лабораторних умовах в літературі відсутні.

Зернівки знезаражували 5%-м розчином гіпохлориту натрію протягом 15 хв і восьмизразово промивали стерильною дистильованою водою. Зважаючи на те, що гідропраймінг сам по собі підвищує схожість насіння злаків (Kolupaev et al., 2024b), як контрольний варіант

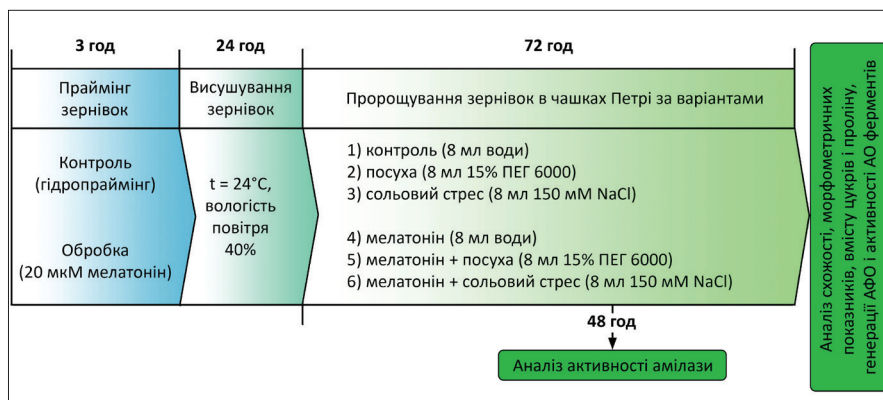


Рис. 1. Схема експерименту з дослідження впливу мелатоніну на проростання зернівок пшениці за посухи та сольового стресу. АО ферменти — антиоксидантні ферменти; АФО — активні форми оксигену

Fig. 1. Scheme of the experiment on effects of melatonin on germination of wheat grains under drought and salinity stress. АО — antioxidant enzymes; АФО — reactive oxygen species

використовували зразки насіння, витримані протягом 3 год у темному термостаті за 24°C в склянках з дистильованою водою (співвідношення об'ємів зернівок і води 1 : 4). Зразки дослідних варіантів витримували впродовж 3 год у 20 мкМ розчині мелатоніну (Alfa Aesar, США, вміст основної речовини не менше 99%), інші умови, як для контрольного варіанта (рис. 1). Режим обробки та оптимальна концентрація мелатоніну були обрані на підставі результатів попередніх експериментів (Kolupaev et al., 2023a, 2024b). Після гідропраймінгу (контроль) та 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 перенесли у чашки Петрі на подвійні фільтри, зволожені 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 72 год. Через 48 год пророщування визначали загальну активність амілази у зернівках. На 3 добу пророщування (через 72 год) оцінювали схожість і ростові показники (відносну кількість пророслого насіння, масу пагонової та кореневої частини проростків). Також пагони 3-добових проростків використовували для аналізу показників про-/антиоксидантної рівноваги та вмісту розчинних вуглеводів і проліну (рис. 1). Усі біохімічні показники за винятком активності амілази визначали тільки у пагонах проростків, оскільки прямий контакт коренів з ПЕГ 6000 не дає можливості відібрати проби коренів без їхніх механічних ушкоджень, які спричиняють зміни досліджуваних показників. Активність амілази аналізували у зернівках.

Аналіз біохімічних показників

Визначення активності амілази. 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 (Yastreb et al., 2024). Наважку рослинного матеріалу гомогенізували в 0,2 М ацетатному буфері (pH 5,6), гомогенат центрифугували на центрифугу MPW 350R (MPW MedInstruments, Польща) при 8000 g за температури не вище 4°C протягом 15 хв. Супернатант розбавляли у необхідну кількість разів тим самим буфером і аналізували. Витяжку ферменту змішували з 5 мл 2%-го розчину крохмалю та інкубували в термостаті протягом 30 хв за температури 25°C . Після цього реакцію зупиняли осадженням білків, додаючи 0,1 мл 10%-го ацетату свинцю та 0,1 мл 16%-го 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, Японія) за довжини хвилі (λ) 670 нм. Як стандарт використовували D-мальтозу.

Визначення вмісту розчинних вуглеводів. Сумарний вміст розчинних вуглеводів у пагонах проростків визначали за 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 та 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 та визначали оптичну густину при $\lambda = 610$ нм. Як стандарт використовували D-глюкозу.

Визначення вмісту проліну. Використовували метод, описаний L.S. Bates зі 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 та нінгідринного реактиву. Пробірки, закриті ковпачками з фольги, нагрівали на киплячій водяній бані протягом 1 год. Оптичну густину визначали за $\lambda = 520$ нм. Як стандарт використовували L-пролін.

Визначення супероксидного аніон-радикала. Генерацию $O_2^{\cdot -}$ тканинами пагонів оцінювали за реакцією з нітросинім тетразолієм (НСТ) з утворенням формазану (Karpets et al., 2012). 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 X-100. Через 1 год пагони обережно вилучали з бюксів та вимірювали оптичну густину інкубаційного розчину за $\lambda = 530$ нм.

Визначення вмісту гідроген пероксиду. Наважки пагонів на льоду розтирали у 5%-му розчині трихлороцтової кислоти (ТХО). Проби центрифугували при 8000 g протягом 10 хв за температури 2–4 °C і в супернатанті визначали концентрацію H_2O_2 за допомогою феротіюціанатного методу з використанням солі Мора та тіюціанату амонію (Sagisaka, 1976). Оптичну густину продукту реакції вимірювали при $\lambda = 480$ нм.

Визначення вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Для аналізу продуктів ПОЛ (переважно малоновий діальдегід, МДА) наважку пагонів гомогенізували у розчині 0,25% 2-тіобарбітурової кислоти в 10% ТХО (дослідна проба) або у розчині лише 10% ТХО (контроль). Суміші кип'ятили в пробірках, закритих ковпачками з фольги, на водяній бані протягом 30 хв. Після цього охолоджували і центрифугували протягом 15 хв при 10000 g. Оптичну густину супернатанту вимірювали за довжини хвилі 532 нм (основний сигнал) та 600 нм (неспецифічне світлопоглинання, величину якого віднімали від основного результату A_{532}) (Kolupaev et al., 2024b).

Аналіз активності антиоксидантних ферментів. При визначенні активності каталази і гваяколпероксидази (ГПО) наважки пагонів гомогенізували на льоду в 0,15 М К, Na-фосфатному буфері (рН 7,6), що містив 0,1 мМ ЕДТА та 1 мМ дитіотрейтолу (Kolupaev et al., 2020). Гомогенат центрифугували при 8000 g протягом 10 хв за температури не вище 4 °C.

Активність каталази (КФ 1.11.1.6) аналізували при рН 7 за кількістю пероксиду водню, розкладеного за одиницю часу. Активність ГПО (КФ 1.11.1.7) визначали з використанням гваяколу як донора гідрогену та гідроген пероксиду як субстрату. Попередньо рН реакційної суміші доводили до 6,2 з використанням К, Na-фосфатного буферу. Оптичну густину продукту реакції визначали при $\lambda = 470$ нм.

Статистична обробка результатів

При визначенні впливу обробки насіння мелатоніном на проростання насіння та біомасу органів проростків кожне повторення складалося з 80 зернівок, а в кожному варіанті досліді було не менше 3-х повторень. Для біохімічних аналізів кожна наважка складалася щонайменше з 12 проростків, аналізи проводили у 3–4-разовому повторенні.

Значимість відмінностей оцінювали за *t*-критерієм Ст'юдента при $p \leq 0,05$, використовуючи пакет статистичного аналізу Statistica, версія 10.0. На рисунках наведені середні величини та їхні стандартні похибки. Матриця кореляцій Пірсона побудована у програмі Microsoft Excel.

Результати

Схожість зернівок та біомаса органів проростків

У контролі та варіанті з обробкою мелатоніном за відсутності впливу стресорів схожість зернівок пшениці сягала майже 100% (рис. 2). За модельної посухи, створеної 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 та сольового стресу відповідно.

За відсутності дії стресових чинників обробка насіння мелатоніном спричиняла тенденцію до збільшення маси органів проростків, однак цей ефект не був вірогідним при $p \leq 0,05$

Таблиця 1. Біомаса органів проростків пшениці за дії осмотичного і сольового стресів та мелатоніну
Table 1. Organ biomass of wheat seedlings under osmotic and salt stresses and melatonin

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

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

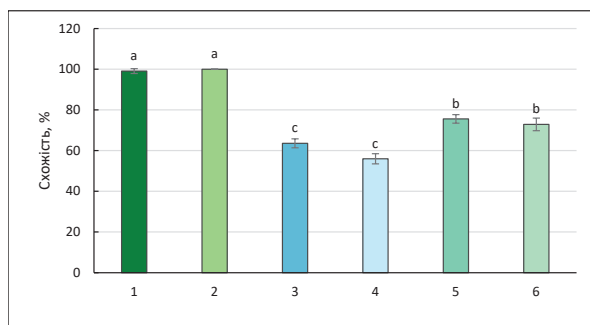


Рис. 2. Схожість зернівок пшениці за дії осмотичного та сольового стресів і мелатоніну: 1 — контроль; 2 — мелатонін (20 мкМ); 3 — ПЕГ 6000 (15%); 4 — NaCl (150 мМ); 5 — ПЕГ 6000 (15%) + мелатонін, (20 мкМ); 6 — NaCl (150 мМ) + мелатонін (20 мкМ). Тут і на рис. 4–7: однаковими літерами позначені величини, відмінності між якими не достовірні при $p \leq 0,05$

Fig. 2. Germination of wheat grains under the influence of osmotic and salt stresses and melatonin. 1 — control; 2 — melatonin (20 μ M); 3 — PEG 6000 (15%); 4 — NaCl (150 mM); 5 — PEG 6000 (15%) + melatonin (20 μ M); 6 — NaCl (150 mM) + melatonin (20 μ M). Here and in Figs. 4–7: the same letters indicate values whose differences are not significant at $p \leq 0,05$

(таблиця). Під впливом модельної посухи та особливо сольового стресу різко знижувалася біомаса пагонів проростків пшениці (у 4,3 і 4,9 раза відповідно) (рис. 3). Маса коренів також істотно знижувалася. В цілому відзначалося більш ніж 2-разове зменшення загальної біомаси проростків (табл. 1). Обробка мелатоніном значно пом'якшувала інгібування росту органів проростків, спричинюване посухою та сольовим стресом (рис. 3, табл. 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.

Активність амілази у зернівках за дії стресорів і мелатоніну

Обробка мелатоніном за відсутності дії стресових чинників не впливала на загальну активність амілази у зернівках 2-добових проростків злаків (рис. 4). Посуха та сольовий стрес приблизно однаково інгібували активність ферменту в зернівках. Попередня обробка мелатоніном достовірно пом'якшувала негативний вплив посухи на активність амілази, проте слабо впливала на прояв ефекту сольового стресу (рис. 4).

Вміст розчинних вуглеводів і проліну в пагонах проростків пшениці

За відсутності стресових чинників обробка мелатоніном істотно не впливала на сумарний вміст цукрів у пагонах проростків пшениці (рис. 5A). Модельний стрес посухи та 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 в пагонах проростків, отриманих з насіння, праймованого мелатоніном, не відрізнявся від контролю (рис. 5B). Стреси посухи та особливо засолення істотно підвищували вміст проліну в пагонах проростків. Передстресовий праймінг насіння мелатоніном не впливав на вміст проліну за умов сольового



Рис. 3. Фенотип 72-годинних проростків пшениці за дії мелатоніну та 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)

Fig. 3. Phenotype of 72 hour-old wheat seedlings under the influence of melatonin and stress factors: 1 — control; 2 — melatonin (20 μ M); 3 — PEG 6000 (15%); 4 — NaCl (150 mM); 5 — PEG 6000 (15%) + melatonin (20 μ M); 6 — NaCl (150 mM) + melatonin (20 μ M)

стресу, а за умов стресу посухи цей показник навіть трохи зменшувався, хоча такий ефект не був достовірним за $p \leq 0,05$ (рис. 5В).

Рівень генерації АФО 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. 6А). Стреси посухи та 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 гідроген пероксиду в пагонах проростків, хоча цей ефект був не достовірним при $p \leq 0,05$ (рис. 6В). Під впливом осмотичного та 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. 6С). Осмотичний та особливо сольовий стреси призводили до посилення інтенсивності ПОЛ у пагонах, про що свідчить підвищення вмісту МДА.

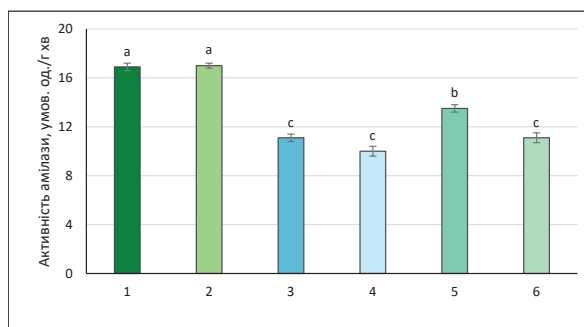


Рис. 4. Загальна активність амілази у зернівках пшениці за дії осмотичного та сольового стресів та мелатоніну: 1 — контроль; 2 — мелатонін (20 мкМ); 3 — ПЕГ 6000 (15%); 4 — NaCl (150 мМ); 5 — ПЕГ 6000 (15%) + мелатонін, (20 мкМ); 6 — NaCl (150 мМ) + мелатонін (20 мкМ)

Fig. 4. Total amylase activity in wheat grains under osmotic and salt stresses and melatonin: 1 — control; 2 — melatonin (20 μ M); 3 — PEG 6000 (15%); 4 — NaCl (150 mM); 5 — PEG 6000 (15%) + melatonin (20 μ M); 6 — NaCl (150 mM) + melatonin (20 μ M)

Праймінг насіння мелатоніном помітно зменшував спричинюване стресорами накопичення продукту ПОЛ у пагонах проростків (рис. 6С).

Активність каталази та гваяколпероксидази у пагонах проростків пшениці

У пагонах проростків, отриманих із зернівок, праймованих мелатоніном, за відсутності дії стресорів відзначалося підвищення активності каталази (рис. 7А). Осмотичний та сольовий

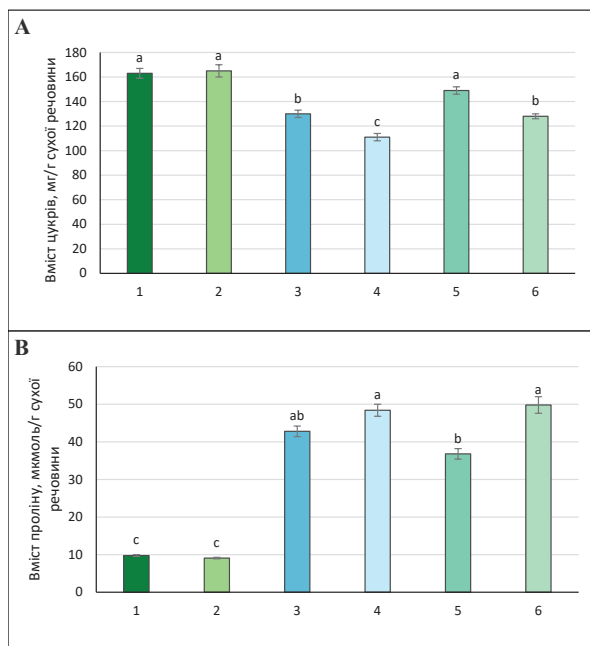


Рис. 5. Вміст цукрів (А) і проліну (В) у пагонах проростків пшениці за дії осмотичного та сольового стресів і мелатоніну: 1 — контроль; 2 — мелатонін (20 мкМ); 3 — ПЕГ 6000 (15%); 4 — NaCl (150 мМ); 5 — ПЕГ 6000 (15%) + мелатонін, (20 мкМ); 6 — NaCl (150 мМ) + мелатонін (20 мкМ)

Fig. 5. Sugar (A) and proline (B) contents in shoots of wheat seedlings under osmotic and salt stresses and melatonin: 1 — control; 2 — melatonin (20 μM); 3 — PEG 6000 (15%); 4 — NaCl (150 mM); 5 — PEG 6000 (15%) + melatonin (20 μM); 6 — NaCl (150 mM) + melatonin (20 μM)

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. 7В) та більше вона зростала 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.

Кореляційний аналіз впливу мелатоніну на проростання зернівки пшениці за стресових умов та біохімічні показники

Показники схожості насіння та біомаси пагонів дуже тісно корелювали між собою ($p \leq 0,01$) (рис. 8). Також вони перебували в тісній прямій

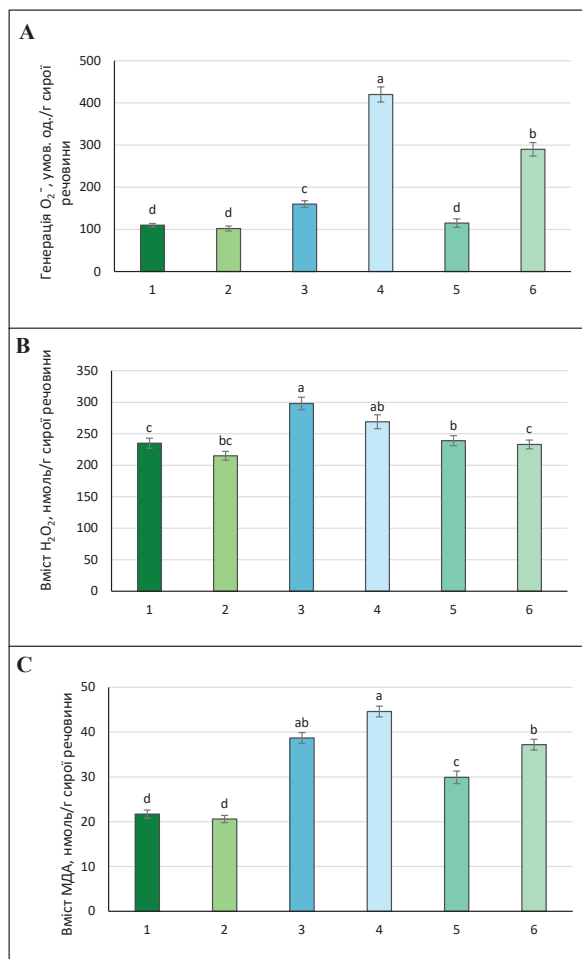


Рис. 6. Генерація супероксидного аніон-радикала (А), вміст гідроген пероксиду (В) і малонового діальдегіду (С) у пагонах проростків пшениці за дії осмотичного та сольового стресів і мелатоніну: 1 — контроль; 2 — мелатонін (20 мкМ); 3 — ПЕГ 6000 (15%); 4 — NaCl (150 мМ); 5 — ПЕГ 6000 (15%) + мелатонін, (20 мкМ); 6 — NaCl (150 мМ) + мелатонін (20 мкМ)

Fig. 6. Generation of superoxide anion radical (A), content of hydrogen peroxide (B) and malondialdehyde (C) in shoots of wheat seedlings under osmotic and salt stresses and melatonin: 1 — control; 2 — melatonin (20 μM); 3 — PEG 6000 (15%); 4 — NaCl (150 mM); 5 — PEG 6000 (15%) + melatonin (20 μM); 6 — NaCl (150 mM) + melatonin (20 μM)

кореляції з активністю амілази в зернівках і вмістом цукрів у пагонах. Цілком закономірною видається і дуже висока кореляція вмісту цукрів з активністю амілази, оскільки надходження розчинних вуглеводів у пагін етіолованих проростків залежить насамперед від інтенсивності гідролізу запасного крохмалю.

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

Показники генерації АФО (супероксидного аніон-радикала та гідроген пероксиду) перебували у зворотній кореляції з показниками схожості та біомаси пагонів, однак величини коефіцієнтів кореляції виявилися невірними за $p \leq 0,05$ (рис. 8). 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 та вмістом цукрів.

Активність одного з ключових антиоксидантних ферментів — каталази — перебувала у прямій кореляції з показником схожості насіння ($p \leq 0,05$, рис. 8). 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 та біомасою пагонів, хоча її величини виявилися не вірогідними за $p \leq 0,05$. Примітно, що активність ГПО була у прямій кореляції з величинами генерації супероксидного аніон-радикала та вмісту МДА, а також у зворотній кореляції з активністю амілази та вмістом цукрів (рис. 8).

Обговорення

Праймінг зернівок пшениці мелатоніном помітно підвищував їхню схожість і біомасу органів проростків при проростанні насіння за умов осмотичного та сольового стресів (рис. 2, рис. 3, табл. 1). Такі результати узгоджуються з нещодавно отриманими даними (Shaheen et al., 2024), які засвідчують позитивний вплив праймінгу

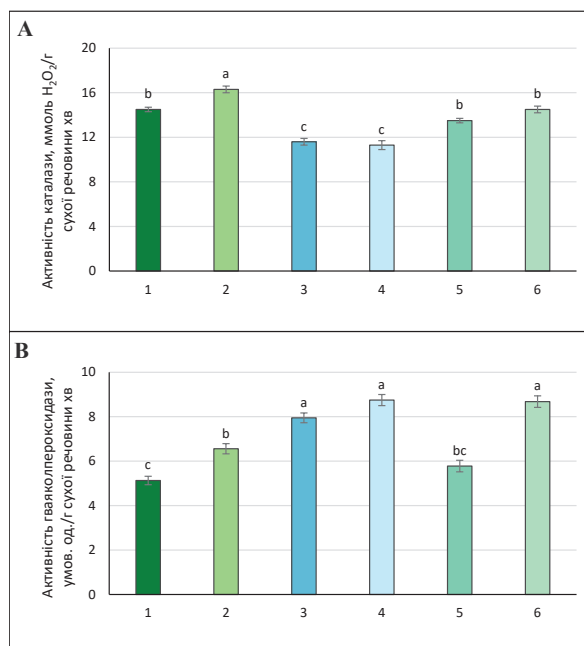


Рис. 7. Активність каталази (А) і ГПО (В) у пагонах проростків пшениці за дії осмотичного та сольового стресів і мелатоніну: 1 — контроль; 2 — мелатонін (20 мкМ); 3 — ПЕГ 6000 (15%); 4 — NaCl (150 мМ); 5 — ПЕГ 6000 (15%) + мелатонін, (20 мкМ); 6 — NaCl (150 мМ) + мелатонін (20 мкМ)

Fig. 7. Activity of catalase (A) and guaiacol peroxidase (B) in shoots of wheat seedlings under osmotic and salt stresses and melatonin: 1 — control; 2 — melatonin (20 μ M); 3 — PEG 6000 (15%); 4 — NaCl (150 mM); 5 — PEG 6000 (15%) + melatonin (20 μ M); 6 — NaCl (150 mM) + melatonin (20 μ M)

зернівок мелатоніном у концентраціях 1–5 мг/л на показники проростання насіння пшениці та накопичення біомаси при осмотичному стресі, створюваному ПЕГ 6000. Однак у згаданій роботі використовувалась методика довготривалого (16-годинного) праймування насіння. Водночас виявлені нами ефекти цілком порівнювані з даними про позитивний вплив праймінгу мелатоніном у концентрації 20 мкМ насіння тритикале на його проростання та ріст проростків за умов осмотичного стресу (Guo et al., 2022).

Зовсім недавно отримано низку даних стосовно впливу праймінгу насіння на стійкість зернових злаків до осмотичних стресів, однак у цих дослідженнях використано інші методики обробки насіння мелатоніном. Так, Y. Fu зі співавт. (2024) показали, що праймінг насіння

Варіант	Схожість	Маса пагона	Активність амілази	Вміст цукрів	Вміст проліну	Генерація O_2^-	Вміст H_2O_2	Вміст МДА	Активність каталази	Активність ГПО
Схожість										
Маса пагона	0,957**									
Активність амілази	0,975**	0,958**								
Вміст цукрів	0,950**	0,877*	0,972**							
Вміст проліну	-0,938**	-0,978**	-0,979**	-0,918**						
Генерація O_2^-	-0,732	-0,618	-0,777	-0,890*	0,717					
Вміст H_2O_2	-0,764	-0,664	-0,687	-0,661	0,578	0,333				
Вміст МДА	-0,978**	-0,919**	-0,988**	-0,993**	0,940**	0,831*	0,721			
Активність каталази	0,885*	0,788	0,792	0,795	-0,706	-0,555	-0,914**	-0,837*		
Активність ГПО	-0,764	-0,687	-0,851*	-0,883*	0,794	0,821*	0,471	0,855*	-0,490	

Рис. 8. Кореляційний аналіз Пірсона зв'язків між впливом посухи, засолення і мелатоніну на ростові та біохімічні показники. Вірогідно при $p \leq 0,05$ (*) та $p \leq 0,01$ (**)

Fig. 8. Pearson's correlation analysis of the relationships between the effects of drought, salinity, and melatonin on growth and biochemical parameters. Significant at $p \leq 0.05$ (*) and at $p \leq 0.01$ (**)

пшениці 100 мкМ мелатоніном підвищував ріст коренів і пагонів молодих рослин за дії слабких осмотичного (2% ПЕГ 6000) і сольового (0,1% NaCl) стресів. При цьому автори використовували методику довготривалого (12-годинного) праймування насіння та стресові навантаження, які істотно не впливали на проростання насіння. Позитивні ефекти праймінгу насіння пшениці мелатоніном зафіксовані також у роботі F.M. Ismaeil зі 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 в наведеній 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 та 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 та засолення, проявляється й після повного висушування зернівок, праймованих розчинами мелатоніну (рис. 2, 3, табл. 1).

Відзначимо, що в 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 250–1000 мкМ з подальшим висушуванням підвищувала схожість насіння та 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 пришвидшував проростання насіння та підвищував накопичення біомаси 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.

Водночас в літературі повідомляється і про ефективність фоліарної обробки рослин розчинами мелатоніну. Зокрема, показано підвищення солестійкості рослин пшениці за їхнього обприскування 70 або 100 мкМ мелатоніном (Talaat et al., 2021; Khan et al., 2024). Також виявлено пом'якшення спричинюваних посухою втрат води та інгібування росту рослин сої за фоліарної обробки 100 мкМ мелатоніном (Jahan et al., 2023).

У цілому екзогенний мелатонін підвищує стійкість рослин до стресових чинників на різних фазах розвитку за різних способів обробки. Однак праймінг насіння становить особливий інтерес, оскільки є економічно доцільнішим порівняно з іншими способами обробки (Muhammad et al., 2023). Крім того, така процедура дозволяє використовувати вплив мелатоніну не лише на адаптивні реакції рослин, а й на фізіологічні процеси, пов'язані саме з проростанням насіння. Останнє може бути особливо важливим при використанні насіння з невисокими посівними якостями, наприклад такого, що зазнає впливу старіння (Kolupaev et al., 2024b).

Однією зі складових пригнічення проростання насіння злаків за умов осмотичного та сольового стресів може бути зниження активності амілази у зернівках. Саме такий ефект спостерігався і в наших експериментах. Обробка зернівок мелатоніном помітно зменшувала інгібування активності амілази, спричинюване осмотичним стресом, а за умов сольового стресу такий ефект виявлявся на рівні тенденції (рис. 4). Ці результати в цілому узгоджуються з даними роботи F.M. Ismaeil зі співавт. (2024), в якій показано помітне нівелювання спричинюваного сольовим стресом пригнічення активності α - і β -амілаз у зернівках за їхньої попередньої обробки мелатоніном.

Як зазначалося, гідроліз запасного крохмалю амілазою є ключовою передумовою для надходження розчинних вуглеводів до органів проростка. У наших експериментах відзначалося дуже висока пряма кореляція між активністю амілази у зернівках і вмістом цукрів у пагонах (рис. 8). Водночас активність амілази та вміст цукрів тісно корелювали з показниками схожості насіння та біомаси проростків. При цьому обробка мелатоніном достовірно підвищувала вміст розчинних вуглеводів у пагонах за обох типів стресу (рис. 5). 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 та вмісту цукрів за стресових умов в об'єктах, оброблених мелатоніном, можуть бути наслідком спричинюваних ним глибоких змін гормонального балансу. Зокрема, як показано, у кукурудзи праймінг зернівок мелатоніном призводив до підвищення вмісту гіберелінів та 2-індолілоцтової кислоти (ІОК), що в свою чергу посилювало експресію генів, пов'язаних з метаболізмом крохмалю та сахарози (Wang et al., 2024). Роль гіберелінів і до певної міри ІОК у проростанні насіння, в тому числі за стресових умов, вивчена досить добре (Kosakivska et al., 2022), а останніми роками доповнюється важливими відомостями про участь специфічних сигнальних білків у 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 та 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 підвищувалася 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 в пагонах проростків (рис. 7). 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 та біомаси проростків (рис. 8). Такі результати можуть свідчити про значний внесок каталази в регуляцію про-/антиоксидантної рівноваги за дії праймінгу насіння мелатоніном. Натомість у наших експериментах не виявлено вірогідної кореляції між показниками проростання насіння та активності іншого ферменту, задіяного у знешкодженні гідроген пероксиду (ГПО). Більше того, зафіксовано вірогідну пряму кореляцію між активністю ГПО та генерацією супероксидного аніон-радикала пагонами проростків пшениці (рис. 7), що може вказувати на функціонування цього ферменту не як антиоксиданту, а як прооксиданту. Відомо, що ГПО може не тільки знешкоджувати АФО, а й брати участь у 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 в пагонах проростків пшениці. Стресові чинники ПЕГ 6000 і NaCl викликали класичну реакцію підвищення вмісту проліну (рис. 5В). Однак обробка насіння мелатоніном, позитивно впливаючи на проростання зернівок і ріст проростків за стресових умов, практично не змінювала вміст проліну при сольовому стресі та дещо знижувала його за умов осмотичного стресу, створюваного ПЕГ 6000. Раніше було показано, що мелатонін при його надходженні через корені за дії на проростки пшениці ПЕГ 6000 сприяв підвищенню вмісту проліну в нестійкого сорту і не змінював цей показник у стійкого (Karpets

et al., 2023). Про відсутність змін вмісту проліну в окремих сортів пшениці за дії мелатоніну в умовах сольового стресу повідомляється і у роботі Z. Zhang зі співавт. (2022). Більше того, при дослідженні процесів проростання зернівок сорго різних генотипів було встановлено сильну зворотну кореляцію між схожістю за умов засолення та накопиченням проліну, на підставі чого припускають, що синтез проліну може бути адаптивною стратегією рослин для попередження проростання зернівок у стресовому середовищі (Thakur, Sharma, 2005).

Водночас у низці досліджень повідомляється про позитивний вплив екзогенного проліну на проростання зернівок і ріст рослин за умов осмотичного та сольового стресів. Наприклад, праймінг зернівок рису екзогенним проліном у низьких концентраціях сприяв їхньому проростанню за умов сольового стресу (Singh et al., 2018). Екзогенне застосування проліну зменшило спричинюване посухою інгібування росту *Brassica napus* L., поліпшуючи показники водного режиму, вмісту хлорофілу та 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 цієї роботи. Слід лише зауважити, що, незважаючи на здатність рослин істотно підвищувати вміст проліну за стресових умов, також відомо і про інгібування росту та інших функцій рослин за надлишкового вмісту проліну та про високу токсичність продуктів його метаболізму (Mena 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.

Як уже зазначалося, вплив мелатоніну на вміст проліну за стресових умов залежить від видових і сортових особливостей рослин (Karpets et al., 2023). Не виключено також, що залежно від об'єктів і експериментальних умов внесок різних стрес-протекторних систем у спричинюваний мелатоніном ефект підвищення стійкості рослин може різнитися. У рамках досліджуваної нами моделі (етіолозовані проростки з праймованого мелатоніном насіння, що піддаються дії осмотичного та сольового стресів) ймовірно найбільшу роль в адаптації відігравало зростання вмісту цукрів та підвищення активності

антиоксидантних ферментів, зокрема каталази. Принаймні величини цих показників перебували у тісній прямій кореляції з проростанням зернівок і біомасою проростків.

Висновки

Праймінг зернівок пшениці мелатоніном підвищував їхню схожість, посилював ріст проростків, а також збільшував співвідношення між біомасою пагонів і коренів за умов модельної посухи (вплив ПЕГ 6000) і сольового стресу. При цьому обробка мелатоніном пом'якшувала спричинюване стресами інгібування амілази та сприяла накопиченню розчинних вуглеводів у пагонах проростків. Під впливом мелатоніну зменшувалися показники генерації АФО і прояву окиснювальних пошкоджень у клітинах пагонів проростків. Водночас обробка мелатоніном сприяла зростанню активності одного з ключових антиоксидантних ферментів — каталази. Відносно короточасна обробка зернівок пшениці розчинами мелатоніну з наступним висушуванням до вихідної вологості може бути

практичним інструментом для підвищення схожості насіння та стійкості рослин до стресів, що спричиняють зневоднення.

Подяки

Робота виконувалася за часткової підтримки проекту 14.00.02.06.П "Розробка методів праймінгу насіння зернових злаків дією донорів газотрансмітерів та сполук з гормональною активністю" (номер держреєстрації 0124U000126).

ДОТРИМАННЯ ЕТИЧНИХ НОРМ

Автори повідомляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів.

ORCID

Д.А. Тарабан:  <https://orcid.org/0000-0002-4891-2100>
 Ю.В. Карпець:  <https://orcid.org/0000-0002-1888-2334>
 Т.О. Ястреб:  <https://orcid.org/0000-0003-3604-9028>
 Г.А. Лугова:  <https://orcid.org/0000-0003-2079-9019>
 В.М. Писаренко:  <https://orcid.org/0000-0002-0184-3929>
 Ю.Є. Колупаєв:  <https://orcid.org/0000-0001-7151-906X>

СПИСОК ПОСИЛАНЬ

- Agathokleous E., Zhou B., Xu J., Ioannou A., Feng Z., Saitanis C.J., Frei M., Calabrese E.J., Fotopoulos V. 2021. 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*, 200: 111746. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111746>
- Akula R., Mukherjee S. 2020. New insights on neurotransmitters signaling mechanisms in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 15(6): 1737450. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1737450>
- 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>
- Arnao M.B., Hernández-Ruiz J. 2019. Melatonin: A new plant hormone and/or a plant master regulator? *Trends in Plant Science*, 24(1): 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.010>
- Awan S.A., Khan I., Wang Q., Gao J., Tan X., Yang F. 2023. Pre-treatment of melatonin enhances the seed germination responses and physiological mechanisms of soybean (*Glycine max* L.) under abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1149873. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1149873>
- Ayyaz A., Shahzadi A.K., Fatima S., Yasin G., Zafar U.Z., Athar H.R., Farooq M.A. 2022. Uncovering the role of melatonin in plant stress tolerance. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 34: 335–346. <https://doi.org/10.1007/s40626-022-00255-z>
- Bates L.S., Walden R.P., Tear G.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Chen L., Liu L., Lu B., Ma T., Jiang D., Li J., Zhang K., Sun H., Zhang Y., Bai Z., Li C. 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>
- Colombage R., Singh M.B., Bhalla P.L. 2023. Melatonin and abiotic stress tolerance in crop plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8): 7447. <https://doi.org/10.3390/ijms24087447>
- Cui G., Zhao X., Liu S., Sun F., Zhang C., Xi Y. 2017. Beneficial effects of melatonin in overcoming drought stress in wheat seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118: 138–149. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.014>
- 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>

- Fan J., Xie Y., Zhang Z., Chen L. 2018. Melatonin: A multifunctional factor in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5): 1528. <https://doi.org/10.3390/ijms19051528>
- Fawzi A.F.A., El-Fouly M.M. 1979. Amylase and invertase activities and carbohydrate contents in relation to physiological sink in carnation. *Physiologia Plantarum*, 47(4): 245–249. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1979.tb06521.x>
- Fu Y., Li P., Si Z., Ma S., Gao Y. 2024. Seeds priming with melatonin improves root hydraulic conductivity of wheat varieties under drought, salinity, and combined stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 25: 5055. <https://doi.org/10.3390/ijms25095055>
- Goldstein L.D., Jennings P.H. 1975. The occurrence and development of amylase enzymes in incubated, de-embryonated maize kernels. *Plant Physiology*, 55(5): 893–898. <https://doi.org/10.1104/pp.55.5.893>
- Guo Y., Li D., Liu L., Sun H., Zhu L., Zhang K., Zhao H., Zhang Y., Li A., Bai Z., Tian L., Dong H., Li C. 2022. Seed priming with melatonin promotes seed germination and seedling growth of *Triticale hexaploide* L. under PEG-6000 induced drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 13: 932912. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.932912>
- Hassan M.U., Ghareeb R.Y., Nawaz M., Mahmood A., Shah A.N., Abdel-Megeed A., Abdelsalam N.R., Hashem M., Alamri S., Thabit M.A., Qari S.H. 2022. Melatonin: A vital pro-tectant for crops against heat stress: mechanisms and prospects. *Agronomy*, 12(5): 1116. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051116>
- Hossain M.S., Li J., Sikdar A., Hasanuzzaman M., Uzizerimana F., Muhammad I., Yuan Y., Zhang C., Wang C., Feng B. 2020. Exogenous melatonin modulates the physiological and biochemical mechanisms of drought tolerance in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.). *Molecules*, 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: 177–188. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9705-3>
- Ismaeil F.M., Ahmed S.E.E., Jabereldar A.A., El-Naim A.M., Ahmed E.E.B.M. 2024. Alleviation of salt stress on seed germination and seedling growth in wheat by seed priming with melatonin. *Discovery Agriculture*, 10: e8da1557. <https://doi.org/10.54905/disssi.v10i21.e8da1557>
- Jahan M.S., Zhao C.J., Shi L.B., Liang X.R., Jabborova D., Nasar J., Zhou X.B. 2023. Physiological mechanism of melatonin attenuating to osmotic stress tolerance in soybean seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1193666. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1193666>
- 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>
- Karpets Yu.V., Kolupaev Y.E., Yastreb T.O., Dmitriev O.P. 2012. Possible pathways of heat resistance induction in plant cells by exogenous nitrogen oxide. *Cytology and Genetics*, 46(6): 354–359. <https://doi.org/10.3103/S0095452712060059>
- Karpets Yu.V., Taraban D.A., Kokorev A.I., Yastreb T.O., Kobzyeva L.N., Kolupaev Y.E. 2023. Response of wheat seedlings with different drought tolerance to melatonin action under osmotic stress. *Agriculture and Forestry*, 69(4): 53–69. <https://doi.org/10.17707/AgricForest.69.4.05>
- Ke Q., Ye J., Wang B., Ren J., Yin L., Deng X., Wang S. 2018. Melatonin mitigates salt stress in wheat seedlings by modulating polyamine metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 9: 914. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00914>
- Khan S., Alvi A.F., Fatma M., Al-Hashimi A., Sofo A., Khan N.A. 2024. Relative effects of melatonin and hydrogen sulfide treatments in mitigating salt damage in wheat. *Frontiers in Plant Science*, 15: 1406092. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1406092>
- Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V. 2014. Reactive oxygen species and stress signaling in plants. *Ukrainian Biochemical Journal*, 86(4): 18–35. [Колупаєв Ю.Е., Карпец Ю.В. Активні форми кислорода і стресовий сигналінг у рослин. *Український біохімічний журнал*, 86(4): 18–35.] <https://doi.org/10.15407/ubj86.04.018>
- Kolupaev Yu.E., Horielova E.I., Yastreb T.O., Ryabchun N.I. 2020. State of antioxidant system in triticale seedlings at cold hardening of varieties of different frost resistance. *Cereal Research Communications*, 48(2): 165–171. <https://doi.org/10.1007/s42976-020-00022-3>
- Kolupaev Yu.E., Taraban D.A., Karpets Yu.V., Makaova B.E., Ryabchun N.I., Dyachenko A.I., Dmitriev O.P. 2023a. Induction of cell protective reactions of *Triticum aestivum* and *Secale cereale* to the effect of high temperatures by melatonin. *Cytology and Genetics*, 57(2): 117–127. <https://doi.org/10.3103/S0095452723020068>
- Kolupaev Yu.E., Yastreb T.O., Ryabchun N.I., Kokorev A.I., Kolomatska V.P., Dmitriev A.P. 2023b. Redox homeostasis of cereals during acclimation to drought. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 35(2): 133–168. <https://doi.org/10.1007/s40626-023-00271-7>
- Kolupaev Yu.E., Taraban D.A., Karpets Y.V., Beschasnyi S.P., Kravets O.A., Relina L.I., Yemets A.I., Blume Y.B. 2024a. Melatonin as an emerging new phytohormone and its role in plant adaptation to abiotic stress factors. In: *Regulation of adaptive responses in plants*. Eds T.O. Yastreb, Yu.E. Kolupaev, A.I. Yemets, Ya.B. Blume. New York: Nova Science Publishers, Inc., pp. 209–257.
- Kolupaev Yu.E., Taraban D.A., Kokorev A.I., Yastreb T.O., Pysarenko V.M., Sherstiuk E., Karpets Yu.V. 2024b. Effect of melatonin and hydropriming on germination of aged triticale and rye seeds. *Botanica*, 30(1): 1–13. <https://doi.org/10.35513/Botlit.2024.1.1>

- Kosakivska I.V., Vedenicheva N.P., Babenko L.M., Voytenko L.V., Romanenko K.O., Vasyuk V.A. 2022. Exogenous phytohormones in the regulation of growth and development of cereals under abiotic stresses. *Molecular Biology Reports*, 49(1): 617–628. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06802-2>
- Kryzhanovsky V.G. 2019. Household and biological peculiarities of wheat winds winters at Mankovsky variety testing station. *Naukovi dopovidi NUBiP Ukrainy*, 6(82): 15. [Крижановський В.Г. 2019. Господарсько-біологічні особливості сортів пшениці озимої на Маньківській сортопробувальній станції. *Наукові доповіді НУБіП України*, 6(82): 15.] <https://doi.org/10.31548/dopovidi2019.06.015>
- Li J., Liu J., Zhu T., Zhao C., Li L., Chen M. 2019. The role of melatonin in salt stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7): 1735. <https://doi.org/10.3390/ijms20071735>
- Li D., Batchelor W.D., Zhang D., Miao H., Li H., Song S., Li R. 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>
- Meena M., Divyanshu K., Swapnil P., Zehra A., Shukla V., Yadav M., Upadhyay R.S. 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>
- 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>
- Pan Y., Xu X., Li L., Sun Q., Wang Q., Huang, H., Tong Z., Zhang J. 2023. Melatonin-mediated development and abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1100827. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1100827>
- Raza A., Salehi H., Rahman M.A., Zahid Z., Madadkar Haghjou M., Najafi-Kakavand S., Charagh S., Osman H.S., Albaqami M., Zhuang Y., Siddique K.H.M., Zhuang W. 2022. Plant hormones and neurotransmitter interactions mediate antioxidant defenses under induced oxidative stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 13: 961872. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.961872>
- 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 Physiology*, 57: 308–309. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.308>
- Scandalios J.G. 1997. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. 1st ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 890 pp.
- Sen A., Johnson R., Puthur J.T. 2021. Seed priming: A cost-effective strategy to impart abiotic stress tolerance. In: *Plant Performance Under Environmental Stress*. Ed. A. Husen. Cham: Springer, pp. 459–480. 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., Abdely C., Sacchi G.A., 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., Alarfaj A.A., Ansari M.J. 2024. Physio-biochemical mechanism of melatonin seed priming in stimulating growth and drought tolerance in bread wheat. *BMC Plant Biology*, 24: 918. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05639-8>
- Siddiqui M.H., Alamri S., Al-Khaishany M.Y., Khan M.N., Al-Amri A., Ali H.M., Alaraidh I.A., Alsahli A.A. 2019. Exogenous melatonin counteracts NaCl-induced damage by regulating the antioxidant system, proline and carbohydrates metabolism in tomato seedlings. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2): 353. <https://doi.org/10.3390/ijms20020353>
- 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.
- Taboada J., Reiter R.J., Palma J.M., Corpas F.J. 2023. Melatonin and the metabolism of reactive oxygen species (ROS) in higher plants. In: *Melatonin: Role in Plant Signaling, Growth and Stress Tolerance. Plant in Challenging Environments*. Vol. 4. Eds S. Mukherjee, F.J. Corpas. Cham: Springer, pp. 3–25. https://doi.org/10.1007/978-3-031-40173-2_1
- Talaat N.B. 2021. 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*, 95: 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. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2005.01.005>
- Tiwari R.K., Lal M.K., Kumar R., Chourasia K.N., Naga K.C., Kumar D., Das S.K., Zinta G. 2021. Mechanistic insights on melatonin-mediated drought stress mitigation in plants. *Physiologia Plantarum*, 172(2): 1212–1226. <https://doi.org/10.1111/ppl.13307>
- Wang J., Lv P., Yan D., Zhang Z., Xu X., Wang T., Wang Y., Peng Z., Yu C., Gao Y., Duan L., Li R. 2022. Exogenous melatonin improves seed germination of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 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. 2024. The physiological and molecular mechanisms of exogenous melatonin promote the seed germination of maize (*Zea mays* L.) under salt stress. *Plants*, 13: 2142. <https://doi.org/10.3390/plants13152142>
- Waqas M., Korres N.E., Khan M.D., Nizami Al.-S., Deeba F., Ali I., Hussain H. 2019. Advances in the concept and methods of seed priming. In: *Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings*. Eds M. Hasanuzzaman, V. Fotopoulos. Singapore: Springer, pp. 11–41. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8625-1_2
- Yadav R., Saini R., Adhikary A., Kumar S. 2022. Unravelling cross priming induced heat stress, combinatorial heat and drought stress response in contrasting chickpea varieties. *Plant Physiology and Biochemistry*, 180(1): 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.03.030>
- Yan D., Wang J., Lu Z., Liu R., Hong Y., Su B., Wang Y., Peng Z., Yu C., Gao Y., Liu Z., Xu Z., Duan L., Li R. 2023. Melatonin-mediated enhancement of photosynthetic capacity and photoprotection improves salt tolerance in wheat. *Plants*, 12: 3984. <https://doi.org/10.3390/plants12233984>
- Zamani Z., Amiri H., Ismaili A. 2019. Improving drought stress tolerance in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) by exogenous melatonin. *Plant Biosystems*, 154(5): 643–655. <https://doi.org/10.1080/11263504.2019.1674398>
- Zhang Z., Liu L., Li H., Zhang S., Fu X., Zhai X., Yang N., Shen J., Li R., Li D. 2022. Exogenous melatonin promotes the salt tolerance by removing active oxygen and maintaining ion balance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 12: 787062. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.787062>
- Zeng W., Mostafa S., Lu Z., Jin B. 2022. Melatonin-mediated abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, 13: 847175. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.847175>
- Zhao K., Fan H., Zhou S., Song J. 2003. Study on the salt and drought tolerance of *Suaeda salsa* and *Kalanchoe clavigrammontana* under isoosmotic salt and water stress. *Plant Science*, 165: 837–844. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00282-6)
- Zhao J., Hu J. 2023. Melatonin: Current status and future perspectives in horticultural plants. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1140803. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1140803>

Effect of melatonin priming on seed germination, carbohydrate metabolism, and antioxidant system in *Triticum aestivum* (Poaceae) under drought and salt stress

D.A. TARABAN ^{1,2}, Yu.V. KARPETS ¹, T.O. YASTREB ²,
A.A. LUGOVA ¹, V.M. PYSARENKO ³, Yu.E. KOLUPAEV ^{2,3}

¹ State Biotechnological University,
44 Alchevskykh Str., Kharkiv 61022, Ukraine

² Yuriev Plant Production Institute, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,
142 Heroiv Kharkova Ave., Kharkiv 61060, Ukraine

³ Poltava State Agrarian University,
1/3 Skovorody Str., Poltava 36003, Ukraine

Abstract. Treatment of plants with melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine, MT) can increase plant resistance to various abiotic stresses, including drought and salinity. However, the effect of melatonin priming of cereal grains, in particular of wheat, on their germination and the state of seedling defence systems under osmotic stress remains insufficiently studied, and this determined the aim of our research. The effect of incubating seeds in a melatonin solution at a concentration of 20 µM for 3 hours, followed by drying, on the germination of seeds of winter common wheat (*Triticum aestivum* 'Etana'), seedling growth, and the state of their antioxidant and osmoprotective systems under the influence of model drought (15% PEG with a molecular weight of 6000 Da) or salinity (150 mM NaCl) was evaluated. Under the influence of PEG 6000 and especially NaCl, a decrease in seed germination and inhibition of seedling growth were observed. Pretreatment of seeds with melatonin solutions significantly alleviated these effects. Stress factors caused a decrease in amylase activity in grains and sugar content in seedling shoots, and treatment of seeds with melatonin eliminated these effects. Melatonin priming also reduced the generation of reactive oxygen species (ROS) by seedling shoots and the accumulation of the lipid peroxidation product malondialdehyde (MDA) under stress conditions. The high positive correlation of seed germination and shoots growth with amylase activity, sugar content, and catalase activity indicates the contribution of changes in carbohydrate metabolism and the functioning of the antioxidant system to the stress-protective effect of melatonin. At the same time, proline content inversely correlated with germination of seeds and growth but directly correlated with ROS generation and MDA levels, which characterise the development of oxidative stress. It was concluded that melatonin priming of wheat seeds is promising for improving germination processes under adverse conditions.

Keywords: antioxidant system, drought, melatonin, resistance, salt stress, seed germination, *Triticum aestivum*