

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.04.098>

УДК 581.1:577.13

Д.А. Тарабан¹, <https://orcid.org/0000-0002-4891-2100>

Ю.В. Карпець¹, <https://orcid.org/0000-0002-1888-2334>

Т.О. Ястреб², <https://orcid.org/0000-0003-3604-9028>

А.І. Дяченко³, <https://orcid.org/0000-0002-9020-3041>

Ю.Є. Колупаєв^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0001-7151-906X>

¹ Державний біотехнологічний університет, Харків

² Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України, Харків

³ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

E-mail: plant_biology@ukr.net

Ca²⁺ - і АФК-залежне індукування теплостійкості проростків пшениці екзогенним мелатоніном

Представлено членом-кореспондентом НАН України О.П. Дмитрієвим

Мелатонін (*N*-ацетил-5-метокситриптамін) нині вважається важливою регуляторною молекулою не лише тварин, а й рослин. Встановлено його значення в адаптації рослин до дії стресорів різної природи, зумовлене, зокрема, посиленням функціонування антиоксидантної системи. Однак роль сигнальних посередників у реалізації стрес-протекторної дії мелатоніну залишається малодослідженою. Метою дослідження було встановлення можливої участі активних форм кисню (АФК) та іонів кальцію в процесі індукування теплостійкості проростків пшениці екзогенним мелатоніном. 24-годинна обробка 4-добових етіолованих проростків мелатоніном у концентраціях 0,1–10 мкМ зумовлювала істотне підвищення їх виживаності після ушкоджувального прогріву у водяному термостаті (45 °С, 10 хв). Інкубація проростків у розчині мелатоніну спричиняла транзиторне зростання в коренях вмісту пероксиду водню з максимумом через 1 год, проте на момент закінчення інкубації (24 год) відзначалося зниження кількості H₂O₂ порівняно з контролем. Спричинюваний мелатоніном ефект підвищення вмісту пероксиду водню в коренях проростків усувався скавенджером H₂O₂ диметилтіосечовиною (ДМТС) та інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом. Також цей ефект не виявлявся в присутності кальцієвих антагоністів — ЕГТА (хелатора позаклітинного кальцію) та неоміцину (інгібітора надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів), що вказує на залежність індукованого мелатоніном утворення АФК від кальцієвого гомеостазу. Оброблення проростків антиоксидантом ДМТС, інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом, антагоністами кальцію ЕГТА і неоміцином також практично повністю усувало позитивний вплив мелатоніну на виживаність проростків після ушкоджувального прогріву. Зроблено висновок про участь АФК та кальцію як сигнальних посередників у процесі підвищення теплостійкості проростків пшениці дією мелатоніну.

Ключові слова: мелатонін, активні форми кисню, кальцій, теплостійкість, *Triticum aestivum*.

Цитування: Тарабан Д.А., Карпець Ю.В., Ястреб Т.О., Дяченко А.І., Колупаєв Ю.Є. Ca²⁺ - і АФК-залежне індукування теплостійкості проростків пшениці екзогенним мелатоніном. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2022. № 4. С. 98–105. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.04.098>

Перша публікація про наявність мелатоніну (*N*-ацетил-5-метокситриптаміну) у рослин датована 1995 р. [1]. Відтоді ця сполука була виявлена у значних кількостях в органах рослин різних таксономічних груп [2]. Проте функції мелатоніну у рослин інтенсивно досліджуються лише протягом останнього десятиліття [3]. Нині встановлено його участь у регуляції росту і розвитку рослин, зокрема, процесів фотосинтезу, старіння листків, формування репродуктивних органів тощо [2].

Особлива увага приділяється дослідженню стрес-протекторних ефектів мелатоніну. Виявлено підвищення ендогенного вмісту мелатоніну у рослин різних видів за умов гіпертермії [5], сольового стресу, опромінення УФ-В [4]. У численних дослідженнях показаний захисний вплив екзогенного мелатоніну на рослини за умов дії на них стресових чинників різної природи — екстремальних температур, посухи, засолення, ксенобіотиків різної природи [2].

Однією з найважливіших складових стрес-протекторної дії мелатоніну вважається зменшення спричинюваних стресорами окиснювальних пошкоджень клітинних структур. Такий ефект зумовлений, зокрема, прямою антиоксидантною дією мелатоніну. Показано, що його антиоксидантна активність вища від ефектів таких “класичних” антиоксидантів, як аскорбінова кислота, глутатіон, НАДФН і токоферол [6]. Водночас відомо, що мелатонін може спричинити експресію генів антиоксидантних ферментів, зокрема різних форм супероксиддисмутази, каталази і ферментів аскорбат-глутатіонового циклу [6]. Зрештою, є відомості про пригнічення мелатоніном стрес-індукованої експресії генів каталітичної субодиниці НАДФН-оксидази (*RbohD* і *RbohF*) [7].

Зменшення вмісту АФК у рослинних клітинах під впливом мелатоніну, що досягається за рахунок різних механізмів, запобігає розвитку окиснювальних ушкоджень за стресових умов. Однак АФК, насамперед молекули пероксиду водню, є важливими сигнальними молекулами, що беруть участь як у передачі стресових сигналів, так і в реалізації ефектів різноманітних регуляторних молекул, у тому числі деяких фітогормонів [8]. Можлива участь АФК у прояві стрес-протекторної дії мелатоніну на рослини досліджена поки що слабо. Проте на прикладі рослин томатів показано підвищення активності НАДФН-оксидази і вмісту пероксиду водню під впливом екзогенного мелатоніну [9]. При цьому інгібітор НАДФН-оксидази дифеніленіодоніум усував ефект підвищення стійкості томатів до теплового, холодового і осмотичного стресів, спричинюваний дією мелатоніну. На рослинах кавуна недавно показано роль пероксиду водню, генерованого з участю НАДФН-оксидази, у розвитку їх холодостійкості за обробки мелатоніном [10]. Також виявлено підвищення концентрації цитозольного кальцію за дії мелатоніну [10].

Однак причинно-наслідкові зв'язки між можливими змінами кальцієвого гомеостазу і генерацією АФК та формуванням стійкості рослин до стресових температур дотепер залишаються майже не дослідженими. Це, зокрема, стосується і феномену індукування теплостійкості злаків за обробки мелатоніном, виявленого в ряді досліджень [11]. У зв'язку з викладеним метою дослідження було встановлення участі АФК в індукуванні мелатоніном стійкості проростків пшениці до потенційно летального теплового стресу. Також із застосуванням інгібіторного методу досліджено можливе значення різних пулів кальцію в прояві впливу мелатоніну на генерацію АФК клітинами коренів і розвиток теплостійкості проростків.

Матеріали і методи. Для експериментів використовували етіюльовані проростки пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Досконала. Насіння отримано з колекції Інституту рос-

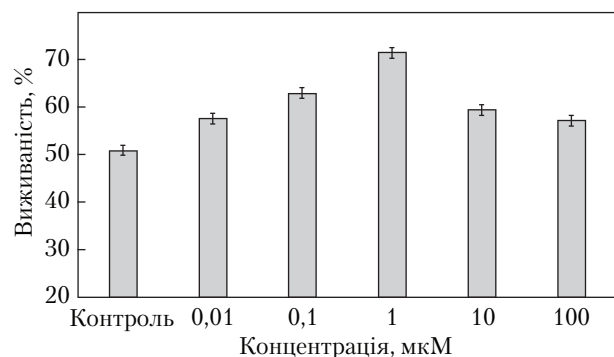


Рис. 1. Концентраційна залежність впливу мелатоніну на виживаність проростків пшениці після 10 хв прогріву за температури 45 °С

(ДМТС, 0,15 мМ), інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом (10 мкМ), антагоністами кальцію — 500 мкМ ЕГТА (хелатор позаклітинного Ca^{2+}) або 200 мкМ неоміцином — інгібітором залежного від фосфоліпази *C* надходження кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів. У варіантах з вивчення комбінованого впливу мелатоніну та антагоністів АФК і кальцію останні вносили в середовище інкубації проростків за 2 год до введення в нього мелатоніну. Концентрації вказаних інгібіторів, що істотно модифікували ефекти екзогенного мелатоніну, але не спричиняли помітних токсичних ефектів, вибирали у попередніх дослідях.

Під час інкубації проростків на досліджуваних розчинах визначали вміст у коренях пероксиду водню феротіоціанатним методом [12].

Для визначення теплостійкості проростків їх прогрівали у водяному ультратермостаті за температури $45,0 \pm 0,1$ °С протягом 10 хв. Після цього проростки усіх варіантів переносили на очищену воду. Через 3 доби оцінювали виживаність проростків [13].

Досліди проводили у триразовому повторенні, на рисунках наведені середні величини та їх похибки. Обговорюються відмінності, вірогідні при $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Оброблення проростків розчинами мелатоніну в концентраціях діапазону від 0,1 до 10 мкМ спричинювало істотне підвищення їх виживаності після ушкоджувального прогріву (рис. 1). Максимальний стрес-протекторний ефект мелатонін чинив у концентрації 1 мкМ. За дії концентрацій 0,01 та 100 мкМ виживаність також була вищою від контролю, але цей ефект був вірогідним лише при $p \leq 0,1$. В усіх подальших експериментах для оброблення проростків використовували мелатонін у концентрації 1 мкМ.

Вміст пероксиду водню в коренях проростків контрольного варіанта впродовж доби експерименту істотно не змінювався (рис. 2). Додавання мелатоніну в середовище інкубації проростків спричиняло швидке підвищення в коренях вмісту пероксиду водню. Вірогідний ефект відзначався вже через 20 хв від початку його дії (див. рис. 2). Через 1 год вміст H_2O_2 у коренях проростків дослідного варіанта досягав максимальних значень. Надалі (через 2–3 год інкубації) вміст пероксиду водню поступово знижувався, хоча й перевищував відповідні значення контролю. Через 4–24 год вміст пероксиду водню у варіанті з обробленням коренів мелатоніном істотно падав і його величини ставали меншими від контролю. Таким чином, підвищення вмісту пероксиду водню за дії мелатоніну було транзиторним і наприкінці інкубації змінювалося його зниженням.

линництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України (репродукція 2020 р.). Зернівки після поверхневого знезараження 6 %-м перексидом водню протягом 30 хв пророщували в темряві за температури 20–22 °С впродовж трьох діб. Після цього у середовище додавали мелатонін у кінцевих концентраціях діапазону 0,01–100 мкМ та інкубували проростки протягом доби. Контрольні зразки інкубували на дистильованій воді.

В окремих варіантах досліду проростки протягом 26 год обробляли скавенджером пероксиду водню диметилтіосечовиною

Рис. 2. Динаміка вмісту пероксиду водню в коренях проростків пшениці за інкубації в середовищі з додаванням мелатоніну. 1 – контроль; 2 – мелатонін

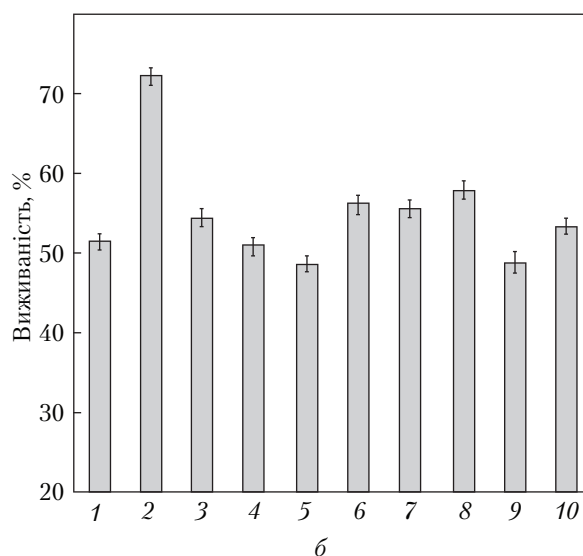
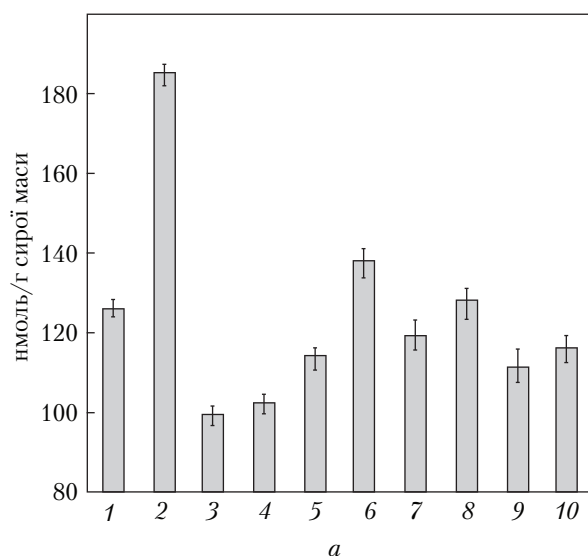
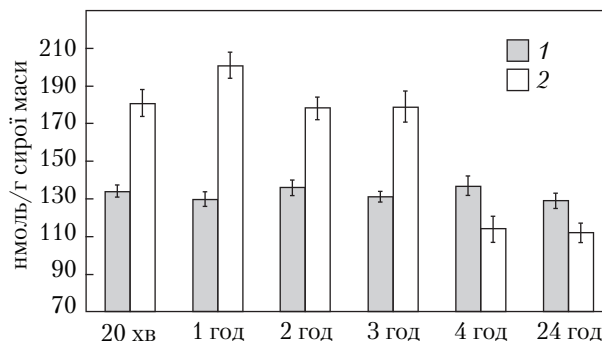


Рис. 3. Вміст пероксиду водню в коренях (а) і вживаність проростків пшениці (б) після ушкоджувального прогріву (45 °С, 10 хв) за їх оброблення мелатоніном, ДМТС, імідазолом та антагоністами кальцію. 1 – контроль; 2 – мелатонін (1 мкМ); 3 – ДМТС (150 мкМ); 4 – мелатонін (1 мкМ) + ДМТС (150 мкМ); 5 – імідазол (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)

Оброблення проростків скавенджером пероксиду водню ДМТС знижувало його вміст у коренях та усувало підвищення кількості H_2O_2 , спричинюване дією мелатоніну (рис. 3, а). У варіанті з обробленням інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом відзначалася тенденція до деякого зниження вмісту пероксиду водню. При цьому вказаний інгібітор помітно пригнічував зростання кількості H_2O_2 за оброблення коренів проростків мелатоніном. Це вказує на роль НАДФН-оксидази як ферментативного джерела АФК, задіяного у зростанні вмісту пероксиду водню в коренях під впливом мелатоніну.

Хелатор кальцію ЕГТА сам по собі практично не впливав на вміст H_2O_2 у коренях проростків пшениці (див. рис. 3, а). Однак передоброблення коренів проростків цим антагоністом кальцію нівелювало його зростання, спричинюване мелатоніном. Під впливом інгібітора надходження кальцію з внутрішньоклітинних компартментів неоміцину відзначалася тенденція до невеликого зменшення вмісту пероксиду водню в коренях проростків. При

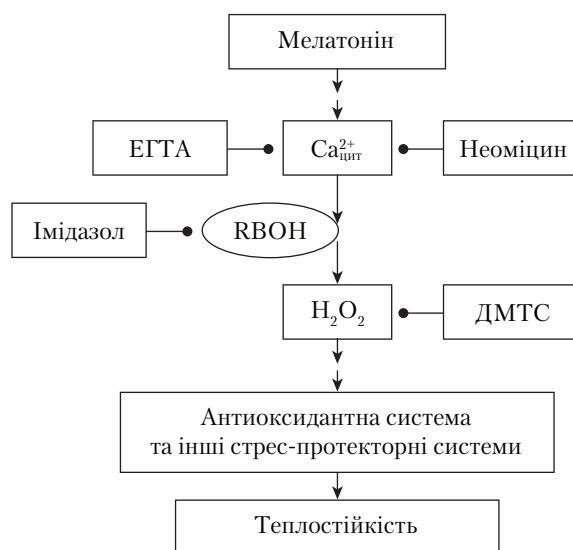


Рис. 4. Гіпотетична схема Ca^{2+} - і АФК-залежного впливу мелатоніну на теплостійкість проростків пшениці. RBOH — каталітична субодиниця НАДФН-оксидази. Пояснення в тексті

цьому даний антагоніст кальцію повністю усував підвищення вмісту H_2O_2 у варіанті з мелатоніном. Отже, результати інгібіторного аналізу вказують на участь різних пулів кальцію в підвищенні вмісту пероксиду водню в клітинах коренів проростків за їх оброблення мелатоніном.

Кальціезалежне зростання кількості пероксиду водню в проростках, імовірно, є сигналом, необхідним для розвитку їх теплостійкості під впливом мелатоніну. Про це свідчить

усунення спричинюваного мелатоніном підвищення їх теплостійкості у присутності антиоксиданту ДМТС, інгібітора НАДФН-оксидази імідазолу та антагоністів кальцію — ЕГТА і неоміцину (див. рис. 3, б). Слід зауважити, що оброблення проростків жодним із вказаних модуляторів редокс-гомеостазу і кальцієвого статусу само по собі істотно не змінювало теплостійкість, що свідчить про відсутність можливого їх токсичного впливу.

Даних про вплив мелатоніну на кальцієвий гомеостаз рослинних клітин поки що дуже мало. Проте недавно у роботі Chang зі співавт. [10] показано, що оброблення рослин кавуна мелатоніном, яке спричинювало підвищення їх холодостійкості, супроводжувалося зростанням у тканинах вмісту пероксиду водню, зумовленим посиленням експресії гена однієї з молекулярних форм НАДФН-оксидази (*RBOHD*). Цей ефект виявився кальціезалежним і усувався неспецифічним блокатором кальцієвих каналів лантаном. У наших експериментах з використанням відповідних інгібіторів також показано залежність посилення генерації АФК клітинами коренів від активності НАДФН-оксидази і надходження кальцію як з позаклітинного простору, так і з внутрішньоклітинних компартментів (див. рис. 3, а). Крім імовірного впливу на експресію генів *RBOH*, кальцій може чинити й безпосередній вплив на активність цього ферменту, а також модулювати активність протеїнкінази, що активує НАДФН-оксидазу шляхом фосфорилування [14].

Припускають, що послідовні зміни кальцієвого і редокс-гомеостазу є і необхідними складовими зареєстрованого впливу мелатоніну на утворення латеральних коренів. У роботі Bian зі співавт. [15] запропоновано модель, згідно з якою після з'єднання мелатоніну з мембранним рецептором з участю α -субодиниці G-білка відкриваються кальцієві канали плазматичної мембрани, внаслідок чого іони кальцію активують НАДФН-оксидазу і спричиняють посилення генерації АФК клітинами. У свою чергу, АФК діють як елемент сигналіngu, що зумовлює утворення бічних коренів.

Для з'ясування механізмів впливу кальцію на формування сигналу АФК, що опосередковує індуковане мелатоніном підвищення теплостійкості проростків пшениці, необхідні спеціальні дослідження. Однак поведений нами інгібіторний аналіз і пряме визначення

вмісту пероксиду водню в клітинах коренів проростків пшениці свідчать про наявність зв'язків між змінами кальцієвого гомеостазу, посиленням залежного від НАДФН-оксидази утворення АФК і формуванням теплостійкості проростків пшениці (рис. 4).

Помітні стрес-протекторні ефекти екзогенного мелатоніну дають підставу розглядати модуляцію його вмісту в рослинах як дієвий спосіб підвищення їх стійкості до абіотичних, зокрема температурних, стресів.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Dubbels R., Reiter R.J., Klenke E., Goebel A., Schnakenberg E., Ehlers C., Schiwara H.W., Schloot W. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pineal Res.* 1995. **18**. P. 28–31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1995.tb00136.x>
2. Fan J., Xie Y., Zhang Z., Chen L. Melatonin: A multifunctional factor in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. **19**. Art. 1528. <https://doi.org/10.3390/ijms19051528>
3. Arnao M.B., Hernandez-Ruiz J. Functions of melatonin in plants: a review. *J. Pineal Res.* 2015. **59**. P. 133–150. <https://doi.org/10.1111/jpi.12253>
4. Altaf M.A., Shahid R., Ren M.-X., Mora-Poblete F., Arnao M.B., Naz S., Anwar M., Altaf M.M., Shahid S., Shakoor A., Sohail H., Ahmar S., Kamran M., Chen J.-T. Phytomelatonin: An overview of the importance and mediating functions of melatonin against environmental stresses. *Physiol. Plant.* 2021. **172**, № 2. P. 820–846. <https://doi.org/10.1111/ppl.13262>
5. Shi H., Tan D.-X., Reiter R.J., Ye T., Yang F., Chan Z. Melatonin induces class A1 heat-shock factors (HSFA1s) and their possible involvement of thermotolerance in *Arabidopsis*. *J. Pineal Res.* 2015. **58**. P. 335–342. <https://doi.org/10.1111/jpi.12219>
6. Yu Y., Lv Y., Shi Y., Li T., Chen Y., Zhao D., Zhao Z. The role of phyto-melatonin and related metabolites in response to stress. *Molecules.* 2018. **23**, № 8. Art. 1887. <https://doi.org/10.3390/molecules23081887>
7. 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>
8. Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Kabashnikova L.F. Antioxidative system of plants: Cellular compartmentalization, protective and signaling functions, mechanisms of regulation (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. **55**, № 5. P. 441–459. <https://doi.org/10.1134/S0003683819050089>
9. 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*. *Physiol. Plant.* 2017. **160**. № 4. P. 396–409. <https://doi.org/10.1111/ppl.12581>
10. Chang J., Guo Y., Li J., Su Z., Wang C., Zhang R., Wei C., Ma J., Zhang X., Li H. Positive interaction between H_2O_2 and Ca^{2+} mediates melatonin-induced CBF pathway and cold tolerance in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). *Antioxidants.* 2021. **10**. № 9. Art. 1457. <https://doi.org/10.3390/antiox10091457>
11. Alam M.N., Zhang L., Yang L., Islam M.R., Liu Y., Luo H., Yang P., Wang Q., Chan Z. Transcriptomic profiling of tall fescue in response to heat stress and improved thermotolerance by melatonin and 24-epibrassinolide. *BMC Genomics.* 2018. **19**. Art. 224. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4588-y>
12. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*. *Plant Physiol.* 1976. **57**, № 2. P. 308–309. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.308>
13. Kolupaev Yu.E., Oboznyi A.I., Shvidenko N.V. Role of hydrogen peroxide in generation of a signal inducing heat tolerance of wheat seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.* 2013. **60**, № 2. P. 227–234. <https://doi.org/10.1134/S102144371302012X>
14. Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Dmitriev A.P. Signal mediators in plants in response to abiotic stress: Calcium, reactive oxygen and nitrogen species. *Cytol. Genet.* 2015. **49**. P. 338–348. <https://doi.org/10.3103/S0095452715050047>
15. Bian L., Wang Y., Bai H., Li H., Zhang C., Chen J., Xu W. Melatonin-ROS signal module regulates plant lateral root development. *Plant Signal. Behav.* 2021. **16**, № 5. Art. 1901447. <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.1901447>

Надійшло до редакції 18.05.2022

REFERENCES

1. Dubbels, R., Reiter, R. J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., Schiwara, H. W. & Schloot, W. (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pineal Res.*, 18, pp. 28-31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1995.tb00136.x>
2. Fan, J., Xie, Y., Zhang, Z. & Chen, L. (2018). Melatonin: A multifunctional factor in plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, Art. 1528. <https://doi.org/10.3390/ijms19051528>
3. Arnao, M. B. & Hernandez-Ruiz, J. (2015). Functions of melatonin in plants: a review. *J. Pineal Res.*, 59, pp. 133-150. <https://doi.org/10.1111/jpi.12253>
4. Altaf, M. A., Shahid, R., Ren, M. -X., Mora-Poblete, F., Arnao, M. B., Naz, S., Anwar, M., Altaf, M. M., Shahid, S., Shakoor, A., Sohail, H., Ahmar, S., Kamran, M. & Chen, J. -T. (2021). Phytomelatonin: An overview of the importance and mediating functions of melatonin against environmental stresses. *Physiol. Plant.*, 172, No. 2, pp. 820-846. <https://doi.org/10.1111/ppl.13262>
5. Shi, H., Tan, D. -X., Reiter, R. J., Ye, T., Yang, F. & Chan, Z. (2015). Melatonin induces class A1 heat-shock factors (HSFA1s) and their possible involvement of thermotolerance in *Arabidopsis*. *J. Pineal Res.*, 58, pp. 335-342. <https://doi.org/10.1111/jpi.12219>
6. 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, No. 8, Art. 1887. <https://doi.org/10.3390/molecules23081887>
7. Lei, K., Sun, S., Zhong, K., Li, S., Hu, H., Sun, C., Zheng, Q., Tian, Z., Dai, T. & Sun, J. (2021). Seed soaking with melatonin promotes seed germination under chromium stress via enhancing reserve mobilization and antioxidant metabolism in wheat. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 220, Art. 112241. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112241>
8. Kolupaev, Yu.E., Karpets, Yu.V. & Kabashnikova, L. F. (2019). Antioxidative system of plants: Cellular compartmentalization, protective and signaling functions, mechanisms of regulation (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.*, 55, No. 5, pp. 441-459. <https://doi.org/10.1134/S0003683819050089>
9. Gong, B., Yan, Y., Wen, D. & Shi, Q. (2017). Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidase: a novel downstream signaling pathway in melatonin-induced stress tolerance in *Solanum lycopersicum*. *Physiol. Plant.*, 160, No. 4, pp. 396-409. <https://doi.org/10.1111/ppl.12581>
10. Chang, J., Guo, Y., Li, J., Su, Z., Wang, C., Zhang, R., Wei, C., Ma, J., Zhang, X. & Li, H. (2021). Positive interaction between H₂O₂ and Ca²⁺ mediates melatonin-induced CBF pathway and cold tolerance in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). *Antioxidants*, 10, No. 9, Art. 1457. <https://doi.org/10.3390/antiox10091457>
11. 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, Art. 224. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4588-y>
12. Sagisaka, S. (1976). The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gebrica*. *Plant Physiol.*, 57, No. 2, pp. 308-309. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.308>
13. Kolupaev, Yu. E., Oboznyi, A. I. & Shvidenko, N. V. (2013). Role of hydrogen peroxide in generation of a signal inducing heat tolerance of wheat seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.*, 60, No. 2, pp. 227-234. <https://doi.org/10.1134/S102144371302012X>
14. Kolupaev, Yu. E., Karpets, Yu. V. & Dmitriev, A. P. (2015). Signal mediators in plants in response to abiotic stress: Calcium, reactive oxygen and nitrogen species. *Cytol. Genet.*, 49, No. 5, pp. 338-348. <https://doi.org/10.3103/S0095452715050047>
15. Bian, L., Wang, Y., Bai, H., Li, H., Zhang, C., Chen, J. & Xu, W. (2021) Melatonin-ROS signal module regulates plant lateral root development. *Plant Signal. Behav.*, 16, No. 5, Art. 1901447. <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.1901447>

Received 18.05.2022

D.A. Taraban¹, <https://orcid.org/0000-0002-4891-2100>

Yu.V. Karpets¹, <https://orcid.org/0000-0002-1888-2334>

T.O. Yastreba², <https://orcid.org/0000-0003-3604-9028>

A.I. Dyachenko³, <https://orcid.org/0000-0002-9020-3041>

Yu.E. Kolupaev^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0001-7151-906X>

¹ State Biotechnological University, Kharkiv

² Yuriev Plant Production Institute of the NAAS of Ukraine, Kharkiv

³ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the NAS of Ukraine, Kyiv

Email: plant_biology@ukr.net

Ca²⁺ - AND ROS-DEPENDENT INDUCTION OF HEAT RESISTANCE OF WHEAT SEEDLINGS BY EXOGENOUS MELATONIN

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) is now considered an important regulatory molecule not only for animals but also for plants. Its importance is found out in the adaptation of plants to the action of stressors of different nature, due, in particular, to enhance the functioning of the antioxidant system. However, the role of signal mediators in the implementation of the stress-protective effect of melatonin remains poorly understood. The aim of the study was to establish the possible participation of reactive oxygen species (ROS) and calcium ions in the process of inducing heat resistance of wheat seedlings by exogenous melatonin. 24-hour treatment of 4-day etiolated seedlings with melatonin in concentrations in the range of 0.1–10 μM caused a significant increase in their survival after the damaging heating in a water thermostat (45 °C, 10 min). Incubation of seedlings in melatonin solution caused a transient increase of hydrogen peroxide content in the roots with a maximum after 1 h, but at the end of incubation (24 h) there was a decrease in the amount of H₂O₂ compared to control. The melatonin-induced effect of increasing of hydrogen peroxide content in seedling roots was eliminated by the H₂O₂ scavenger dimethylthiourea (DMTU) and the NADPH oxidase inhibitor imidazole. Also, this effect was not revealed in the presence of calcium antagonists – EGTA (extracellular calcium chelator) and neomycin (inhibitor of calcium influx into cytosol from intracellular compartments), which indicates the dependence of melatonin-induced ROS formation on calcium homeostasis. Treatment of seedlings with antioxidant DMTU, NADPH oxidase inhibitor imidazole, calcium antagonists EGTA and neomycin also almost completely eliminated the positive effect of melatonin on seedling survival after damaging heating. It is concluded that ROS and calcium are involved as signaling mediators in the process of increasing the heat resistance of wheat seedlings by melatonin.

Keywords: *melatonin, reactive oxygen species, calcium, heat resistance, Triticum aestivum.*