

ІНДУКУВАННЯ МЕЛАТОНІНОМ КЛІТИННИХ ЗАХИСНИХ РЕАКЦІЙ *TRITICUM AESTIVUM* І *SECALE CEREALE* НА ДІЮ ВИСОКИХ ТЕМПЕРАТУР

Ю.Є. КОЛУПАЄВ^{1,2*}, Д.А. ТАРАБАН³, Ю.В. КАРПЕЦЬ³,
Б.Є. МАКАОВА², Н.І. РЯБЧУН¹, А.І. ДЯЧЕНКО⁴, О.П. ДМИТРІЄВ^{4, **}

¹ Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України, пр-т Героїв Харкова, 142, Харків, 61060, Україна

² Полтавський державний аграрний університет, вул. Сковороди, 1/3, Полтава, 36003, Україна

³ Державний біотехнологічний університет, вул. Алчевських, 44, Харків, 61022, Україна

⁴ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна

E-mail: *plant_biology@ukr.net, **dmitriev.ap@gmail.com

Нині мелатонін (*N*-ацетил-5-метокситриптамін) розглядається як мультифункціональний біорегулятор не лише у ссавців, а й у рослин. Метою роботи було дослідження впливу мелатоніну на стійкість проростків пшениці (*Triticum aestivum* L., сорт Досконала) і жита (*Secale cereale* L., сорт Пам'ять Худоєрка) до високої температури та функціонування ключових клітинних захисних систем – антиоксидантної та осмопротекторної. Проростки жита відрізнялися від проростків пшениці вищою теплостійкістю, що виявлялося у меншому інгібуванні росту після 6-годинного прозрієу за температури 44 °С та меншому прояві ефектів окиснювального стресу. Обробка зернівок пшениці мелатоніном в концентраціях 20–100 мкМ значно зменшувала інгібування росту пагонів і коренів, спричинюване дією високої температури. На проростки жита мелатонін впливав менш помітно, зменшуючи лише пригнічення росту пагонів. Обробка мелатоніном перешкоджала розвитку окиснювального стресу, спричинюваного дією високої температури, що виявлялося у зниженні показників генерації супероксидного радикала, вмісту пероксиду водню і малонового діальдегіду у пагонах проростків пшениці і жита. Обробка зернівок обох видів злаків мелатоніном спричиняла підвищення активності каталази на фоні теплового стресу, а також сприяла стабілізації активності пероксидази за стресових умов у пшениці і викликала її підвищення у жита. Крім того, обробка зернівок мелатоніном спричиняла підвищення вмісту розчинних вуглеводів за стресових умов, але істотно не впливала на вміст проліну у пагонах проростків обох видів. В цілому відзначено менш помітний

вплив передобробки мелатоніном на функціонування протекторних систем жита. Ключовими ефектами мелатоніну за стресових умов є зменшення окиснювальних пошкоджень клітин, підвищення активності антиоксидантних ферментів та посилення накопичення розчинних вуглеводів.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, *Secale cereale*, мелатонін, тепловий стрес, стійкість, окиснювальні пошкодження, антиоксидантна система, осмопротектори.

Вступ. Індоламін мелатонін (*N*-ацетил-5-метокситриптамін) відомий насамперед як нейрогормон, що синтезується в епіфізі ссавців і бере участь у регуляції циркадних ритмів, сну, настрою, температури тіла, імунної системи та багатьох інших функцій (Hardeland, 2012). У рослин мелатонін був вперше ідентифікований у 1995 р. (Dubbels et al, 1995), а інтенсивні дослідження його функцій здійснюються лише в останні 10–15 років (Arnao, Hernandez-Ruiz, 2015; Fan et al, 2018). Нині відомо, що мелатонін впливає на експресію значного різноманіття генних елементів у різних умовах, насамперед стресових (Wang et al, 2018; Yu et al, 2018). Показана і участь мелатоніну у регуляції проростання насіння, розвитку коренів, дозрівання плодів, формування урожаю за фізіологічно нормальних умов (Sun et al, 2015; Arnao, Hernández-Ruiz, 2019b).

Уявлення про механізм дії мелатоніну як біорегулятора у рослин лише формуються. Ідентифікація у 2018 р. першого рецептора мелато-

ніну у *Arabidopsis thaliana*, названого CAND2/PMTR1 (Wei et al, 2018), створила передумови для вивчення мелатоніну за аналогією з класичними фітогормонами. Нині встановлено, що рецептор CAND2 локалізується в плазматичній мембрані і має здатність взаємодіяти з α -субодиницею G-білка, активуючи каталітичну субодиницю НАДФН-оксидази RbOH і сприяючи надходженню кальцію у замикаючі клітини, наступному відкриванню K^+_{out} каналів і закриванню продихів (Arnao, Hernandez-Ruiz, 2019a).

Водночас вже багато років вивчаються різні аспекти антиоксидантної дії мелатоніну. Зокрема, встановлена висока ефективність мелатоніну як безпосереднього скавенджера гідроксильних радикалів та інших активних форм кисню і азоту *in vitro* (Tan et al, 1993). Пряма взаємодія мелатоніну з АФК та його залучення в регуляцію реакції Фентона дають підстави розглядати цю сполуку як один з елементів редокс-мережі рослинних клітин (Arnao, Hernández-Ruiz, 2019b). Поряд з цим зафіксований вплив мелатоніну на експресію антиоксидантних ферментів, зокрема, різних молекулярних форм каталази, пероксидази і пероксиредоксинів (Arnao, Hernández-Ruiz, 2019b). Повідомляється і про регуляцію мелатоніном складових аскорбат-глутатионового циклу (Wang et al, 2012). Крім того, є відомості як про пригнічення (Lei et al, 2021), так і про посилення (Arnao, Hernandez-Ruiz, 2019a) мелатоніном експресії генів каталітичної субодиниці НАДФН-оксидази і відповідно генерації АФК клітинами. Отже, мелатонін різними шляхами задіяний у складних процесах редокс-регуляції і антиоксидантного захисту рослинних клітин.

Іншими ефектами мелатоніну у рослин за стресових умов є його залучення до регуляції накопичення осмолітів. Зокрема, є відомості про посилення під впливом екзогенного мелатоніну накопичення проліну у томатів за теплового та сольового стресів (Jahan et al, 2019; Siddiqui et al, 2019) і у винограду за умов посухи (Meng et al, 2014). Також під впливом обробки мелатоніном збільшувався вміст проліну у зернівках пшениці під час їх проростання за низької температури (Zhang et al, 2021). Проте, у рослин люцерни виявлено зниження спричинюваного посухою накопичення проліну за

обробки мелатоніном (Antoniou et al, 2017). Поряд з проліном до процесів осморегуляції залучені й інші сполуки, зокрема, різноманітні розчинні вуглеводи, які поряд з осмопротекторними виконують і мембранопротекторні та антиоксидантні функції (Yatsyshyn et al, 2017; Yadav et al, 2022). Є поодинокі повідомлення про позитивний вплив мелатоніну на їх накопичення у рослин за стресових умов (Siddiqui et al, 2019), однак дія мелатоніну на вуглеводний обмін досліджена ще недостатньо.

На даний час на рослинах різних видів зафіксовані протекторні ефекти мелатоніну за умов таких класичних стресів як посуха, засолення, екстремальні температури (Cui et al, 2018; Chang et al, 2021; Nawaz et al, 2021). При цьому, однак, поки що практично відсутні порівняльні дослідження впливу мелатоніну на рослини з різними адаптивними стратегіями, а для окремих культурних рослин стосовно ефектів мелатоніну не отримано навіть феноменологічних даних. Так, в літературі повністю відсутні дані про можливу стреспротекторну дію мелатоніну на рослини жита, що вирізняються від інших культурних злаків вищою стійкістю до низьких і високих температур (Koster, Linch, 1992; Kolupaev et al, 2015; 2022; Romanenko et al, 2022), а також до дії прямих агентів окиснювального стресу (Kolupaev et al, 2016).

Високі температури належать до несприятливих чинників, що впливають на культурні злаки на різних фазах розвитку, у тому числі зовсім ранніх. Наприклад, останніми десятиліттями в Україні зростання температури до екстремальних значень часто фіксується у вересні, тобто у період проростання зернівок озимих пшениці і жита (Romanenko et al, 2018). Показано позитивний вплив обробки зернівок пшениці мелатоніном на ріст проростків за екстремальних низьких температур (Zang et al, 2020). Проте вплив подібного прийому на стійкість культурних злаків до високих температур дотепер не досліджувався.

Слід відзначити, що етіюльовані проростки злаків, зокрема пшениці, чутливі до екзогенних фізіологічно активних сполук, що впливають на стрес-протекторні системи (Karpets et al, 2021; Taraban et al, 2022). Також етіюльовані проростки пшениці використовуються для

оцінки відмінностей сортів за теплостійкістю (Pat. 45879 UA, 2002, <https://uapatents.com/2-45879-sposib-ocinki-zharostijjkosti-sortiv-ozimopshenici.html>), яка корелює з їх польовою стійкістю (Oboznyi et al, 2013). Зважаючи на це, як модельний об'єкт для досліджень стрес-протекторних ефектів мелатоніну використовували етіоловані проростки пшениці (*Triticum aestivum* L.) і жита (*Secale cereale* L.). Відомо, що жито, принаймні на стадії проростків, відрізняється від пшениці більш збалансованою роботою антиоксидантної системи і стійкістю до окиснювального стресу, спричинюваного різними агентами (Kolupaev et al, 2016). У зв'язку з викладеним мета роботи полягала у порівнянні впливу обробки зернівок мелатоніном на стійкість проростків двох видів злаків до високої температури та функціонування ключових клітинних захисних систем – антиоксидантної та осмопротекторної.

Матеріали і методи. У роботі використовували насіння пшениці м'якої озимої сорту Досконала і жита озимого сорту Пам'ять Худерка репродукції 2020 року, отримане в Національному центрі генетичних ресурсів рослин України.

Зернівки дослідних варіантів занурювали у розчини мелатоніну в концентраціях 5–500 мкМ впродовж 2 год, в контрольному варіанті зернівки обробляли дистильованою водою. Насіння пророщували впродовж 3 діб в термостаті за температури 24 ± 1 °C. Після цього оцінювали теплостійкість проростків за ростою реакцією на високу температуру з використанням методу, запропонованого О.І. Жук та І.П. Григорюком (Pat. 45879 UA, 2002, <https://uapatents.com/2-45879-sposib-ocinki-zharostijjkosti-sortiv-ozimo-pshenici.html>) з нашими модифікаціями. Дослідні проростки впродовж 6 год піддавали прогріву у відкритих чашках Петрі у повітряному термостаті за температури 44 ± 1 °C і відносної вологості повітря 42–45 %, проростки контрольного варіанта у цей час залишалися в термостаті з температурою 24 °C і вологістю повітря 60–70 %. Для недопущення підсихання коренів фільтрувальний папір у чашках через кожну годину зволожували однаковою кількістю дистильованої води відповідної температури. Після закінчення прогріву проростки дослідних варіантів знову переносили

в термостат з температурою 24 °C. Температуру та часову експозицію, що спричиняли інгібування росту приблизно на 50–70 %, добирали у попередніх дослідах (результати не наводяться). Для кожного варіанта визначали приріст протягом доби біомаси пагонів і коренів за формулою:

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

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

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

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

Генерацію супероксидного аніон-радикала оцінювали за відновленням нітросинього тетразолію, як описано раніше (Kolupaev et al, 2022). По 10 пагонів однакового розміру поміщали на 1 год бюкси з 5 мл 0,1 М К, Na-фосфатного буферу (pH 7,6), що містив 0,05 % нітросинього тетразолію, 10 мкМ ЕДТА та 0,1 % Тритону X-100. Після закінчення експозиції пагони обережно вилучали з бюксів та вимірювали оптичну густину інкубаційного розчину за довжини хвилі 530 нм. Посилення генерації супероксидного аніон-радикалу при тепловому стресі визначали за співвідношенням (%) оптичної густини у дослідному та контрольному варіантах.

Для визначення вмісту пероксиду водню пагони на холоді гомогенізували в 5%-вому розчині трихлороцтової кислоти. Проби центрифугували при 8000 г впродовж 10 хв за температури 2–4 °C та в супернатанті визначали концентрацію H_2O_2 за допомогою феротіюціанатного методу (Sagisaka, 1976).

Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (переважно малоновий діальдегід –

МДА), визначали за протоколом, описаним раніше (Kolupaev et al, 2015).

При визначенні активності антиоксидантних ферментів – каталази і гваяколпероксидази – наважки рослинного матеріалу гомогенізували на холоді в 0,15 М К, Na-фосфатному буфері (рН 7,6), що містив ЕДТА (0,1 мМ) та дитіотрейтол (1 мМ) (Kolupaev et al, 2016). Гомогенат одразу використовували для аналізу. Активність ферментів визначали супернатанті після центрифугування гомогенату при 8000 г впродовж 10 хв при 4 °С.

Активність каталази (КФ 1.11.1.6) аналізували при рН 7,0 (Karpets et al, 2015) за кількістю пероксиду водню, розкладеного за одиницю часу, і виражали ммоль H_2O_2 /(г сухої речовини × хв).

Активність гваяколпероксидази (КФ 1.11.1.7) визначали з використанням гваяколу як донора водню та пероксиду водню як субстрату. Попередньо рН реакційної суміші доводили до 6,2 з допомогою К, Na-фосфатного буферу (Karpets et al, 2015). Оптичну густину тетрагваяколу визначали при 470 нм. Активність ферменту виражали умовн. од/(г сухої речовини × хв).

Сумарний вміст розчинних вуглеводів у рослинному матеріалі визначали методом Морріса-Рое з використанням антронового реактиву (Zhao et al, 2003) з модифікаціями (Kolupaev et al, 2015). Цукри екстрагували з рослинного матеріалу дистильованою водою при 10-хвилинному нагріванні на киплячій водяній бані. Екстракт освітлювали додаванням в пробірки однакових об'ємів (по 0,3 мл) 30%-ного розчину сульфату цинку і 15%-ного розчину жовтої кров'яної солі. Пробірки фільтрували через паперовий фільтр. Фільтрат перед аналізом розбавляли дистильованою водою в кілька разів. У реакційні пробірки вносили 2 мл антронового реактиву і 0,6 мл фільтрату, в контрольну пробу замість фільтрату додавали дистильовану воду. Пробірки кип'ятили на водяній бані впродовж 7 хв, після чого охолоджували до кімнатної температури і визначали світлопоглинання при 610 нм відносно контрольного розчину. Як стандарт використовували D-глюкозу. Вміст цукрів виражали в мг/г сухої речовини проростків.

Уміст проліну в пагонах проростків визначали за методом Бейтса та співавт. (Bates et al, 1973) з модифікаціями. Пролін екстрагували з рослинного матеріалу дистильованою водою з наступним 10-хвилинним кип'ятінням, екстракт фільтрували і до порцій фільтрату додавали однакові об'єми нінгідринного реактиву та концентрованої оцтової кислоти і кип'ятили пробі впродовж 1 год на водяній бані. Оптичну густину продукту реакції визначали за довжини хвилі 520 нм. Як стандарт використовували L-пролін. Вміст проліну виражали в мкмоль/г сухої речовини проростків.

Експерименти проводили не менш ніж у 3-разовій повторності. На рисунках наведено середні величини та їх стандартні похибки. Вірогідність відмінностей визначали дисперсійним аналізом. За винятком окремо відзначених випадків, обговорюються ефекти, вірогідні за $P \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Обробка зернівок пшениці і жита розчинами мелатоніну в концентраціях 5–100 мкМ істотно не впливала на ріст коренів і пагонів на 3–4 добу експерименту при вирощуванні проростків в контрольних умовах за температури 24 °С (результати не наводяться). Водночас обробка 500 мкМ мелатоніном спричиняла інгібування росту пагонів і коренів приблизно на 35 і 25 %, відповідно. Зважаючи на це, у подальших експериментах з визначення концентраційної залежності впливу мелатоніну на теплостійкість проростків його використовували в концентраціях діапазону 5–100 мкМ.

Тепловий стрес спричиняв істотне інгібування росту проростків пшениці (рис. 1). При цьому пригнічення росту коренів було сильнішим, ніж пагонів. Проростки жита виявляли меншу чутливість до теплового стресу (рис. 1). При цьому у них так само ріст коренів пригнічувався помітніше, ніж ріст пагонів.

Обробка зернівок мелатоніном помітно зменшувала інгібування росту пагонів і коренів у пшениці за теплового стресу (рис. 1). Вірогідний стрес-протекторний ефект спостерігався при використанні мелатоніну в концентраціях 20, 50 і 100 мкМ. Вплив передобробки мелатоніном на ростові показники проростків жита за умов теплового стресу виявився менш виразним. Відзначалося вірогідне зменшення інгібу-

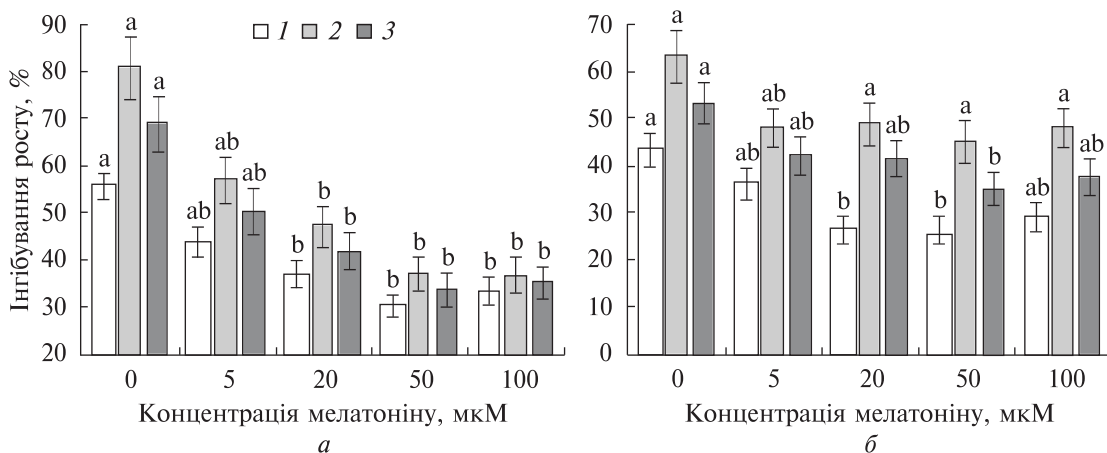


Рис. 1. Вплив обробки зернівок мелатоніном на інгібування росту (%) пагонів (1), коренів (2) і проростків в цілому (3) після дії теплового стресу (44 °С, 6 год). (а) – *Triticum aestivum*; (б) – *Secale cereale*. Тут і на рис. 2–5 однаковими літерами позначені величини, різниці між якими не вірогідні при $P \leq 0,05$ при їх порівнянні в межах одного виду рослин

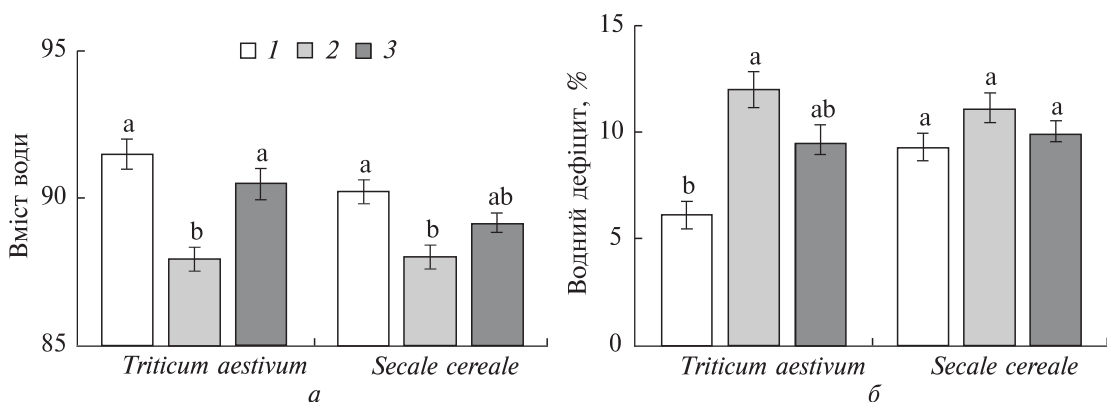


Рис. 2. Вміст води (а – %) і водний дефіцит (б – %) у пагонах проростків пшениці і жита. 1 – контроль; 2 – тепловий стрес (44 °С, 6 год); 3 – тепловий стрес + мелатонін (50 мкМ)

вання росту пагонів за попередньої обробки зернівок мелатоніном в концентраціях 20 і 50 мкМ. Мелатонін в усіх досліджуваних концентраціях дещо зменшував спричинюване тепловим стресом інгібування росту коренів, проте ці ефекти виявилися не вірогідними за $P \leq 0,05$ (рис. 1). При розрахунку ростових ефектів на цілі проростки жита вірогідне зменшення інгібування росту відзначалося при використанні мелатоніну в концентрації 50 мкМ. Зважаючи на це, саме цю концентрацію мелатоніну використовували у наступних серіях експериментів.

Експозиція проростків за високої температури і зниженої вологості повітря спричиняла зменшення вмісту води у пагонах пшениці і

(менш помітно) жита (рис. 2, а). У проростків пшениці у варіанті з обробкою зернівок мелатоніном вміст води у пагонах вірогідно підвищувався, а у жита подібний ефект відзначався на рівні тенденції.

У проростків пшениці також виявлено істотне зростання величини водного дефіциту після стресового впливу, а обробка зернівок мелатоніном зменшувала цей ефект (рис. 2, б). У жита істотного зростання водного дефіциту не виявлено. Відповідно не вдалося зафіксувати і вірогідної зміни цього показника у варіанті з обробкою зернівок мелатоніном, хоча вона спричиняла тенденцію до зменшення водного дефіциту (рис. 2, б).

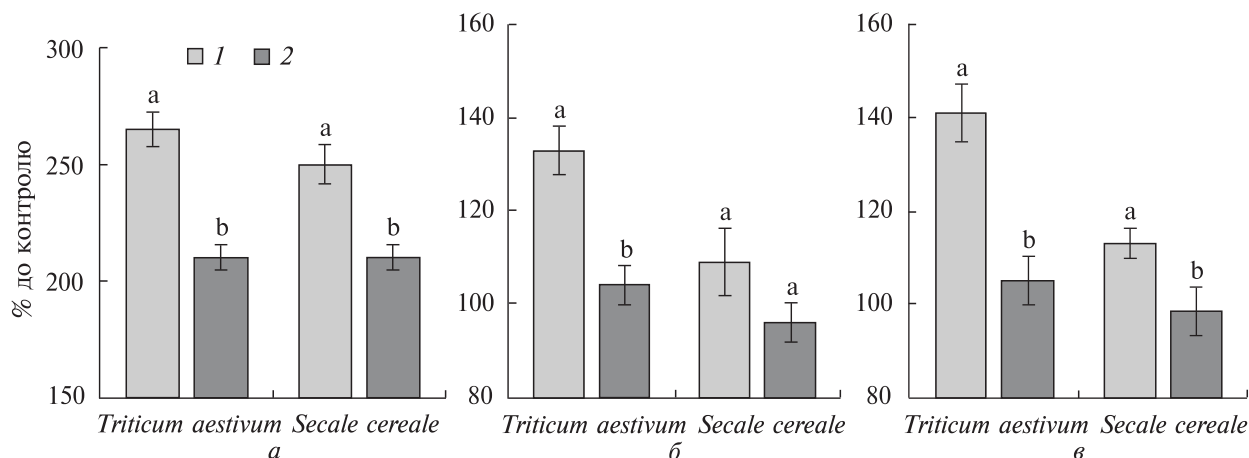


Рис. 3. Генерація супероксидного аніон-радикала (*a* – % до контролю), вміст перексиду водню (*б* – % до контролю) і вміст МДА (*в* – % до контролю) у пагонах проростків пшениці і жита. 1 – тепловий стрес (44 °С, 6 год); 2 – тепловий стрес + мелатонін (50 мкМ)

Після експозиції проростків пшениці і жита за високої температури істотно (у 2,50–2,65 раза) зростала генерація ними супероксидного аніон-радикала (рис. 3, *a*). Обробка мелатоніном зменшувала прояв такого ефекту в обох видів злаків.

Тепловий стрес також спричиняв зростання вмісту перексиду водню у пагонах проростків пшениці приблизно на 33 %, а у жита такий ефект був незначним (рис. 3, *б*). Обробка мелатоніном майже повністю усувала спричинюване тепловим стресом зростання вмісту перексиду водню у проростках пшениці, у жита під впливом мелатоніну відзначалася тенденція до невеликого зменшення вмісту H_2O_2 у пагонах (рис. 3, *б*).

Вміст продукту ПОЛ МДА після теплового стресу помітно зростав у пагонах проростків пшениці і незначною мірою у жита (рис. 3, *в*). Передобробка мелатоніном знижувала вміст МДА у пагонах проростків пшениці і жита за стресових умов до рівня контролю.

Активність каталази у пагонах проростків пшениці під впливом теплового стресу знижувалася, а у жита істотно не змінювалася (рис. 4, *a*). Попередня обробка зернівок пшениці мелатоніном спричиняла істотне (в 1,6 раза) зростання активності ферменту в стресових умовах. Підвищення активності каталази у пагонах проростків жита під впливом мелатоніну за умов стресу було менш виразним (рис. 4, *a*).

Активність гваяколпероксидази у пагонах проростків пшениці після дії високої температури знижувалася, а у проростків жита дещо підвищувалася, але цей ефект був вірогідним лише за $P \leq 0,1$ (рис. 4, *б*). Обробка мелатоніном спричиняла стабілізацію активності ферменту у проростків пшениці до рівня контролю, а у проростків жита відзначалося її вірогідне підвищення порівняно з контрольним і стресовим варіантами.

Тепловий стрес викликав деяке (вірогідне за $P \leq 0,1$) зниження вмісту розчинних вуглеводів у пагонах проростків пшениці, натомість у жита відзначалася тенденція до деякого збільшення вмісту цукрів після стресового впливу (рис. 5, *a*). Обробка зернівок мелатоніном спричиняла значне підвищення вмісту розчинних вуглеводів у пагонах обох видів за умов теплового стресу.

Під впливом нагріву відзначалося істотне зростання вмісту проліну у пагонах проростків пшениці і менше у жита (рис. 5, *б*). При цьому однак базовий вміст проліну у жита був дещо вищим, ніж у пшениці. Обробка мелатоніном вірогідно не впливала на вміст проліну у проростках обох видів злаків.

Таким чином, обробка зернівок пшениці і жита мелатоніном зменшувала негативний вплив теплового стресу на ростові процеси та показники водного режиму, а також модифікувала прояв окиснювального стресу і функціонування клітинних протекторних систем.

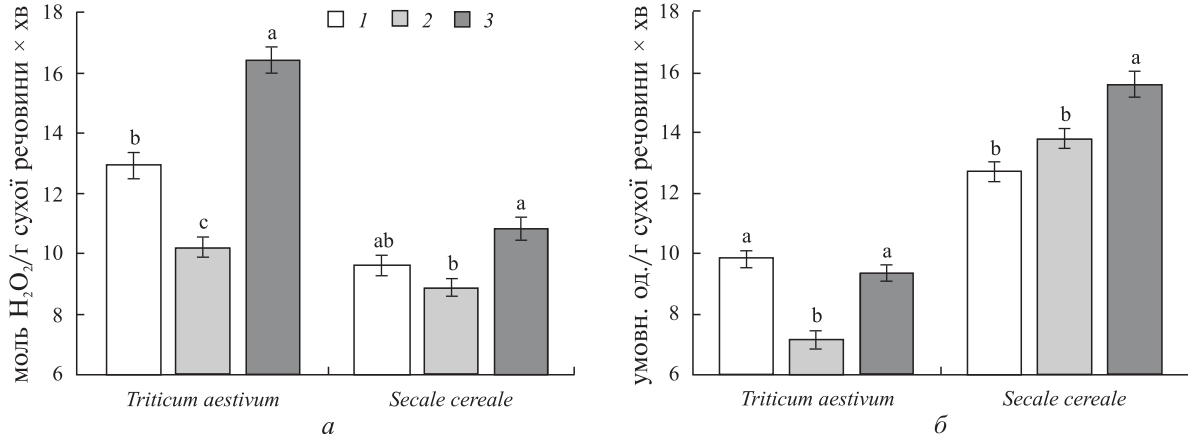


Рис. 4. Активність каталази (а – ммоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{г}$ сухої речовини \times хв) і пероксидази (б – умовн. од./г сухої речовини \times хв) ферментів у пагонах проростків пшениці і жита. 1 – контроль; 2 – тепловий стрес (44 °С, 6 год); 3 – тепловий стрес + мелатонін (50 мкМ)

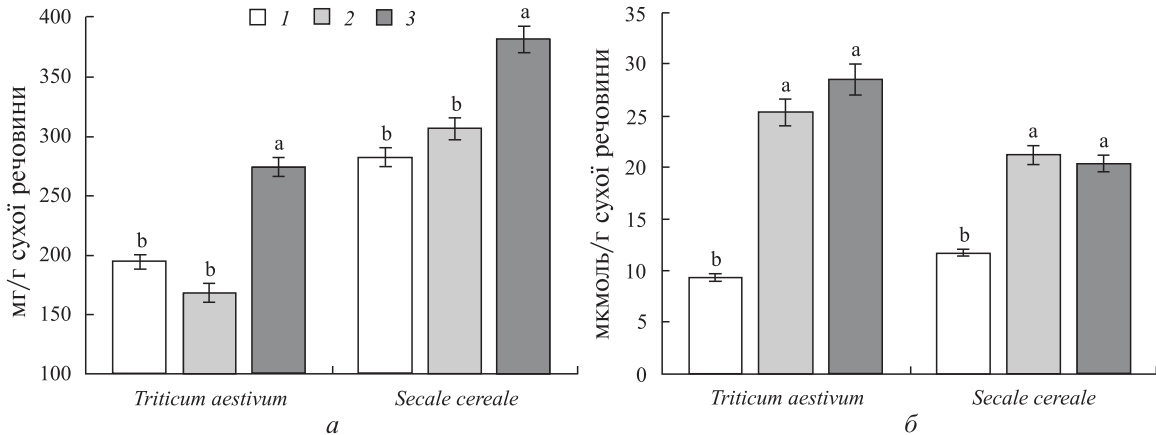


Рис. 5. Вміст розчинних вуглеводів (а – мг/г сухої речовини) і проліну (б – мкмоль/г сухої речовини) у пагонах проростків пшениці і жита. 1 – контроль; 2 – тепловий стрес (44 °С, 6 год); 3 – тепловий стрес + мелатонін (50 мкМ)

Підвищення теплостійкості за дії екзогенного мелатоніну показано на прикладі ряду рослин з різною таксономічною приналежністю, зокрема, томатів (Xu et al, 2016), райграсу (Zhang et al, 2017), костриці (*Festuca altissima*) (Alam et al, 2018). Нещодавно у двох роботах було досліджено вплив фоліарних обробок мелатоніном на теплостійкість дорослих зелених рослин пшениці (Buttar et al, 2020; Iqbal et al, 2021). При цьому відзначено, що екзогенний мелатонін пом'якшував ефект інгібування росту, спричинюваний нагрівом, сприяв збереженню пулу хлорофілу і активності рибулозобісфосфаткарбоксилази (Iqbal et

al, 2021). Водночас за дії мелатоніну зменшувались прояви окиснювальних пошкоджень, зростала активність супероксиддисмутази (СОД), каталази, аскорбатпероксидази і глутатіонредуктази. Також встановлено посилення мелатоніном експресії відповідних генів антиоксидантних ферментів – *TaCAT*, *TaSOD*, *TaPOD* (Buttar et al, 2020).

У нашій роботі вперше зафіксовано позитивний вплив обробки насіння на теплостійкість пшениці на ранній фазі розвитку. Слід зазначити, що нещодавно було показано посилення проростання зернівки пшениці при низьких температурах за їх обробки мелатоні-

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

Іншою важливою складовою підвищення теплостійкості проростків пшениці мелатоніном, ймовірно, є посилення накопичення в проростках розчинних вуглеводів (рис. 5, а), які за гіпертермії можуть виконувати мембранопротекторні, антиденатураційні, осмопротекторні, антиоксидантні і сигнальні функції (Yatsyshyn et al, 2017; Kolupaev et al, 2023). Посилення синтезу сахарози та інших розчинних вуглеводів показано і у дорослих рослин пшениці при гіпертермії за їх попередньої фоліарної обробки мелатоніном (Iqbal et al, 2021).

Ще одним мультифункціональним стресовим метаболітом, задіяним в адаптації рослин до теплового стресу, є пролін (Iqbal et al, 2019). У роботі Buttari і співавт. (2020) показано зниження вмісту проліну у листках дорослих рослин пшениці після 6-годинного впливу на них температури 42 °С і його підвищення за попередньої обробки мелатоніном. У наших дослідженнях вміст проліну в етіюльованих проростках пшениці після подібного температурного впливу істотно підвищувався (рис. 5, б). При цьому обробка мелатоніном практично не впливала на цей показник. Можна припустити, що метаболізм проліну у рослин пшениці як за гіпертермії, так і за дії мелатоніну залежить від фази їх розвитку. Як уже зазначалося, дані про вплив екзогенного мелатоніну на вміст проліну у рослин різних видів неоднозначні: є відомості

як про посилення, так і про зниження його накопичення за стресових умов (Antonioni et al, 2017; Zhang et al, 2021). Такі суперечності можуть бути зумовлені різним рівнем стресового навантаження на рослини і неоднаковим станом їх антиоксидантної системи в цілому. Відомо, що процеси генерації АФК і накопичення проліну функціонально взаємопов'язані (Signorelli et al, 2014). В умовах наших експериментів обробка мелатоніном помітно знижувала генерацію АФК і накопичення продуктів ПОЛ в проростках злаків за умов теплового стресу (рис. 3). При цьому відзначалася активація антиоксидантних ферментів та посилення накопичення цукрів. Ймовірно, підтримання рослинами, вирощеними з насіння, обробленого мелатоніном, про-/антиоксидантного балансу не створювало передумов для додаткового посилення накопичення проліну, який досить часто накопичується у рослин за жорстких стресових умов.

У нашій роботі порівнювався вплив обробки мелатоніном на теплостійкість проростків пшениці і жита. Як уже зазначалося, жито, принаймні на стадії проростків, виявляє вищу порівняно з пшеницею стійкість до окиснювального стресу (Kolupaev et al, 2016; 2022), що може бути пов'язане з особливостями функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем. Зокрема, для проростків жита, на відміну від інших злаків, характерна набагато вища активність неспецифічної пероксидази, високий базовий вміст вторинних метаболітів, а також підвищений конститутивний вміст проліну, розчинних вуглеводів і, ймовірно, інших осмолітів (Kolupaev et al, 2016). За умов наших експериментів показано, що обробка зернівок жита мелатоніном спричиняла зменшення рістінгібуючого впливу теплового стресу на проростки (рис. 1), однак цей ефект був менш помітним, ніж виявлений у рослин пшениці. При цьому важливо, що в контролі проростки жита виявляли вищу теплостійкість, ніж проростки пшениці. У проростків жита, на відміну від проростків пшениці, за стресових умов показники водного балансу зберігалися майже на рівні контролю і вплив на них мелатоніну був невиразним (рис. 2). Натомість у проростків пшениці обробка мелатоніном сприяла збереженню вмісту води, близького до контролю.

Ймовірно, причиною таких відмінностей є вищий базовий вміст осмолітів у проростків жита (Kolupaev et al, 2015). Також у проростків жита за умов теплового стресу не проявлялися помітні ознаки розвитку окиснювального стресу: вміст пероксиду водню і МДА зростав незначною мірою (рис. 3). Водночас обробка мелатоніном і у цьому випадку підсилювала функціонування окремих компонентів клітинних протекторних систем, спричиняючи зростання активності каталази, гваяколпероксидази і вмісту цукрів у проростків жита (рис. 4, 5).

Як зазначалося, мелатонін серед інших має властивості потужного антиоксиданту (Agnao, Hernandez-Ruiz, 2015). Цим, принаймні частково, деякі автори пояснюють його стрес протекторну дію. Водночас ефекти, спричинювані обробкою насіння мелатоніном, навряд чи можна пояснити його прямою антиоксидантною дією, оскільки вони пролонговані в часі і виявлялися щонайменше впродовж кількох діб після обробки. Проте можна припустити, що виявлені ефекти мелатоніну зумовлені активацією сигнальної мережі, одним з компонентів якої є АФК. Так, у томатів виявлено підвищення активності НАДФН-оксидази і вмісту H_2O_2 за обробки мелатоніном (Gong et al, 2017). При цьому інгібітор НАДФН-оксидази дифеніленіодоніум усував підвищення стійкості рослин до теплового і осмотичного стресів, спричинюване мелатоніном. Раніше нами було досліджено вплив обробки коренів

проростків пшениці мелатоніном на стійкість до короткочасного потенційно летального агріву (Taraban et al, 2022). Така обробка мелатоніном спричиняла транзиторне підвищення вмісту пероксиду водню у коренях. Водночас обробка проростків скавенджером пероксиду водню диметилтіосечовиною або інігібітором НАДФН-оксидази імідазолом усувала як спричинюване мелатоніном посилення генерації пероксиду водню, так і розвиток теплостійкості проростків, що вказує на роль АФК в реалізації стрес-протекторної дії мелатоніну (Taraban et al, 2022). Цілком ймовірно, що саме за посередництва АФК відбувається активація компонентів антиоксидантної системи, які причетні до захисту клітин від окиснювальних пошкоджень за умов теплового стресу.

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

У проростків жита внаслідок теплового стресу істотно зростала тільки генерація супероксидного аніон-радикала, а інші показники

Характер змін показників функціонування клітинних протекторних систем у проростків пшениці жита за умов теплового стресу і обробки мелатоніном

Варіант	Показники окиснювального стресу			Активність антиоксидантних ферментів		Вміст осмопротекторів	
	Генерація $O_2^{\cdot-}$	Вміст H_2O_2	Вміст МДА	Каталаза	ГПО	Цукри	Пролін
<i>Triticum aestivum</i>							
Тепловий стрес	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↑
Тепловий стрес + мелатонін	→	→	→	↑	→	↑	↑
<i>Secale cereale</i>							
Тепловий стрес	↑	→	→	→	→	→	↑
Тепловий стрес + мелатонін	→	→	→	↑	↑	↑	↑

Примітки. ↑ – підвищення відносно контролю; → – відсутність змін або наближення до показників контролю; ↓ – зниження відносно контролю; ГПО – гваяколпероксидаза; МДА – малоновий діальдегід.

окиснювального стресу слабо відрізнялися від контролю. При цьому обробка мелатоніном дещо зменшувала спричинюване нагрівом посилення генерації $O_2^{\cdot-}$.

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

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

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

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Робота виконувалась за програмою наукових досліджень НААН «Формування та використання банку генетичних ресурсів рослин», номер держреєстрації 0121U100564.

INDUCTION BY MELATONIN OF CELL PROTECTIVE REACTIONS OF *TRITICUM AESTIVUM* AND *SECALE CEREALE* TO HIGH TEMPERATURES ACTION

Yu.E. Kolupaev, D.A. Taraban,
Yu.V. Karpets, B.E. Makaova, N.I. Ryabchun,
A.I. Dyachenko, O.P. Dmitriev

Yuriev Institute of Plant Production, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Heroiv Kharkova ave., 142, Kharkiv, 61060, Ukraine
Poltava State Agrarian University, Skovorody str., 1/3, Poltava, 36003, Ukraine
State Biotechnological University, Alchevskih str., 44, Kharkiv, 61022, Ukraine
Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Akademika Zabolotnogo str., 148, Kyiv, 03143, Ukraine

E-mail: plant_biology@ukr.net, dmitriev.ap@gmail.com

Currently, melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is considered as a multifunctional bioregulator not only in mammals, but also in plants. The aim of the work was to study the effect of melatonin on the resistance of wheat (*Triticum aestivum* L., var. Doskonala) and rye (*Secale cereale* L., var. Pam'yat Khudoyerka) seedlings to high temperatures and the functioning of key cellular defense systems – antioxidant and osmoprotective. Rye seedlings differed from wheat seedlings in higher heat resistance, which was manifested in less inhibition of growth after 6-hour heating at the temperature of 44 °C and in less manifestation of the effects of oxidative stress. Treatment of wheat grains with melatonin at concentrations ranging from 20–100 μM significantly reduced shoot and root growth inhibition caused by high temperature. Rye seedlings were less affected by melatonin, reducing only the inhibition of shoot growth. Treatment with melatonin prevented the development of oxidative stress caused by the effect of high temperature, which was manifested in decrease of the rate of superoxide radical generation, the content of hydrogen peroxide and malondialdehyde in the shoots of wheat and rye seedlings. Treatment of grains of both types of cereals with melatonin caused an increase in catalase activity under the heat stress. Treatment with melatonin also contributed to the stabilization of peroxidase activity in wheat under the stress conditions and caused its increase in rye. In addition, treatment of grains with melatonin caused an increase in the content of soluble carbohydrates under the stress conditions, but did not significantly affect the content of proline in the shoots of seedlings of both species. In general, a less noticeable effect of melatonin treatment on the functioning of protective systems of rye was noted. The key effects of melatonin under the stress conditions are the reduction of oxidative damage to cells, increased activity of antioxidant enzymes, and increased accumulation of soluble carbohydrates.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Alam MN, Zhang L, Yang L et al (2018) Transcriptomic profiling of tall fescue in response to heat stress and improved thermotolerance by melatonin and 24-

- epibrassinolide. *BMC Genomics* 19(1):224. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4588-y>.
- Antoniou C, Chatzimichail G, Xenofontos R et al (2017) Melatonin systemically ameliorates drought stress-induced damage in *Medicago sativa* plants by modulating nitro-oxidative homeostasis and proline metabolism. *J Pineal Res* 62(4). <https://doi.org/10.1111/jpi.12401>.
- Arnao MB, Hernandez-Ruiz J (2015) Functions of melatonin in plants: a review. *J Pineal Res* 59:133–150. <https://doi.org/10.1111/jpi.12253>.
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2019a) Melatonin: A New plant hormone and/or a plant master regulator? *Trends Plant Sci* 24(1):38–48. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.010>.
- Arnao M, Hernández-Ruiz J (2019b) Melatonin and reactive oxygen and nitrogen species: a model for the plant redox network. *Melatonin Res* 2(3):152–168. <https://doi.org/10.32794/11250036>.
- Barrs H, Weatherley P (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust J Biol Sci* 15(3):413–428.
- Bates LS, Walden RP, Tear GD (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39:205–210. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Buttar ZA, Wu SN, Arnao MB et al (2020) Melatonin suppressed the heat stress-induced damage in wheat seedlings by modulating the antioxidant machinery. *Plants (Basel)* 9(7):809. <https://doi.org/10.3390/plants9070809>.
- Chang J, Guo Y, Li J et al (2021) Positive interaction between H₂O₂ and Ca²⁺ mediates melatonin-induced CBF pathway and cold tolerance in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). *Antioxidants* 10:1457. <https://doi.org/10.3390/antiox10091457>
- Cui G, Sun F, Gao X et al (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>.
- Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E et al (1995) Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pineal Res* 18: 28–31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1995.tb00136.x>.
- Fan J, Xie Y, Zhang Z, Chen L (2018) Melatonin: A multifunctional factor in plants. *Int J Mol Sci* 19:1528. <https://doi.org/10.3390/ijms19051528>.
- 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(4):396–409. <https://doi.org/10.1111/ppl.12581>.
- Hardeland R (2012) Neurobiology, pathophysiology, and treatment of melatonin deficiency and dysfunction. *Sci World J* 2012:640389. <https://doi.org/10.1100/2012/640389>.
- Iqbal N, Fatma M, Khan NA, Umar S (2019) Regulatory role of proline in heat stress tolerance: modulation by salicylic acid. In: Khan MIR, Reddy PS, Ferrante A, Khan NA (eds) *Plant Signaling Molecules*. Elsevier, 437–448 pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00027-7>.
- Iqbal N, Fatma M, Gautam H et al (2021) The crosstalk of melatonin and hydrogen sulfide determines photosynthetic performance by regulation of carbohydrate metabolism in wheat under heat stress. *Plants* 10:1778. <https://doi.org/10.3390/plants10091778>.
- Jahan MS, Shu S, Wang Y et al (2019) Melatonin alleviates heat-induced damage of tomato seedlings by balancing redox homeostasis and modulating polyamine and nitric oxide biosynthesis. *BMC Plant Biol* 19(1):414. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1992-7>.
- Karpets YuV, Kolupaev YuE, Yastreb TO, Oboznyi AI (2015) Effects of NO-Status modification, heat hardening, and hydrogen peroxide on the activity of antioxidant enzymes in wheat seedlings. *Russ J Plant Physiol* 62(3):292–298. <https://doi.org/10.1134/S1021443715030097>.
- Karpets YuV, Shkliarevskiy MA, Khripach VA, Kolupaev YuE (2021) State of enzymatic antioxidative system and heat resistance of wheat plantlets treated by combination of 24-epibrassinolide and NO donor. *Cereal Res Comm* 49(2):207–216. <https://doi.org/10.1007/s42976-020-00090-5>.
- Kolupaev YuE, Makaova BE, Ryabchun NI et al (2022) Adaptation of cereal seedlings to oxidative stress induced by hyperthermia. *Agricult Forestry* 68(4):7–18. <https://doi.org/10.17707/AgricultForest.68.4.01>.
- Kolupaev YuE, Ryabchun NI, Vayner AA et al (2015) Antioxidant enzyme activity and osmolyte content in winter cereal seedlings under hardening and cryostress. *Russ J Plant Physiol* 62(4):499–506. <https://doi.org/10.1134/S1021443715030115>.
- Kolupaev YuE, Yastreb TO, Oboznyi AI et al (2016) Constitutive and cold-induced resistance of rye and wheat seedlings to oxidative stress. *Russ J Plant Physiol* 63(3):326–337. <https://doi.org/10.1134/S1021443716030067>.
- Kolupaev YuE, Yastreb TO, Ryabchun NI et al (2023) Cellular mechanisms for the formation of plant adaptive responses to high temperatures. *Cytol Genet* 57(1):55–75. <https://doi.org/10.3103/S0095452723010048>.
- Koster KL, Lynch DV (1992) Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. *Plant Physiol* 98(1):108–113. <https://doi.org/10.1104/pp.98.1.108>.

- Lei K, Sun S, Zhong K, et al (2021) Seed soaking with melatonin promotes seed germination under chromium stress via enhancing reserve mobilization and antioxidant metabolism in wheat. *Ecotoxicol Environ Saf* 220:112241. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112241>.
- Meng JF, Xu TF, Wang ZZ et al (2014) The ameliorative effects of exogenous melatonin on grape cuttings under water-deficient stress: antioxidant metabolites, leaf anatomy, and chloroplast morphology. *J Pineal Res* 57(2):200–212. <https://doi.org/10.1111/jpi.12159>.
- Nawaz K, Chaudhary R, Sarwar A et al (2021) Melatonin as master regulator in plant growth, development and stress alleviator for sustainable agricultural production: current status and future perspectives. *Sustainability* 13:294. <https://doi.org/10.3390/su13010294>.
- Oboznyi OI, Kryvoruchenko RV, Shevchenko MV, Kolupaev YuE. (2013) Antioxidant activity of winter wheat seedlings of different ecotypes in connection with sustainable hyperthermia and dehydration. *Visnik Harkivs'kogo Nacional'nogo Agrarnogo Universitetu. Seriâ Biologiâ* 1(28):52–59.
- Romanenko KO, Babenko LM, Smirnov OE, Kosakivska IV (2022) Antioxidant protection system and photosynthetic pigment composition in *Secale cereale* subjected to short-term temperature stresses. *Open Agric J* 16: e187433152206273. <https://doi.org/10.2174/18743315-v16-e220627>.
- Romanenko O, Kushch I, Zayets S, Solodushko M (2018) Viability of seeds and sprouts of winter crop varieties under drought conditions of Steppe. *Agroecol J* 1:87–95. <https://doi.org/10.33730/2077-4893.1.2018.160584>.
- Sagisaka S (1976) The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*. *Plant Physiol*, 57: 308–309. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.308>.
- Siddiqui MH, Alamri S, Al-Khaishany MY et al (2019) Exogenous melatonin counteracts NaCl-induced damage by regulating the antioxidant system, proline and carbohydrates metabolism in tomato seedlings. *Int J Mol Sci* 20(2):353. <https://doi.org/10.3390/ijms20020353>.
- Signorelli S, Coitino EL, Borsani O, Monsa J (2014) Molecular mechanisms for reactions between OH radicals and proline. *J Phys Chem* 118(1):137–147. <https://doi.org/10.1021/jp407773u>.
- Sun Q, Zhang N, Wang J et al (2015) Melatonin promotes ripening and improves quality of tomato fruit during postharvest life. *J Exp Bot* 66(3):657–668. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru332>.
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B et al (1993) Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1:57–60.
- Taraban DA, Karpets YuV, Yastreb TO et al (2022). Ca²⁺- and ROS-dependent induction of heat resistance of wheat seedlings by exogenous melatonin. *Rep Natl Acad Sci Ukr* 4:98–105. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.04.098>.
- Wang P, Yin L, Liang D et al (2012) Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate-glutathione cycle. *J Pineal Res* 53(1):11–20. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00966.x>.
- Wang Y, Reiter RJ, Chan Z (2018) Phyto-melatonin: a universal abiotic stress regulator. *J Exp Bot* 69 (5):963–974. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx473>.
- Wei J, Li D, Zhang J et al (2018) Phyto-melatonin receptor PMTR1-mediated signaling regulates stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *J Pineal Res* 65(2):e12500. <https://doi.org/10.1111/jpi.12500>.
- Xu W, Cai SY, Zhang Y et al (2016) Melatonin enhances thermotolerance by promoting cellular protein protection in tomato plants. *J Pineal Res* 61(4):457–469. <https://doi.org/10.1111/jpi.12359>.
- 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 Physiol Biochem* 180 (1):91–105. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.03.030>.
- Yatsyshyn VYu, Kvasko AYU, Yemets AI (2017) Genetic approaches in research on the role of trehalose in plants. *Cytol Genet* 51(5):371–383. <https://doi.org/10.3103/S0095452717050127>.
- Yu Y, Lv Y, Shi Y et al (2018) The role of phyto-melatonin and related metabolites in response to stress. *Molecules* 23(8):1887. <https://doi.org/10.3390/molecules23081887>.
- Zhang H, Liu L, Wang Z et al (2021) Induction of low temperature tolerance in wheat by presoaking and parental treatment with melatonin. *Molecules* 26:1192. <https://doi.org/10.3390/molecules26041192>.
- Zhang J, Shi Y, Zhang X et al (2017) Melatonin suppression of heat-induced leaf senescence involves changes in abscisic acid and cytokinin biosynthesis and signaling pathways in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Environ Exp Bot* 138:36–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.012>.
- Zhao K, Fan H, Zhou S, Song J (2003) Study on the salt and drought tolerance of *Suaeda salsa* and *Kalanchoe clavigrammontiana* under iso-osmotic salt and water stress. *Plant Sci* 165(4):837–844. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00282-6).

Надійшла в редакцію 15.10.22
Після доопрацювання 08.11.22
Прийнята до друку 18.03.23