

БУЗІАШВІЛІ А. Ю.[✉], КУСТОВСЬКИЙ Є. О., ЄМЕЦЬ А. І.

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2а, ORCID: 0000-0002-8283-5401, 0000-0002-1536-3897, 0000-0001-6887-0705

[✉] buziashvili.an@gmail.com, (095) 302-89-30

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІВЕРМЕКТИНУ НА РОСЛИНИ КАРТОПЛІ В УМОВАХ *IN VITRO*

Мета. Дослідження впливу івермектину, розчиненого у різних органічних розчинниках (ДМСО та етанол) на морфо-фізіологічні параметри рослин картоплі (*Solanum lycopersicum*) в умовах *in vitro*. **Методи.** Рослини картоплі сорту Вернісаж культивували *in vitro* на середовищі МС у присутності 10, 50 та 100 мкг/мл івермектину, розчиненого в ДМСО або етанолі, контрольні рослини – на середовищі МС без додавання будь-яких агентів, як негативний контроль використовували рослини, вирощені на середовищі МС із додаванням 0,04, 0,2, 0,4 % етанолу чи ДМСО. Вплив івермектину, ДМСО та етанолу оцінювали через 1 місяць вирощування рослин за довжиною пагонів рослин, сумарною площею листків та вмістом фотосинтетичних пігментів.

Результати. Було виявлено незначний ріст-стимулюючий вплив івермектину у концентрації 10 мкг/мл і досліджуваних розчинників у концентраціях 0,04 %, а також фітотоксичний вплив ДМСО у концентраціях 0,2 та 0,4 % окремо та у присутності розчиненого в ньому івермектину. Вміст фотосинтетичних пігментів у присутності івермектину, розчиненого в етанолі, та 0,04 % етанолу був вищим, ніж у контролі. **Висновки.** Встановлено, що вплив івермектину на морфо-фізіологічні параметри рослин залежить від того, в якому розчиннику його розчиняють для проведення досліджень.

Ключові слова: *Solanum lycopersicum*, *Streptomyces avermitilis*, івермектин, фітотоксичність.

Проблема зараження рослинних культур нематодами є не менш важливою, ніж ураження бактеріальними та грибовими патогенами. Зазвичай, хвороби рослин можуть бути викликані одночасним інфікуванням декількома фітопатогенами – бактеріями, грибами та / або нематодами, результатом чого є відсутність специфічної симптоматики та складність діагностики, зокрема нематодного зараження [1]. Отже, актуальним є пошук і створення ефективних і безпе-

чних засобів захисту рослин від фітопатогенних нематод. Одним із найбільш відомих агентів, який ймовірно міг би задовільнити зазначеним вимогам, є івермектин – член родини авермектинів, 16-членних макроциклічних лактонів, що є продуктами життєдіяльності ґрунтової бактерії *Streptomyces avermitilis*. Серед авермектинів, найбільш економічно важливими є івермектин та абамектин. При цьому, івермектин традиційно використовується у ветеринарії та медицині у складі антипаразитичних препаратів, а абамектин використовується у сільському господарстві як інсектицид та акарицид. Загалом, вплив івермектину та абамектину на рослинний організм мало досліджувався, а результати попередніх досліджень впливу авермектинів на різні види рослин суперечливі – існують дані як про високу фітотоксичність івермектину [2–5], так і про відсутність впливу на ріст і розвиток рослин препаратів на основі авермектинів [6–8], або навіть про фітостимулюючий вплив таких агентів [9, 10].

Матеріали і методи

Культивування рослин картоплі у присутності івермектину. Маточні розчини івермектину (IVM) (Sigma Aldrich, USA) у концентрації 25 мг/мл готували, розчиняючи його у 96 % етанолі та у 100 % DMSO.

Картоплю сорту Вернісаж культивували у пробірках довжиною 15 см на середовищі МС, що містило 4,3 г/л макро- та мікросолей МС, 10 г/л сахарози, 2 мг/л піридоксину, 0,8 мг/л тіаміну, 8 г/л агару, рН 5,7. Для мікроклонального розмноження рослин як експланти використовували міжвузлові ділянки стебла, з 1–2 бічними бруньками.

Дослідження впливу івермектину на морфо-фізіологічні параметри рослин картоплі проводили, використовуючи його у концентраціях 10, 50 та 100 мкг/мл, додаючи до стерильного живильного середовища, охолодженого до 40°C, перед його розливанням у пробірки. Контрольні

© БУЗІАШВІЛІ А. Ю., КУСТОВСЬКИЙ Є. О., ЄМЕЦЬ А. І.

рослини вирощували на середовищі МС, як негативний контроль використовували 0,04, 0,2, 0,4 % етанолу чи ДМСО, які додавали до середовища МС. Культивування рослин картоплі в умовах *in vitro* проводили протягом 30 діб. Через 30 діб, пробірки з рослинами картоплі фотографували, і за допомогою програми ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) вимірювали довжину пагонів та сумарну площу листків. Також визначали вміст фотосинтетичних пігментів (хлорофілів а та b, каротиноїдів).

Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів. Концентрацію хлорофілів вимірювали за використання методики, описаної у [12], із незначними змінами. 100 мг рослинних тканин гомогенізували у ступці, до гомогенізату додавали 1 мл охолодженого етанолу (96 %) та 0,1 г СаСО₃ для нейтралізації рослинних кислот. Гомогенат переносили у центрифужні пробірки об'ємом 1,5 мл та осаджували впродовж 5 хв при 10 000 об/хв при +4°C за використання центрифуги Eppendorf 5417R. Супернатант відбирали та аналізували за допомогою спектрофотометра Spereord 200 (Analytic Jena, Німеччина) і програмного забезпечення WinAspect Plus 4.1, змішуючи 900 мкл етанолу із 100 мкл зразка. Оптичну щільність хлорофілів вимірювали при 664,4 нм і 648,6 нм, каротиноїдів – при 470 нм; як контроль використовували 96 % етанол. Концентрацію хлорофілів і каротиноїдів у зразках визначали за формулами [13], вміст пігментів обраховували із урахуванням маси наважки:

$$C_{\text{хл а}} = 13,36 \cdot A_{664,4} - 5,19 \cdot A_{648,6}$$

$$C_{\text{хл в}} = 27,43 \cdot A_{648,6} - 8,12 \cdot A_{664,4}$$

$$C_{\text{кар}} = (1000 \cdot A_{470} - 2,13 \cdot C_{\text{хл а}} - 97,64 \cdot C_{\text{хл в}}) / 209.$$

Статистичка обробка даних. Дослідження проводили не менш ніж у трьох повторностях. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного пакету Microsoft Office Excel 2019. Достовірність результатів підтверджували за допомогою критерію Стьюдента для 5 % рівня значущості.

Результати та обговорення

Загалом, у результаті дослідження було встановлено, що вплив івермектину на рослини картоплі сорту Вернісаж відрізнявся у залежності від того, в якому розчиннику його розчиняли

для проведення досліджень. Зокрема, було виявлено, що рослини картоплі, які вирощували у присутності івермектину в концентраціях 10 та 50 мкг/мл, розчиненому у ДМСО, мали більшу довжину пагонів і сумарну площу листків, ніж контрольні рослини. Однак, довжина пагонів і сумарна площа листків рослин, які вирощували у присутності івермектину, розчиненому в етанолі, була меншою, порівняно з контролем (рис. 1, 2). Також було виявлено позитивний вплив на морфо-фізіологічні параметри рослин картоплі 10 мкг/мл івермектину, а також етанолу та ДМСО у концентрації 0,04 %. Значення довжини пагона та сумарної площі поверхні листків у рослин, які вирощували у присутності 10 мкг/мл івермектину або органічних розчинників, перевищували зазначені показники у контролі, тобто, рослин, які культивували на середовищі МС без додавання речовин (рис. 1, рис. 2). Так, довжина пагонів рослин картоплі, вирощених у присутності івермектину у концентраціях 10, 50 та 100 мкг/мл, розчиненому у ДМСО, становила у середньому 86,2, 57,5, 36,2 мм, у той час як у присутності ДМСО у концентраціях 0,04, 0,2 та 0,4 % довжина пагонів становила 58,2, 38,4, 28,9 мм.

За дії івермектину у концентраціях 10, 50 та 100 мкг/мл, розчиненому в етанолі, довжина пагонів рослин картоплі становила 68,4, 51,9, 43,5 мм, у присутності етанолу в концентраціях 0,04, 0,2 та 0,4 % – 92,6, 74,3, 61,3 мм. Довжина пагонів рослин картоплі на середовищі МС без додавання будь-яких агентів була 60,2 мм (рис. 1). Сумарна площа листків однієї рослини картоплі становила у середньому 155,4, 46,7, 40,6 мм² за дії 10, 50 та 100 мкг/мл івермектину, розчиненому у ДМСО, та 65,7, 30,1, 40,3 мм² за дії 0,04, 0,2 та 0,4 % ДМСО; у присутності 10, 50 та 100 мкг/мл івермектину, розчиненому в етанолі – 86,4, 68,2, 43,6 мм² та 106,8, 74,4 й 59,9 мм² у присутності 0,04, 0,2 та 0,4 % етанолу, доданого до живильного середовища МС. Сумарна площа листків картоплі на середовищі МС без додавання зазначених агентів була 28,5 мм² (рис. 2) Отже, можна припустити, що івермектин, розчинений в етанолі, пригнічує ріст і розвиток рослин картоплі, у той час як розчинений у ДМСО – в незначній мірі стимулює.

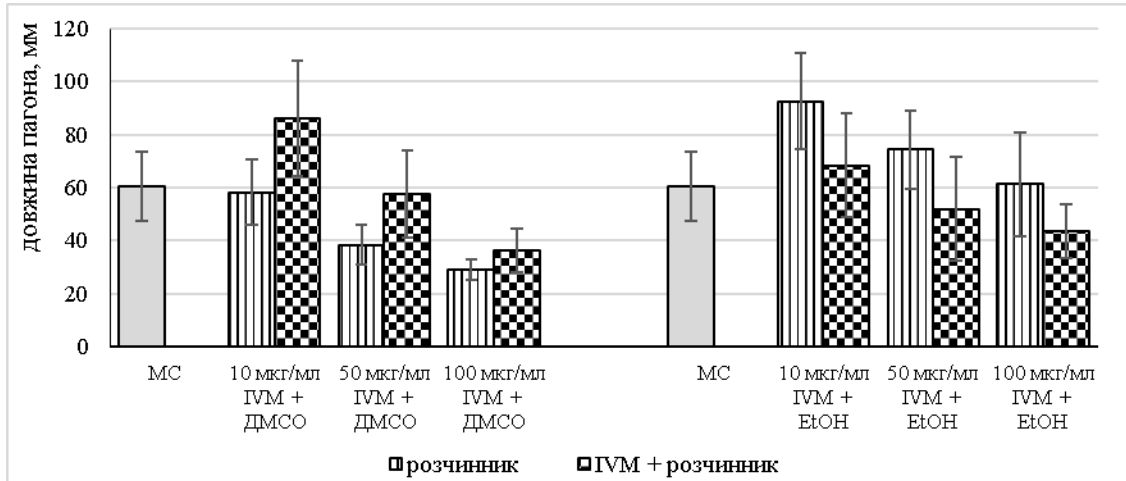


Рис. 1. Вплив 10, 50 та 100 мкг/мл івермектину (IVM), розчиненого у ДМСО й етанолі (EtOH) у концентраціях 0,04, 0,2 та 0,4 % на довжину пагонів рослин картоплі.

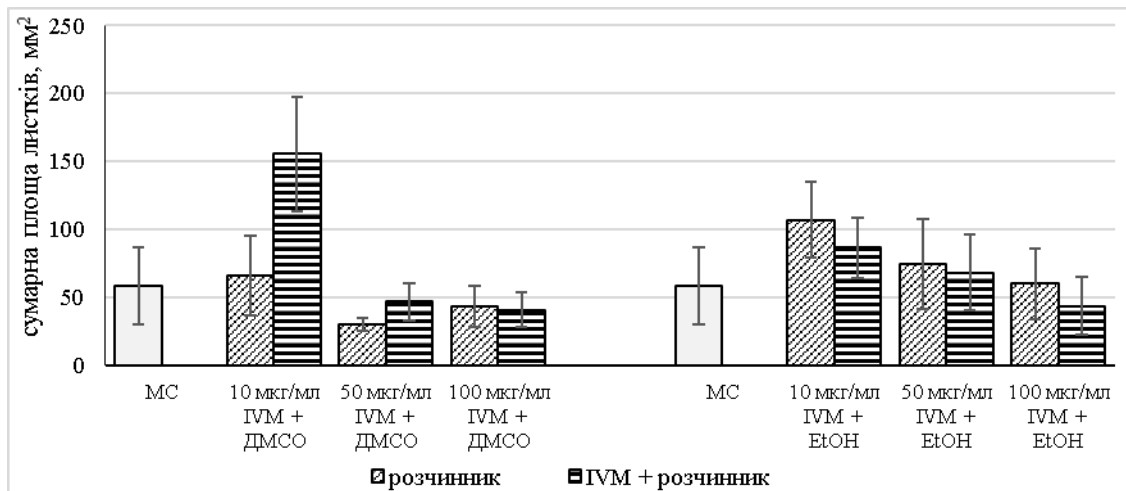


Рис. 2. Вплив 10, 50 та 100 мкг/мл івермектину (IVM), розчиненого у ДМСО й етанолі (EtOH), у концентраціях 0,04, 0,2 та 0,4 % на сумарну площу листків рослин картоплі.

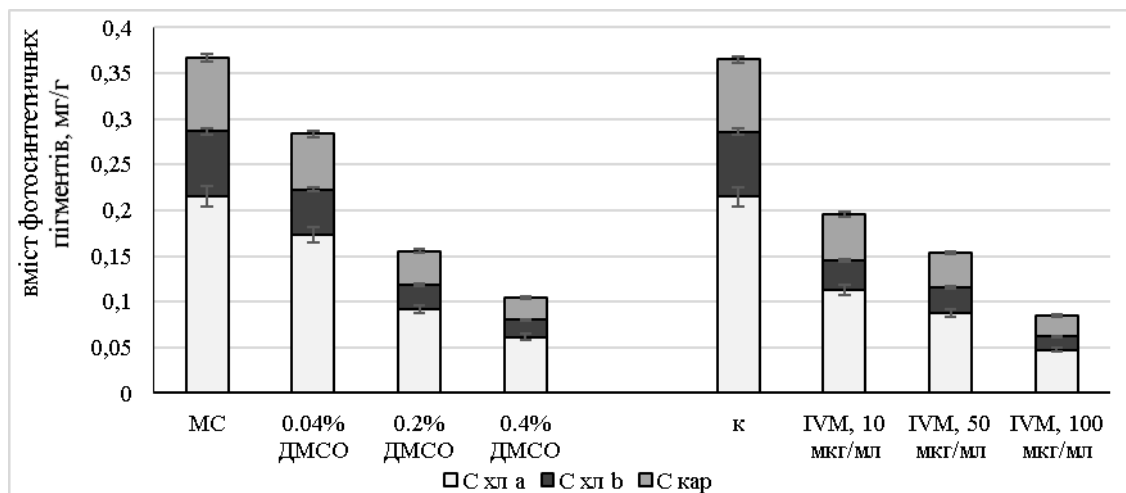


Рис. 3. Вміст фотосинтетичних пігментів у рослинах картоплі, які вирощували у присутності 10, 50 та 100 мкг/мл івермектину (IVM), розчиненого у ДМСО, та у присутності власне ДМСО у концентраціях 0,04, 0,2 та 0,4 %, а також на середовищі МС без додавання івермектину та ДМСО.

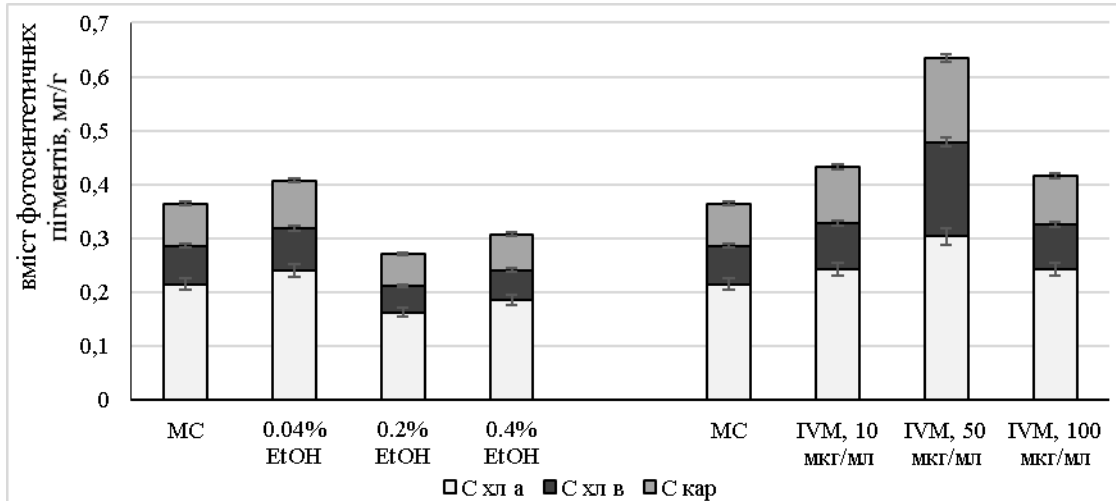


Рис. 4. Вміст фотосинтетичних пігментів у рослинах картоплі, які вирощували у присутності 10, 50 та 100 мкг/мл івермектину (IVM), розчиненого в етанолі (EtOH), та у присутності власне етанолу у концентраціях 0,04, 0,2 та 0,4 %, а також на середовищі МС без додавання івермектину та етанолу.

Також було досліджено вплив івермектину на вміст фотосинтетичних пігментів у листках рослин картоплі. Загалом, було показано, що івермектин, розчинений у ДМСО, як і власне ДМСО у досліджуваних концентраціях значно зменшують вміст хлорофілу а, b і каротиноїдів у листках картоплі (рис. 3), у той час як івермектин, розчинений в етанолі, сприяв підвищенню вмісту хлорофілів і каротиноїдів, порівняно з впливом етанолу у концентраціях 0,04, 0,2 та 0,4 % (рис. 4). Також, було виявлено, що у рослинах картоплі, які вирощували у присутності 50 мкг/мл івермектину та 0,2 % етанолу, вміст хлорофілів а, b і каротиноїдів значно перевищував відповідні показники у контрольних рослин, які вирощували на середовищі МС без додавання цих агентів (рис. 4). Сумарний вміст хлорофілів а, b і каротиноїдів становив: у контрольних рослинах, вирощених на середовищі МС – 0,365 мг/г сирової маси, у присутності 10, 50, 100 мкг/мл івермектину, розчиненому в етанолі – 0,433, 0,634, 0,416 мг/г, у присутності 0,04, 0,2 чи 0,4 % етанолу – 0,407, 0,271, 0,308 мг/г; у присутності івермектину, розчиненому у ДМСО – 0,195, 0,153, 0,084 мг/г, при додаванні у середовище ДМСО – 0,283, 0,155 та 0,104 мг/г сирової маси.

References

1. Tileubayeva Z., Avdeenko A., Avdeenko S., Stroiteleva N., Kondrashev S. Plant-parasitic nematodes affecting vegetable crops in greenhouses. *Saudi J. Biol. Sci.* 2021. Vol. 28 (9). P. 5428–5433. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.05.075.
2. Vokřál I., Michaela Š., Radka P., Jiří L., Lukáš P., Dominika S., Kateřina L., Barbora S., Lenka S. Ivermectin environmental impact: excretion profile in sheep and phytotoxic effect in *Sinapis alba*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2019. Vol. 169. P. 944–949. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.11.097.

Висновки

Отже, нами вперше показано, що вплив івермектину на морфо-фізіологічні параметри рослин (зокрема, картоплі) залежить від типу розчинника, який було використано при проведенні досліджень. Зокрема, було виявлено, що івермектин у низькій концентрації (10 мкг/мл), розчинений в ДМСО чи етанолі, у незначній мірі стимулює ріст рослин, у той час як у більш високих концентраціях (50 та 100 мкг/мл) – інгібує. Також, було виявлено, що у присутності ДМСО вміст фотосинтетичних пігментів був значно нижчий, ніж в контролі, а у присутності 0,04 % етанолу та івермектину, розчиненого в етанолі – вищим, ніж у відсутності цих агентів. Однак, для розуміння механізмів впливу івермектину на рослини на клітинному та молекулярному рівні й розробки доцільних стратегій використання івермектину для захисту рослин від нематод необхідні подальші дослідження.

Роботу виконано Бузіашвілі А. Ю. та Кустовським С. О. у рамках проекту науково-дослідних робіт молодих учених НАН України (№ 0123U103026, 2023–2024 р. р.) та Ємець А. І. – в рамках бюджетної теми відділу (бюджетна програма КПКВК 6541030, 2024–2028 р. р.).

3. Navrátilová M., Raisová Stuchlíková L., Motřková K., Szotáková B., Skálová L., Langhansová L., Podlipná R. The uptake of ivermectin and its effects in roots, leaves and seeds of soybean (*Glycine max*). *Molecules*. 2020. Vol. 25 (16). 3655. doi: 10.3390/molecules25163655.
4. Navrátilová M., Raisová Stuchlíková L., Skálová L., Szotáková B., Langhansová L., Podlipná R. Pharmaceuticals in environment: the effect of ivermectin on ribwort plantain (*Plantago lanceolata* L.). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2020. Vol. 27 (25). P. 31202–31210. doi: 10.1007/s11356-020-09442-4.
5. Syslová E., Landa P., Navrátilová M., Stuchlíková L.R., Matoušková P., Skálová L., Szotáková B., Vaněk T., Podlipná R. Ivermectin biotransformation and impact on transcriptome in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*. 2019. Vol. 234. P. 528–535. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.06.102.
6. Bai S. H., Ogbourne S. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. *Chemosphere*. 2016. Vol. 154. P. 204–214. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.03.113.
7. Rugg D., Buckingham S. D., Sattelle D. B., Jansson R. K. The insecticidal macrocyclic lactones. *Comprehensive Molec. Insect Sci.* 2005. P. 25–52. doi: 10.1016/b0-44-451924-6/00065-x.
8. Campbell W. C. (editor) Ivermectin and abamectin. Springer : New York, 2012. 363 p. doi: 10.1007/978-1-4612-3626-9.
9. Biliavska L., Kalmycova N., Linik V., Kozyriska V., Valaghurova H., Iutynska G. Avercom – a new home-produced preparation with nematocidal and phytostimulating action. *Agricult. microbiol.* 2008. Vol. 7. P. 69–76. doi: 10.35868/1997-3004.7.69-76. [in Ukrainian]
10. Iutynska G. O., Biliavska L. O., Kozyriska V. Y. Development strategy for the new environmentally friendly multifunctional bioformulations based on soil streptomycetes. *Microbiol. Jour.* 2017. Vol. 79 (1). P. 22–33.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.
12. Tsygankova V., Andrushevich Y., Shtompel O., Kopich V., Solomyanny R., Bondarenko O., Brovarets V. Phytohormone-like effect of pyrimidine derivatives on regulation of vegetative growth of tomato. *Internat. Jour. Bot. Stud.* 2018. Vol. 3 (2). P. 91–102.
13. Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* 1987. Vol. 148. P. 350–382.

BUZIASHVILI A. Yu., KUSTOVSKIY Ye. O., YEMETS A. I.

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Baidy-Vyshnevet'skogo str., 2a

INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF IVERMECTIN ON POTATO PLANTS *IN VITRO*

Aim. Investigation of the influence of ivermectin dissolved in different organic solvents (DMSO and ethanol) on morpho-physiological parameters of potato plants (*Solanum lycopersicum*) *in vitro*. **Methods.** Potato plants of cv. Vernisage were cultivated *in vitro* on MS medium in the presence of 10, 50 and 100 µg/ml of ivermectin dissolved in DMSO or ethanol, control plants – on MS medium without addition of any agents, and the plants grown on MS medium supplemented with 0.04, 0.2, 0.4 % of ethanol or DMSO were used as negative control. The influence of ivermectin, DMSO and ethanol was evaluated after 1 month of cultivation by the length of plant shoots, total leaf area and photosynthetic pigments content. **Results.** The growth-stimulating activity of ivermectin at concentration of 10 µg/ml and of the solvents at concentration of 0.04 % was identified, and also the phytotoxic influence of DMSO at concentrations 0.2 and 0.4 % alone or in the presence of ivermectin dissolved in it was shown in this study. Also, it was found that photosynthetic pigments content in the presence of ivermectin dissolved in ethanol, and in the presence of 0.04 % of ethanol was higher than in control. **Conclusions.** It has been established that the influence of ivermectin on morpho-physiological parameters of plants depends on the solvent in which it is dissolved for research purposes.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, *Streptomyces avermitilis*, ivermectin, phytotoxicity.