

КУСТОВСЬКИЙ Є. О.^{1,2✉}, БУЗІАШВІЛІ А. Ю.¹, ЄМЕЦЬ А. І.^{1,2}

¹ Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України, Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2, ORCID: 0000-0002-1536-3897, 0000-0002-8283-5401, 0000-0001-6887-0705

² Національний університет «Києво-Могилянська академія», Україна, 04070, м. Київ, вул. Сковороди, 2

✉ ykustovskiy@gmail.com

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІВЕРМЕКТИНУ НА *FUSARIUM GRAMINEARUM* ТА *F. OXYSPORUM*

Мета. Дослідити вплив івермектину на фітопатогенні види грибів роду *Fusarium*, зокрема на *F. graminearum* та *F. oxysporum*. **Методи.** Чутливість до івермектину досліджуваних штамів *F. graminearum* F-55756 та *F. oxysporum* F-54635 визначали в умовах *in vitro* методом дифузії в агар. Для цього в живильне середовище у підготовлені лунки додавали івермектин у концентраціях від 0 до 3 мг/мл; в центральній частині чашки Петрі висаджували диски міцелію штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* і культивували його у темряві за температури 25°C. Вплив івермектину на ріст і морфологію міцелію досліджуваних штамів оцінювали через 7 діб, використовуючи програму ImageJ та методи статистичного аналізу для встановлення найбільш ефективних концентрацій івермектину. Досліди проводили у чотирикратній повторюваності. **Результати.** У результаті проведених досліджень виявлено, що за концентрації 1 мг/мл і вище спостерігався фунгістатичний ефект івермектину. Найбільш ефективною виявилася концентрація 3 мг/мл івермектину. Так, відсоток площі міцелію за його вирощування в присутності цієї концентрації порівняно з контролем становив 83,91 % для *F. graminearum* F-55756 та 69,95 % для *F. oxysporum* F-54635. **Висновки.** Встановлено ефективну фунгістатичну дію івермектину на досліджувані штами *F. oxysporum* та *F. graminearum*, що дає підстави для проведення подальшого аналізу його впливу на інші штами представників роду *Fusarium* та пошуку молекулярних мішеней дії івермектину.

Ключові слова: івермектин, фітопатогени, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, фунгістатична дія.

Відповідно до даних, наведених у статті Monalisa Ray et al. [1], близько 70–80 % хвороб рослин спричинені фітопатогенними грибами. Серед них види роду *Fusarium*, що належать до

аскоміцетів [2], посідають п'яте місце у десятці найнебезпечніших рослинних грибних патогенів, щорічно викликають значні втрати врожаю та інфікують злакові, бобові, томати, дині і загалом понад 150 важливих сільськогосподарських культур по всьому світу. *F. graminearum* та *F. oxysporum* є одними з найпоширеніших представників роду *Fusarium*. У той час, як *F. graminearum* паразитує переважно на злакових культурах, *F. oxysporum* вражає овочі, викликаючи хлороз, некроз, передчасне опадання листків та закупорку провідних тканин рослини, що призводить до їх в'янення та гниття [3]. Продукція з інфікованих рослин стає небезпечною та непридатною до вживання через накопичення в ній мікотоксинів (трихотецени, фумонізину та зеараленони). Деякі з них є канцерогенами та інгібіторами білкового синтезу, інші викликають розлади травлення та порушення репродуктивної системи [4; 5]. Види роду *Fusarium* є стійкими до фунгіцидів азольного ряду (флуконазол, кетоконазол, ітраконазол тощо), а ефективність діючих препаратів втрачається через швидку адаптацію патогена до їх дії [6].

Івермектин є антипаразитичним агентом, що має природне походження та широко застосовується у ветеринарії та медицині для лікування гельмінтозів, а також інфекцій, збудниками яких є комахи. Його здатність діяти як на екто-, так і на ендопаразитів призвела до введення терміна «ендектоцид» у 1981 році, коли івермектин був уперше представлений на ринку ветеринарних засобів [7]. На сьогодні відомо, що ефективність препарату не обмежується лише нематоцидним та інсектицидним впливом. Загалом за більш ніж 40 років вивчення положення івермектину у біофармацевтичній класифікації неодноразово переглядалося: окрім антипаразитичних властивостей, відомо про його антивірусну, протизапальну, протипухлинну та антибактеріальну активності [8]; детально ви-

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

вчено фармакокінетику та фармакодинаміку препарату у різних модельних системах; розроблено безліч формуляцій орального, місцевого, підшкірного, трансдермального, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, внутрішньорубцевого та параентерального застосування [9]; ретельно досліджена його токсичність для нецільових організмів та вплив на навколишнє середовище [10]. Попри все вищезазначене, дія івермектину на грибні організми майже не вивчалася, вважається, що у нього відсутня антигрибна активність [11].

Нещодавно було встановлено цитостатичний ефект івермектину, зокрема доведено його здатність зупиняти клітинний цикл [12]. Серед іншого встановлено, що івермектин за відносно низьких концентрацій ($\approx 30 \mu\text{M}$ для α - та $\approx 33 \mu\text{M}$ для β -субодиниці) може зв'язуватися з тубуліном клітин нематод та ссавців, викликаючи гіперполімеризацію мікротрубочок, зупинку клітинного циклу та, як наслідок, загибель клітини. Це відкриття закріпило позиції івермектину як протипухлинної речовини, доповнивши перелік уже відомих механізмів його впливу на новоутворення, водночас воно дає підстави для перевірки можливої взаємодії між івермектином та тубуліном інших еукаріотичних клітин, у тому числі грибних. Враховуючи нагальну потребу в нових ефективних фунгіцидах, актуальним є дослідити чутливість до івермектину найбільш поширених грибних фітопатогенів.

Матеріали і методи

Речовини. У роботі використано івермектин (22,23-дигідроівермектин В1) виробництва Sigma-Aldrich (США). Для приготування стокових розчинів його розчиняли у ДМСО та зберігали за температури 4°C . Досліджували вплив 0, 1, 2 та 3 мкг/мл івермектину.

Штами. У дослідженнях було використано два штами *F. graminearum* F-55756 та *F. oxysporum* F-54635 з української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Штами вирощували на картопляно-декстрозному агарі [13], до складу якого входило: 285 г/л картоплі, 20 г/л декстрози та 15 г/л агару, рН 5.5.

Метод дифузії в агар. Для визначення чутливості досліджуваних штамів до івермектину використовували метод дифузії в агар [14]. Для цього стерильне середовище розливали у чашки Петрі ($d = 90 \text{ мм}$), а після охолодження вирізали у ньому лунки за допомогою стерильного мета-

левого циліндра діаметром 5 мм, розташовуючи кожен з чотирьох лунок на однаковій відстані одна від одної, від центру та краю чашки; відстань від лунки до центру чашки Петрі становила 17 мм.

Міцелій досліджуваних штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* вирощували протягом двох тижнів, потім фрагментували за допомогою циліндра, отримані диски (по одному) розміщували на поверхні середовища у центрі чашки Петрі. У лунки додавали 100 мкл певної концентрації івермектину, як негативний контроль використовували 100 % ДМСО. Зразки вирощували у темряві за температури 25°C протягом 7 діб. Потім їх фотографували, на отриманих фотографіях вимірювали площу міцелію у ростовій ділянці чашок Петрі за допомогою програми обробки зображень ImageJ.

Статистичний аналіз. Досліди проводили у чотирикратній повторюваності, достовірність результатів підтверджували за t-критерієм Стьюдента для 0,05 % рівня значущості. Дані обробляли з використанням програмного пакету Microsoft Office Excel 2019.

Результати та обговорення

У результаті проведених досліджень було встановлено, що за концентрації івермектину 1 мг/мл та вище у колоній обох штамів спостерігалось сповільнення розвитку, зміна фізіологічних та морфологічних параметрів, прослідковувалася пряма кореляція між підвищенням концентрації агента та зменшенням площі міцелію. У штаму *F. graminearum* F-55756, якому зазвичай притаманна висока та пухка аероплектенхіма, остання була майже відсутня, міцелій також мав змінений колір (з жовтуватого на повністю білий), що не виходить за межі норми для цього штаму, але є важливим фізіологічним показником. Загалом фунгістатичний ефект івермектину щодо штаму F-55756 проявився значно слабше, ніж до штаму *F. oxysporum* F-54635: за найвищої концентрації 3 мг/мл площа міцелію стосовно контролю становила 83,91 % (табл., рис.). Чутливість штаму *F. oxysporum* F-54635 виявилася значно вищою, але зовнішній вигляд колоній суттєво не відрізнявся від контрольних зразків. Колір міцелію за максимальної концентрації був ліловим, ближче до ділянок активного поділу на межі колоній – білим, аероплектенхіма майже повністю відсутня, міцелій стелився до субстрату. За концентрації

3 мг/мл ріст міцелію гальмувався, його площа щодо контролю становила 69,95 %.

Оскільки івермектин розчиняється в ДМСО, то як негативний контроль було використано 100 % ДМСО та паралельно досліджено його вплив на міцелій штамів *F. graminearum* F-55756 та *F. oxysporum* F-54635. Незважаючи на те, що ДМСО як розчинник застосовують у формуляціях багатьох антигрибних речовин для підвищення його проникливості, а також на його здатність інгібувати розвиток грибних патогенів (трихофітон, епідермофітон, мікроспорум та деяких видів роду *Candida*) [15], за час проведення експериментів не спостерігалось

суттєвого впливу ДМСО на ріст міцелію досліджуваних штамів. Так, колонії штаму *F. graminearum* F-55756 за впливу ДМСО набули блідо-жовтого кольору, розвиток їх повітряного міцелію гальмувався. У більш чутливого штаму *F. oxysporum* F-54635 спостерігали зворотний ефект: зростала кількість повітряного міцелію, змінювалася морфологія, колір із лілового став білим. Загалом усі перераховані зміни є несуттєвими і в межах норми для цих штамів, отже, можна зазначити, що певних морфологічних чи фізіологічних порушень за дії ДМСО нами не було встановлено.

Таблиця. Вплив різних концентрацій івермектину на ріст міцелію (% щодо контролю) штамів *F. graminearum* F-55756 та *F. oxysporum* F-54635

Об'єкт	Концентрація івермектину, мг/мл	Площа міцелію, %
<i>F. graminearum</i> F-55756	0*	92,18 ± 1,91
	1	89,67 ± 2,69
	2	84,5 ± 6,08
	3	83,91 ± 5,54
<i>F. oxysporum</i> F-54635	0*	90,89 ± 2,65
	1	76,07 ± 2,58
	2	72,53 ± 0,99
	3	69,95 ± 4,69

Примітка. 0 – негативний контроль (100 % ДМСО).

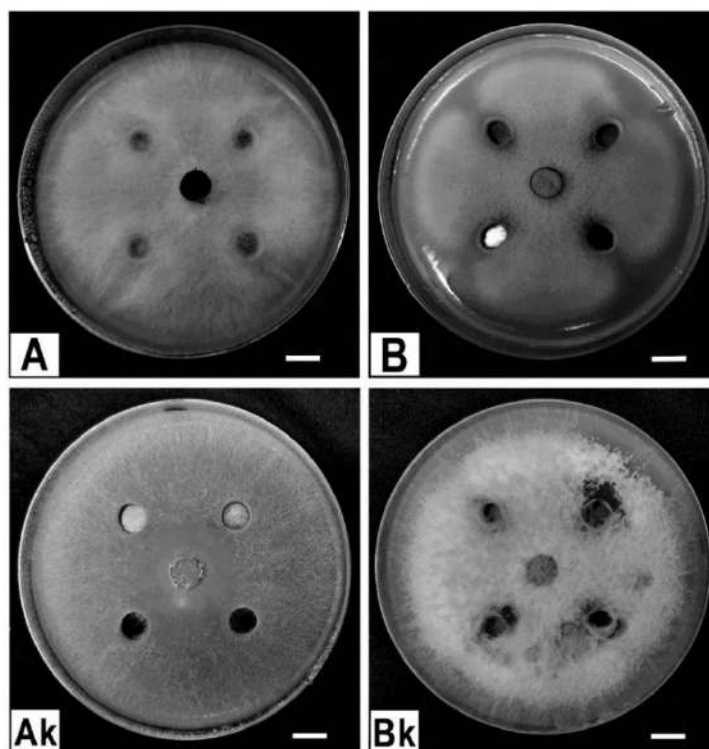


Рис. Вплив 3 мг/мл івермектину на штами *F. graminearum* F-55756 (A) та *F. oxysporum* F-54635 (B), порівняно з контролем (Ak, Bk), через 7 днів вирощування *in vitro* за використання методу дифузії в агар. Масштабна відмітка – 1 см.

Висновки

Досліджено вплив різних концентрацій івермектину на фітопатогенні штами *F. graminearum* F-55756 та *F. oxysporum* F-54635 і встановлено наявність фунгістатичного ефекту цієї речовини за її використання в концентрації 3 мг/мл. Зокрема, з'ясовано, що 3 мг/мл івермектину пригнічує ріст міцелію обох штамів, при цьому найбільш чутливим виявився штам *F. oxysporum* F-54635. Водночас протестовані штами виявилися практично нечутливими до дії ДМСО, що використовувався як розчинник

івермектину і, відповідно, як негативний контроль. Отримані результати свідчать про необхідність подальшого вивчення чутливості інших штамів видів роду *Fusarium* до івермектину та пошуку молекулярних мішеней дії івермектину в клітинах *Fusarium*.

Роботу виконано за фінансової підтримки проекту «Отримання рослин зі стійкістю до фузаріозу за допомогою поліфункціональних біостимуляторів на основі авермектину» (№ 0120U103109) цільової програми наукових досліджень НАН України «Геномі, молекулярні та клітинні основи розвитку інноваційних біотехнологій» (2020–2024 рр.).»

References

1. Ray M., Ray A., Dash S., Mishra A. Achary K.G., Nayak S., Singh S. Fungal disease detection in plants: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017. Vol. 87. P. 708–723. doi: 10.1016/j.bios.2016.09.032.
2. Nayaka S.C., Wulff E.G., Udayashankar A.C., Nandini B.P., Niranjana S.R., Mortensen C.N., Prakash H.S. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011. Vol. 90, No. 5. P. 1625–1639. doi: 10.1007/s00253-011-3209-3.
3. Rahman M.Z., Ahmad K., Kutawa A.B., Siddiqui Y., Saad N., Hun T.G., Hata E.M., Hossain M.D. Biology, diversity, detection and management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* causing vascular wilt disease of watermelon (*Citrullus lanatus*): a review. *Agronomy*. 2021. Vol. 11, No. 7. P. 1310–1334. doi: 10.3390/agronomy11071310.
4. Gaikpa D.S., Miedaner T. Genomics-assisted breeding for ear rot resistances and reduced mycotoxin contamination in maize: methods, advances and prospects. *Theor. Appl. Genet.* 2019. Vol. 132, No. 10. P. 2721–2739. doi: 10.1007/s00122-019-03412-2.
5. Doehlemann G., Okmen B., Zhu W., Sharon A. Plant Pathogenic Fungi. *Microbiol. Spectr.*. 2017. Vol. 5, No. 1. P. 1–23. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016.
6. Dallé da Rosa P., Nunes A., Borges R., Batista B., Fuentesfria A.M., Goldani L.Z. In vitro susceptibility and multilocus sequence typing of *Fusarium* isolates causing keratitis. *J. Mycol. Méd.* 2018. Vol. 28, No. 3. P. 482–485. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.05.001.
7. Laing R., Gillan V., Devaney E. Ivermectin – old drug, new tricks? *Trends Parasitol.* 2017. Vol. 33, No. 6. P. 463–472. doi: 10.1016/j.pt.2017.02.004.
8. Martin R.J., Robertson A.P., Choudhary S. Ivermectin: an anthelmintic, an insecticide, and much more. *Trends Parasitol.* 2021. Vol. 37. P. 48–64. doi: 10.1016/j.pt.2020.10.005.
9. Sharun K., Shyamkumar T. S., Aneesha V. A., Dhama K., Pawde A. M., Pal A. Current therapeutic applications and pharmacokinetic modulations of ivermectin. *Veterinary World*. 2019. Vol. 12. P. 1204–1211. doi: 10.14202/vetworld.
10. Lumaret J.-P., Errouissi F., Floate K., Römbke J., Wardhaugh K.. A Review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Cur. Pharm. Biotechnol.* 2012. Vol. 13. P. 1004–1060. doi: 10.2174/138920112800399257.
11. El-Saber Batiha Batiha G., Alqahtani A., Ilesanmi O.B., Saati A.A., El-Mleeh A., Hetta H.F., y Beshbishy A.M. Avermectin derivatives, pharmacokinetics, therapeutic and toxic dosages, mechanism of action, and their biological effects. *Pharmaceuticals*. 2020. Vol. 13, No. 8. P. 196–233. doi: 10.3390/ph13080196.
12. Ashraf S., Beech R.N., Hancock M.A., Prichard R.K. Ivermectin binds to *Haemonchus contortus* tubulins and promotes stability of microtubules. *Int. J. Parasitol.* 2015. Vol. 45, No. 9–10. P. 647–654. doi: 10.1016/j.ijpara.2015.03.010.
13. Westphal K.R., Heidelberg S., Zeuner E.J., Riisgaard-Jensen M., Nielsen M.E., Vestergaard S.Z., Bekker N.S., Skovmark J., Olesen C.K., Thomsen K.H., Niebling S.K., Sorensen J.L., Sondergaard T.E. The effects of different potato dextrose agar media on secondary metabolite production in *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* 2021. Vol. 347. P. 1–5. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109171.
14. Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *J. Pharm. Analysis*. 2016. Vol. 6, No. 2. P. 71–79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
15. Jacob W. Stanley, De La Torre Jack C. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) in Trauma and Disease. Boca Raton (USA): CRC Press, 2015. 270 p.

KUSTOVSKIY Y. O.^{1,2}, BUZIASHVILI A. Y.¹, YEMETS A. I.^{1,2}

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osyrovskogo str., 2A

² National University of Kyiv-Mohyla Academy, Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2

RESEARCH OF IVERMECTIN INFLUENCE ON *FUSARIUM GRAMINEARUM* AND *F. OXYSPORUM*

Aim. Determination of the ivermectin influence on plant pathogenic species of *Fusarium* genus; particularly, *F. graminearum* and *F. oxysporum*. **Methods.** The susceptibility of studied strains (*F. graminearum* F-55756 and *F. oxysporum* F-54635) to ivermectin was measured *in vitro* with the agar diffusion method. Ivermectin in concentrations from 0 to 3 mg/ml was poured into the wells made in media for that purpose. Further, mycelial discs of *F. graminearum* and *F. oxysporum* strains were placed into the central regions of Petri dishes, which were then maintained in the dark at 25 °C. Ivermectin influence on growth and morphology of studied strains was estimated after the 7 days using the ImageJ software and methods of statistical analysis to determine the most effective concentrations.

Results. As the result, it was found that at 1 mg/ml concentration and above the fungistatic effect is observed and the 3 mg/ml concentration appeared to be the most effective one. Thus, the percentage of mycelium area in comparison with control at this concentration was 83,91 % for *F. graminearum* F-55756 and 69,95 % for *F. oxysporum* F-54635.

Conclusions. The ivermectin effective fungistatic action on the studied strains was observed giving the reason for further analysis of the ivermectin influence on other strains of *Fusarium* complex species and search of molecular targets of its action.

Keywords: ivermectin, phytopathogens, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, fungistatic activity.