

КУСТОВСЬКИЙ Є. О.^{1, 2✉}, ЄМЕЦЬ А. І.^{1, 2}¹ Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України, Україна, 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2а, ORCID: 0000-0002-1536-3897, 0000-0001-6887-0705² Національний університет «Києво-Могилянська Академія», Україна, 04070, м. Київ, вул. Сковороди, 2✉ ykustovskiy@gmail.com

ВПЛИВ ІВЕРМЕКТИНУ НА МОРФО-ФІЗІОЛОГІЧНІ ПАРАМЕТРИ КОРЕНІВ *ARABIDOPSIS THALIANA* L.

Мета. Вивчити вплив івермектину на морфологію коренів та кореневих волосків проростків *Arabidopsis thaliana* L. **Методи.** Культивування *in vitro*, мікроскопічні методи дослідження, статистичний аналіз даних. **Результати.** Було досліджено зміни у морфології коренів при вирощуванні на живильному середовищі (Мурасіге-Скуга) з 250 мкг/мл івермектину протягом 12 діб. Встановлено, що івермектин у концентрації 250 мкг/мл спричиняє викривлення головних коренів, вкорочення зони елонгації, сповільнення росту бічних коренів, зменшення довжини та деформацію кореневих волосків. Спостерігалися статистично значущі відмінності у довжині кореневих волосків на 12 добу вирощування. Зокрема, довжина кореневих волосків у середньому становила $163,63 \pm 57,97$ мкм у проростків, що росли на живильному середовищі без додавання івермектину, та $28,14 \pm 9,36$ мкм у проростків, що росли на середовищі з додаванням 250 мкг/мл івермектину. **Висновки.** Проаналізовано спричинені івермектином у концентрації 250 мкг/мл морфологічні зміни коренів та кореневих волосків. Запропоноване нами пояснення отриманих результатів полягає в порушенні івермектином організації мікротрубочок клітин головного кореня проростків *A. thaliana*, наслідком чого є патологічні зміни у морфології коренів.

Ключові слова: івермектин, *Arabidopsis thaliana* L., корінь, морфологічні ознаки.

Івермектин (IVM) є антипаразитичним агентом з вираженою нематоцидною та інсектицидною активністю [1]. Через низьку біотрансформацію IVM у організмах тварин близько 68–98% від застосованих доз IVM виходять незмінними з фекаліями [2]. Як наслідок, відбувається накопичення IVM у навколишньому середовищі, що становить загрозу для нецільових організмів. У зв'язку з цим необхідним є вивчення впливу IVM

на нецільові організми та, зокрема, на вищі рослини. Нещодавно були проведені такі дослідження [2–7], переважно присвячені вивченню впливу IVM на метаболізм та транскриптом поширених модельних об'єктів (*Arabidopsis thaliana* L., *Sinapis alba* L.) та на рослини, які ростуть на територіях у безпосередньому контакті з IVM (*Plantago lanceolata* L., *Trifolium pratense* L. тощо). Зокрема, Vokřál et al. встановили, що обробка 0,044 мкг/мл IVM проростків *S. alba* призводить до 24 % інгібування росту коренів цих рослин у порівнянні з контролем [3]. В іншому дослідженні було продемонстровано, що IVM у концентрації 10 мг/л збільшував відсоток проростання насіння *Centaurea jacea* L. та *P. lanceolata*, однак зменшував синхронність проростання насіння *T. pratense*. Обробка насіння IVM за цієї ж концентрації призводила до зменшення відсотка проростання насіння *Cerastium holosteoides* Fr., *Lychnis flos-cuculi* L., *Plantago media* L. та *Phleum phleoides* (L.) H. Karst, зміни у тривалості проростання *C. jacea* та *T. pratense*, а також зменшення синхронності проростання насіння *Agrostis capillaris* L.

Нами також нещодавно було вивчено вплив різних концентрацій IVM на ріст та розвиток проростків *A. thaliana* при вирощуванні в умовах *in vitro* [8]. Спостерігалось інгібування росту та розвитку проростків на 12 добу вирощування на середовищі з 250 мкг/мл IVM. При цьому корені були чутливішими до IVM, ніж пагони. Зокрема, внаслідок впливу 250 мкг/мл IVM зменшилася довжина коренів та сповільнився ріст бічних коренів у порівнянні з контролем. Для пояснення змін у морфології та фізіології проростків при вирощуванні на середовищі з IVM нами було вивчено вплив IVM на МТ клітин головного кореня *A. thaliana*. Було встановлено, що IVM у концентрації 250 мкг/мл після 1 та 2 годин обробки проростків спричиняє порушення організації кортикальних МТ. Зокрема, обробка

250 мкг/мл IVM протягом 1 години призвела до змін в орієнтаціях МТ, вкорочення МТ, їхнє об'єднання в пучки, а також нетипові за звичайних умов циклічні формування. Збільшення тривалості обробки проростків 250 мкг/мл IVM з 1 до 2 годин призвело до посилення цих порушень. Клітини різних зон кореня мали різну чутливість до IVM. Після 2 годин обробки у клітинах зони кореневого апексу, зони елонгації та перехідної зони головного кореня *A. thaliana* відбулося руйнування кортикальної сітки МТ, якого не спостерігалося у клітин меристематичної зони та зони диференціації.

Оскільки у попередній роботі нами не було здійснено детального аналізу спричинених IVM змін у морфології коренів проростків *A. thaliana*, метою цього дослідження було проаналізувати та описати морфологічні зміни коренів та кореневих волосків після 12 діб вирощування проростків на середовищі з 250 мкг/мл IVM.

Матеріали і методи

Проростки дикого типу *A. thaliana* Col-1 вирощували *in vitro* на комерційному середовищі Мурасіге-Скуга (МС) (Sigma-Aldrich, США) з макро- та мікросолями та вітамінами у концентрації 4,4 г/л, до якого додавали 10 г/л сахарози та 4 г/л агару; рН 5,7. Перед висаджуванням на середовище насіння стерилізували у 0,5 % розчині NaOCl за протоколом, описаним нами раніше [8]. Чашки Петрі розміщували вертикально у культуральній кімнаті, проростки вирощували за температури 23°C та 16/8-годинному фотоперіоді. Для розчинення IVM використовували органічний розчинник диметилсульфоксид (ДМСО). Маточний розчин IVM у концентрації 10 мг/мл зберігали у темряві за температури 4°C. Вплив IVM та ДМСО (негативний контроль) на морфологічні параметри проростків вивчали, як описано нами у статті [8]. Середовище МС змішували з IVM у концентрації 250 мкг/мл та ДМСО у концентрації 2,5 %. Корені живих проростків досліджували на 12 добу вирощування за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа Carl Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena, Germany), використовуючи об'єктив EC Plan-Neofluar 10x/0.30 та діодний лазер (405–430 нм) для сканування поверхні кореня. Отримані зображення аналізували та порівнювали у FIJI [9]. Усі досліді закладали у трикратній повторності. Висновок про вплив IVM на морфологічні параметри коренів та кореневих волосків робили на підставі

аналізу мінімум 10 коренів кожної групи (МС/IVM/ДМСО).

Статистичний аналіз та обробку даних здійснювали у Excel. Для порівняння довжини кореневих волосків груп проростків використовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) для 0,05 рівня значущості.

Результати та обговорення

У результаті аналізу морфології коренів проростків на 12 добу вирощування було встановлено, що 250 мкг/мл IVM та 2,5 % ДМСО спричиняли зміни у морфологічних параметрах проростків. Зокрема, на 12 добу корені, що зростали на середовищі з IVM мали викривлену форму, вкорочену зону елонгації, а також вкорочені та деформовані кореневі волоски. Також корені мали вигин у перехідній зоні між меристематичною зоною та зоною елонгації (рис. 1 д, е, и, к). Проростки у контролі (за відсутності IVM та ДМСО) на 12 добу вирощування мали розвинуті бічні корені, а у проростків, що росли на середовищі з IVM та ДМСО бічні корені лише починали утворюватися (рис. 1 б, в). При порівнянні морфології проростків, які зростали на середовищі з IVM та на середовищі з ДМСО, було встановлено, що IVM спричинив більші порушення у морфологічних параметрах проростків, ніж ДМСО (рис. 1 б, в, д, е, и, к).

Як зазначають Hsiao and Huang [10], МТ відіграють важливу роль у морфологічному розвитку рослин та, зокрема, коренів. Наприклад, МТ забезпечують рух целюлозо-синтазних комплексів до плазматичної мембрани клітин та визначають орієнтацію відкладення целюлозних фібрил на поверхні клітини, а, отже, й подальшу направленість росту клітини. Враховуючи, що МТ забезпечують ріст, поділ і диференціацію клітин кореня, а, отже, залучені в утворенні бічних коренів та кореневих волосків, виявлені нами зміни у морфології коренів проростків *A. thaliana* можна пояснити дією IVM на МТ [8].

Оскільки кореневі волоски відіграють важливу роль у абсорбції води та мінералів, було порівняно довжину та форму кореневих волосків коренів проростків, що росли на звичайному середовищі МС, та проростків, що росли на середовищі МС з IVM та ДМСО. Нами було встановлено, що кореневі волоски у контролі мали довжину в середньому $163,63 \pm 57,97$ мкм (рис. 2 а, г, б). У проростків, що зростали на середовищі з IVM (рис. 2 б, е) та на середовищі з ДМСО (рис.

2 б, д) спостерігали зменшення довжини кореневих волосків.

Зокрема, середня довжина кореневих волосків проростків, що росли на середовищі з ДМСО становила $34,76 \pm 5,59$ мкм, а у проростків, що росли на середовищі з 250 мкг/мл ІУМ, – $28,14 \pm 9,36$ мкм. Окрім того, як ІУМ, так і органічний розчинник ДМСО викликали морфологічні порушення у кореневих волосків. Тоді як кореневі волоски у контролі мали правильну видов-

жену форму (рис. 2 г), кореневі волоски, що зросли під впливом IVM та ДМСО, були викривленими та гетероморфними (рис. 2 д, е). Зазначені зміни могли негативно вплинути на здатність корневих волосків поглинати воду та поживні речовини з живильного середовища через зменшення ефективної площі їхньої поверхні. Фізіологічним наслідком цих змін є сповільнення росту проростків, які росли в присутності IVM [8].

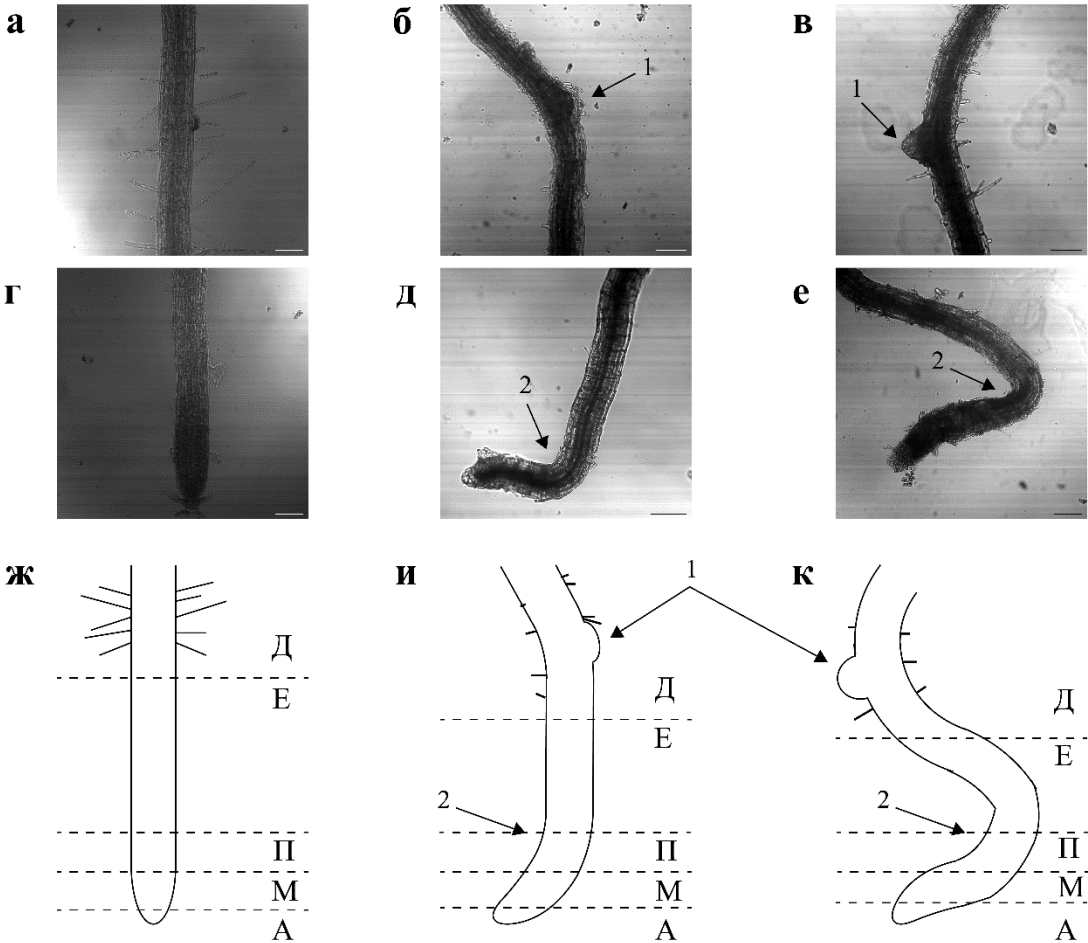


Рис. 1. Спричинені ІВМ та ДМСО зміни у морфології головного кореню *A. thaliana*. Зображення різних зон кореня *A. thaliana*: зона диференціації (Д) – (а) контроль, (б) ДМСО, (в) ІВМ; зона елонгації (Е), перехідна зона (П), зона меристеми (М) та зона кореневого апексу (А) – (г) контроль, (д) ДМСО, (е) ІВМ. Схематичні зображення головного кореня у контролі (ж), під впливом ІВМ (и) та ДМСО (к). 1 – позначено зачаткові бічні корені, а 2 – викривлення коренів, спричинені впливом ІВМ та ДМСО. Шкала на зображеннях (а, б, в, г, д, е) – 100 мкм.

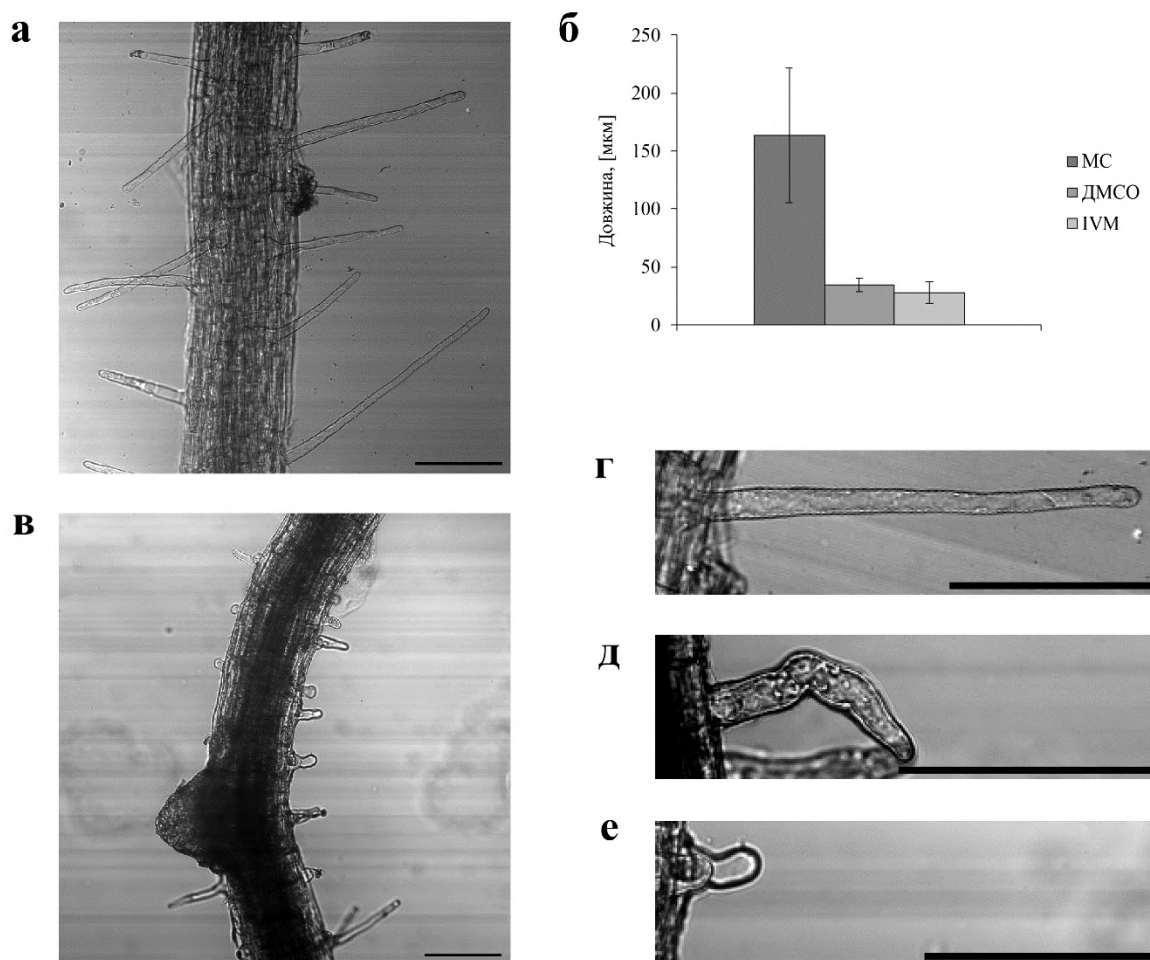


Рис. 2. Спричинені IVM та ДМСО зміни у морфологічних параметрах кореневих волосків *A. thaliana*: (а, г) контроль, (в, е) IVM, (д) ДМСО. На діаграмі (б) представлено порівняння середньої довжини кореневих волосків у контролі та під впливом IVM та ДМСО. Шкала на зображеннях (а, в, г, д, е) – 100 мкм.

Висновки

Було здійснено аналіз морфологічних змін коренів проростків *A. thaliana*, що росли на середовищі з IVM у концентрації 250 мкг/мл. На 12 добу вирощування на середовищі з IVM спостерігалися викривлення коренів, вкорочення зони елонгації, сповільнення росту бічних коренів,

зменшення довжини та ефективної площі поверхні кореневих волосків. Враховуючи результати попередніх досліджень, зазначені зміни є наслідком спричинених IVM порушень у організації МТ.

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України (бюджетна програма КПКВК 6541030, 2024–2028 рр., державний реєстраційний номер: 0124U002424).

References

1. Martin R. J., Robertson A. P., Choudhary S. Ivermectin: an anthelmintic, an insecticide, and much more. *Trends. Parasitol.* 2021. Vol. 37 (1). P. 48–64. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.10.005>.
2. 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.102>.
3. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.097>.
4. 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). P. 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules25163655>.

5. 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. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09442-4>.
6. Langhansová L., Navrátilová M., Skálová L., Mot'ková K., Podlipná R. The effect of the manure from sheep treated with anthelmintics on clover (*Trifolium pratense*). *Agronomy*. 2021. Vol. 11 (9). P. 1–14. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091892>.
7. Laber L., Eichberg C., Zimmerbeutel A., Düring R. A., Donath T. W. Effects of macrocyclic lactone anthelmintics on seed germination of temperate grassland species. *Plant Biol. (Stuttg.)*. 2023. Vol. 25 (7). P. 1046–1057. <https://doi.org/10.1111/plb.13577>.
8. Kustovskiy Y. O., Karpov P. A., Blume Y. B., Yemets A.I. Ivermectin affects *Arabidopsis thaliana* microtubules through predicted binding site of β -tubulin. *Plant Physiol. Biochem.* 2024. Vol. 206. 108296. P. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108296>.
9. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J. Y., White D. J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*. 2012. Vol. 9 (7). P. 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
10. Hsiao A. S., Huang J. Y. Microtubule regulation in plants: from morphological development to stress adaptation. *Biomolecules*. 2023. Vol. 13 (4). P. 1–18. <https://doi.org/10.3390/biom13040627>.

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

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

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

IVERMECTIN'S INFLUENCE ON MORPHO-PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF *ARABIDOPSIS THALIANA* L. ROOTS

Aim. To study ivermectin's influence on morphology of roots and root hairs of *Arabidopsis thaliana* L. seedlings.

Methods. *In vitro* seedlings' cultivation, microscopy, statistical data analysis. **Results.** Morphological changes of roots were determined after 12 days of seedlings growth on the nutrient medium (Murashige and Skoog) with ivermectin in concentration of 250 $\mu\text{g/ml}$. It was determined that ivermectin at the concentration of 250 $\mu\text{g/ml}$ causes main roots curling, elongation zone shortening, lateral roots growth retardation, decrease in length and deformation of root hairs. Statistically significant differences in length of root hairs were observed on the 12th day of cultivation. Particularly, the mean length of root hairs was $163.63 \pm 57.97 \mu\text{m}$ in seedlings, which grew on medium without ivermectin, and $28.14 \pm 9.36 \mu\text{m}$ in seedlings, which grew on medium with 250 $\mu\text{g/ml}$ of ivermectin. **Conclusions.** Morphological alterations of roots and root hairs caused by 250 $\mu\text{g/ml}$ of ivermectin were analyzed. According to the proposed explanation of the obtained results, ivermectin disrupts arrangements of microtubules in cells of *A. thaliana* main root leading to pathological changes in roots' morphology.

Keywords: ivermectin, *Arabidopsis thaliana* L., root, morphological properties.