

сколькими поколениями энтомологов. Тем не менее обобщающие сводки [каталоги] опубликованы только по трем отрядам. В отряде полужесткокрылых (Heteroptera) насчитывается 450 видов, жесткокрылых (Coleoptera) – 3240 и чешуекрылых, или бабочек (Lepidoptera) – 1620 [8–10]. Прочие отряды, кроме прямокрылых, недавно изученных Т. Смирновой, насчитывают уже 53 вида и нуждаются в дальнейшем исследовании. Два громадных отряда – двукрылых (Diptera) и перепончатокрылых (Hymenoptera) – содержат по меньшей мере по 1000 видов. Сведения о других отрядах сведены в табл. 2.

Таблица 2

Количество зарегистрированных видов насекомых в фауне Беларуси

| Название отряда | Число видов |
|----------------------------|-------------|
| Бессыжковые – Protura | 3 |
| Ногохвостки – Collembola | 15 |
| Двухвостки – Diplura | 2 |
| Щетинохвостки – Thysanura | 3 |
| Стрекозы – Odonatoptera | 53 |
| Таракановые – Blattoptera | 6 |
| Вши – Anoplura | 12 |
| Равнокрылые – Homoptera | 600 |
| Сетчатокрылые – Neuroptera | 15 |
| Блохи – Aphaniptera | 50 |
| Сенокосы – Psocoptera | 22 |
| Пухоеды – Mallophaga | 97 |
| Трипсы – Thysanoptera | 40 |
| Верблюдки – Raphidioptera | 4 |
| Скорпионницы – Mecoptera | 4 |
| Большекрылки – Megaloptera | 2 |
| Ручейники – Trichoptera | 100 |

Эти цифры лишь приблизительно отражают разнообразие насекомых Беларуси и одновременно указывают на те отряды этого класса, в которых дальнейшие исследования позволят увеличить число видов во много раз.

Наконец, в двух классах типа моллюсков (Gastropoda и Bivalvia), изучение которых идет довольно интенсивно, уже известно около 100 видов.

В заключение следует сказать, что наряду с углубленным изучением практически важных видов беспозвоночных животных, которое успешно проводят работники службы защиты растений и паразитологи Беларуси, по-прежнему остается актуальной задача исследования таксономического разнообразия, без которого невозможно составление кадастра животного мира, а также прогнозирование устойчивости экосистем региона.

1. Конвенция о биологическом разнообразии. Программа ООН по окружающей среде ЮНЕП. Рио-де-Жанейро, 1992. С. 32.

2. Структурно-функциональное состояние биологического разнообразия животного мира Беларуси: тез. докл. VIII зоол. науч. конф. Мн., 1999. С. 435.

3. Решетников Ю.С., Богуцкая Н.Г., Васильева Е.Д. и др. // *Вопр. ихтиологии*. 1997. Т. 37. № 6. С. 723.

4. Паузуны / Пад рэд. М.М. Пікуліка. Мн., 1996. С. 240.

5. Никифоров М.Е., Козулин А.В., Гричик В.В., Тишечкин А.К. Птицы Беларуси на рубеже XXI в. Мн., 1997. С. 188.

6. Сержанин И.Н. Млекопитающие Беларуси. Мн., 1961. С. 318.

7. Национальная стратегия и план действий по сохранению и устойчивому использованию биологического разнообразия Республики Беларусь. Мн., 1997. С. 44.

8. Lukashuk A. O. Annotated list of the Heteroptera of Belarus and Baltia. S.-Petersburg, 1997. P. 45.

9. Александрович О.Р., Лопатин И.К., Писаненко А.Д. и др. Каталог жесткокрылых (Coleoptera, Insecta) Беларуси. Фонд фундаментальных исследований Республики Беларусь. Мн., 1996. С. 103.

10. Мержеевская О.И., Литвинова А.Н., Молчанова Р.В. Чешуекрылые (Lepidoptera) Белоруссии. Каталог. Мн., 1976. С. 129.

Поступила в редакцию 09.11.2000

Бурко Леонид Дмитриевич – кандидат биологических наук, доцент.

Лопатин Игорь Константинович – доктор биологических наук, профессор.

УДК 581.17

Т.И. ДИТЧЕНКО, А.П. КУДРЯШОВ, В.М. ЮРИН

ХАРАКТЕР БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ НА ДЕЙСТВИЕ ТРИАЗОЛОВЫХ ФУНГИЦИДОВ

The effect of fungicides derivatives 1,2,4-triazole (propiconazole, tebuconazole and cyproconazole) on the bioelectrical characteristics of *Nitella flexilis* cell was investigated. It was established, that the fungicides differed just as on the values of concentration capable to cause shifts of electrical potential and

42



This document has been edited with Infix PDF Editor - free for non-commercial use.

To remove this notice, visit: www.iceni.com/unlock.htm

membrane resistance, so on the character electrophysiological reaction of cell. It is supposed, that observed membrane effects are result of direct action exogenous triazoles in concentration 10^{-5} – 10^{-4} M on plasmamembrane. Probably, the N1-assistant structure in a molecule triazole is determining factor in character registered reaction of plant cell.

Производные триазола, обладая фунгицидной активностью, а также свойствами регуляторов роста растений, широко применяются в современном растениеводстве [1, 2]. Фунгицидное действие замещенных триазолов проявляется на уровне липидного обмена и заключается в блокировании биосинтеза эргостерина – основного стерина клеточных мембран большинства фитопатогенных грибов [3, 4].

В целом фунгициды как средства защиты растений должны быть селективными и не проявлять фитотоксического эффекта. Вопрос о первичных реакциях растительного организма на действие фунгицидов является малоизученным. К числу таких реакций на первом этапе воздействия ксенобиотика следует отнести изменения состояния плазматических мембран клеток растения. В работе [5] приводятся данные о том, что некоторые триазоловые фунгициды (флузилазол и пенконазол) могут существенно изменять проницаемость мембран растительных клеток по отношению к электролитам и неэлектролитам. В этом случае сдвиги проницаемости плазматической мембраны могут происходить как в результате непосредственной модификации мембраны ксенобиотиками при взаимодействии с липидной или белковой компонентами, так и в результате нарушения процессов внутриклеточного метаболизма.

В связи с этим целью настоящей работы явилось выявление характера индуцируемых замещенными триазолами – пропиконазолом, тебуконазолом и ципроконазолом – сдвигов электрических характеристик плазмалеммы растительной клетки, являющихся результатом модификации ионной проницаемости мембраны в присутствии фунгицидов.

Материал и методика

В работе использовали кветки междоузлий водоросли *Nitella flexilis*, которые являются классическими объектами для изучения физиологии транспорта ионов через плазмалемму. Водоросли выращивали в лабораторных условиях на питательной среде состава: $2 \cdot 10^{-3}$ M $Mg(NO_3)_2$, $4 \cdot 10^{-4}$ M $CaCl_2$, 10^{-3} M KH_2PO_4 , 10^{-3} M $NaHCO_3$. Отделенные от таллома клетки за сутки до эксперимента переносились в раствор искусственной прудовой воды (ИПВ) состава: 10^{-3} M $NaCl$, 10^{-4} M KCl , 10^{-3} M $CaCl_2$, 10^{-3} M фосфатный буфер, представляющий собой смесь одно- и двухзамещенных фосфатов натрия в соотношении 9:1, что обеспечивало поддержание pH на уровне 6,9–7,2.

Измерения электрических характеристик плазматической мембраны кветок проводились с использованием микроэлектродной техники [6]. Сдвиги измеряемых параметров мембраны ($\Delta P_{и}$) определялись как алгебраическая разность между регистрируемыми величинами при действии химического агента (P_x) и в контрольном растворе (P_k):

$$\Delta P_{и} = P_x - P_k.$$

В процессе экспериментов температура и освещенность поддерживались на постоянных уровнях $20 \pm 1^\circ C$ и 1000 лк соответственно.

Экспериментальные растворы производных триазола (пропиконазола – 1-[2-(2,4-дихлорфенил)-4-пропил-1,3-диоксолан-2-ил-метил]-1H-1,2,4-триазола, тебуконазола – 1-(4-хлорфенил)-4,4-диметил-3-(1,2,4-триазолил-1-метил)-пентанола-3 и ципроконазола – 2-(4-хлорфенил)-3-циклопропил-1-(1H-1,2,4-триазолил)бутанола-2) готовились добавлением в ИПВ соответствующего количества 1 %-го спиртового раствора фунгицидов.

Результаты и их обсуждение

Добавление в среду производных триазола вызывало изменения разности электрических потенциалов (РЭП) и сопротивления плазмалеммы кле-

ток *N. flexilis* в состоянии покоя. Причем эти изменения начинались сразу же после контакта фунгицида с клеткой. Развитие типичной электрофизиологической реакции плазмалеммы клеток *N. flexilis* в ответ на добавление и удаление $3 \cdot 10^{-4}$ М ципроконазола приведено на рис. 1.

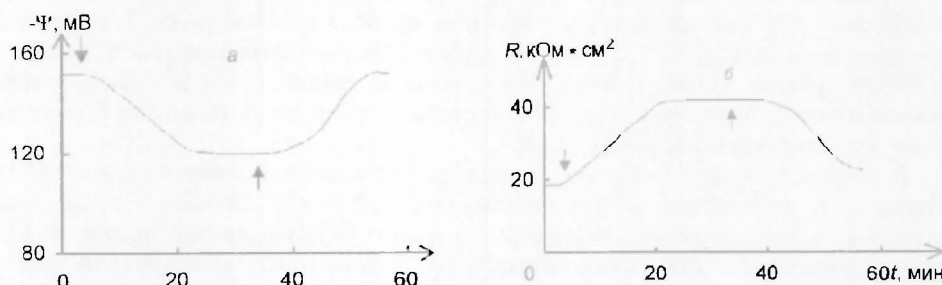


Рис. 1. Динамика изменений РЭП (а) и сопротивления (б) плазмалеммы клеток *N. flexilis* в ответ на действие $3 \cdot 10^{-4}$ М ципроконазола.

Стрелками указаны моменты внесения (↑) и удаления (↓) фунгицида

Испытанные препараты различались по величинам пороговых концентраций, т. е. минимальных действующих концентраций, вызывающих достоверные сдвиги биоэлектрических параметров плазмалеммы. Наиболее низкие значения пороговых концентраций отмечены для пропиконазола – $3 \cdot 10^{-6}$ М, регистрируемые отклонения электрических параметров мембраны от контрольных значений под действием тебуконазола отмечались, начиная с концентрации 10^{-5} М, а ципроконазола – $3,5 \cdot 10^{-5}$ М.

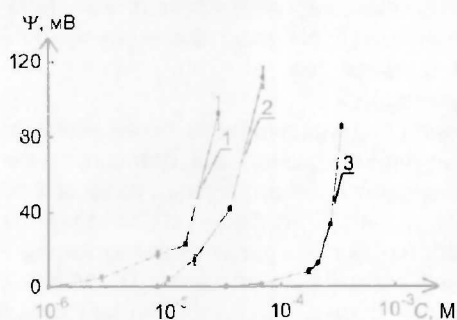


Рис. 2. Зависимость величины сдвига РЭП плазмалеммы клеток *N. flexilis* от концентрации фунгицидов в среде:

1 – пропиконазола, 2 – тебуконазола, 3 – ципроконазола

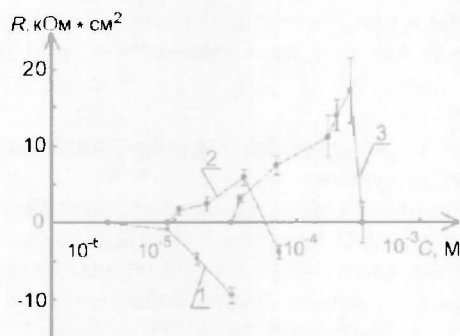


Рис. 3. Зависимость величины сдвига сопротивления плазмалеммы клеток *N. flexilis* от концентрации фунгицидов в среде:

1 – пропиконазола, 2 – тебуконазола, 3 – ципроконазола. Каждая точка на графиках является средним значением \pm стандартная ошибка из 3–4 экспериментов

Установлены различия и качественных характеристик биоэлектрической реакции клеток *N. flexilis* в ответ на действие фунгицидов. В присутствии пропиконазола происходила деполяризация плазмалеммы, которая возрастала пропорционально росту содержания фунгицида в интервале концентраций $3 \cdot 10^{-6}$ – $1,5 \cdot 10^{-5}$ М (рис. 2). Уменьшение электрического сопротивления плазмалеммы отмечалось лишь с концентрации пропиконазола в среде, равной $1,5 \cdot 10^{-5}$ М (рис. 3). Действие пропиконазола в интервале концентраций $3 \cdot 10^{-6}$ – $1,5 \cdot 10^{-5}$ М при экспозициях 30–45 мин было обратимым, т. е. при удалении фунгицида наблюдалось восстановление электрических характеристик плазмалеммы до контрольных значений. Повышение содержания пропиконазола в среде до $3 \cdot 10^{-5}$ М вызывало резкую деполяризацию плазмалеммы (в течение 5 мин на 85–110 мВ), которая сопровождалась столь же резким падением сопротивления мембраны. При непродолжительной экспозиции клеток (не более 10 мин) в растворах, содержащих $3 \cdot 10^{-5}$ М фунгицида, мембранотропные эффекты были

еще обратимыми. Однако при увеличении периода воздействия фунгицида свыше указанного времени изменения приобретали необратимый характер. Причем длительная (0,5–1 ч) экспозиция клеток в этом растворе приводила к потере ими тургора и последующей гибели.

Под действием 10^{-5} – $4 \cdot 10^{-5}$ М тебуконазола отмечались деполяризация мембраны (см. рис. 2) и рост электрического сопротивления (см. рис. 3). Добавление же в окружающую клетку среду $7 \cdot 10^{-5}$ М тебуконазола приводило к резкой деполяризации и падению мембранного сопротивления. Мембранотропные эффекты под действием тебуконазола становились необратимыми, начиная с концентрации $7 \cdot 10^{-5}$ М.

При добавлении в среду $3,5 \cdot 10^{-5}$ М ципроконазола отмечался лишь небольшой рост сопротивления, значение РЭП практически не изменялось. Повышение его содержания в среде до $7 \cdot 10^{-5}$ М приводило к деполяризации плазмалеммы и еще большему росту ее сопротивления. При дальнейшем увеличении концентрации фунгицида вплоть до $3 \cdot 10^{-4}$ М наблюдалось возрастание сдвигов электрических параметров мембраны в тех же направлениях (см. рис. 2, 3). Так, в присутствии $3 \cdot 10^{-4}$ М ципроконазола сопротивление клеток увеличивалось почти вдвое, РЭП при этом снижалась в среднем на 33 мВ. Внесение в среду $3,5 \cdot 10^{-4}$ М указанного препарата вызвало более сложную реакцию клетки: после первоначального трехкратного роста величины сопротивления (в течение 25 мин) наблюдалось его падение до контрольных величин, значения РЭП уменьшались в среднем на 85 мВ. Действие ципроконазола характеризовалось обратимостью в интервале концентраций $3,5 \cdot 10^{-5}$ – $3,5 \cdot 10^{-4}$ М.

Таким образом, для каждого из препаратов характерно наличие определенного достаточного узкого интервала концентраций, в которых мембранотропные эффекты были обратимыми. Как правило, десятикратное увеличение пороговых концентраций всех соединений приводило к резким необратимым сдвигам электрических показателей плазмалеммы и гибели клеток. Среди испытанных веществ наиболее значительным мембранотропным действием обладал фунгицид пропиконазол: он вызывал сдвиги электрических показателей плазмалеммы при наиболее низких концентрациях. Тебуконазол обладал более слабым по сравнению с пропиконазолом мембранотропным действием, но заметно превосходил ципроконазол. В результате испытанные соединения в порядке уменьшения способности вызывать сдвиги биоэлектрических показателей плазмалеммы можно расположить следующим образом: пропиконазол > тебуконазол > ципроконазол. Отметим, что подобная последовательность сохраняется и в том случае, если в качестве определяющего критерия принять показатели, характеризующие фунгитоксические свойства данных препаратов, например, ED_{50} (концентрация, вызывающая ингибирование грибного роста на 50 %). Так, пропиконазол, воздействующий на электрические характеристики плазмалеммы клеток *N. flexilis* в самых низких концентрациях, имеет и самые низкие значения ED_{50} по отношению к таким возбудителям болезней растений, как *Botrytis cinerea*, *Pyrenopeziza teres*, *Erysiphe graminis* и др. В то же время значения ED_{50} ципроконазола для *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum* и других патогенов в 5–10 раз превышали соответствующие величины для пропиконазола [7–9]. В работах [7, 8] указывается, что наблюдаемые различия в фунгитоксических свойствах триазоловых фунгицидов не являются следствием различий в воздействии на ферменты, участвующие в биосинтезе эргостерина, а определяются факторами, влияющими на содержание этих соединений внутри клетки (проницаемостью плазматической мембраны, процессами накопления и распределения ксенобиотиков между клеточными компартментами, метаболическими превращениями и др.). Возможно, что обнаруженная корреляция между мембранотропными свойствами и фунги-

токсичностью триазолов в некоторой степени отражает сходство механизмов, посредством которых осуществляется взаимодействие этих соединений как с грибной мембраной, так и с плазмалеммой растительной клетки.

Обнаруженное в ходе экспериментов сравнительно быстрое развитие реакции на внесение и удаление пропиконазола в концентрациях $3 \cdot 10^{-6}$ – $1,5 \cdot 10^{-5}$ М, тебуконазола – 10^{-5} – $4 \cdot 10^{-5}$ М, ципроконазола – $3,5 \cdot 10^{-7}$ – $3 \cdot 10^{-7}$ М свидетельствует о том, что обратимый эффект препаратов, вероятно, обусловлен их прямым воздействием на плазмалемму с наружной стороны и не затрагивает процессы внутриклеточного метаболизма.

Согласно развиваемому нами подходу [10] по величине и направлению сдвигов РЭП и сопротивления плазмалеммы можно качественно определить характер изменения проницаемости мембраны к определенным ионам. По данным экспериментов, действие пропиконазола, тебуконазола и ципроконазола в концентрациях выше $1,5 \cdot 10^{-5}$ М, $7 \cdot 10^{-5}$ М и $3 \cdot 10^{-4}$ М соответственно может быть охарактеризовано как увеличение проницаемости мембраны к ионам натрия и/или хлора. Эти данные согласуются с результатами экспериментов на листьях *Elodea densa*, в которых показано, что токсические концентрации триазолов вызывали увеличение пассивной проницаемости плазмалеммы [5]. При действии же тебуконазола и ципроконазола на плазмалемму в концентрациях ниже указанных пределов характер модификации ионной проницаемости мембраны иной, поскольку отмечается рост сопротивления. В этом случае, вероятно, происходит не увеличение, а уменьшение проницаемости мембраны к ионам калия и натрия.

Различия в действии испытанных фунгицидов, возможно, связаны со строением N1-заместителей в составе их молекул. Как тебуконазол, так и ципроконазол, характеризующиеся качественным сходством мембранотропного действия, содержат в структуре N1-заместителя радикал 4-хлорфенила. В состав же указанного заместителя пропиконазола входит 2,4-дихлорфенил, соединенный с триазольным кольцом посредством диоксоланового цикла, что, возможно, и определяет отличие вызываемых этим фунгицидом мембранотропных эффектов.

Поскольку ионная проницаемость мембраны обусловлена функционированием специфических систем транспорта, то для детализации наблюдаемых эффектов в дальнейшем предполагается исследовать влияние фунгицидов на свойства отдельных систем ионного транспорта.

1. Прусакова Л. Д., Чижова С. И. // *Агрехимия*. 1998. № 10. С. 37.
2. Голышин Н. М. *Фунгициды*. М., 1993. С. 46.
3. Молчанов А. Ю. *Биологические аспекты изучения азолсодержащих фунгицидов*. Мн., 1989. С. 39.
4. Андреева Е. И., Зинченко В. А. *Биологическая активность и механизм действия системных фунгицидов*. М., 1995. С. 28.
5. Romani G., Beffagna N. // *New Phytol. Mar.* 1991. Vol. 117. № 3. P. 431.
6. Юрин В. М., Гончарик М. Н., Галактионов С. Г. *Перенос ионов через мембраны растительных клеток*. Мн., 1977.
7. Stehmann C., Waard M. A. // *Pestic. Sci.* 1995. Vol. 44. № 2. P. 183.
8. Kwok I., Loeffler R. // *Pestic. Sci.* 1993. Vol. 39. № 1. P. 1.
9. Чканников Д. И., Соколова Г. Д., Девяткина Г. А., Павлова В. В. // *Агрехимия*. 1996. № 12. С. 68.
10. Юрин В. М., Иванченко В. М., Галактионов С. Г. *Регуляция функций мембран растительных клеток*. Мн., 1979.

Поступила в редакцию 09.11.2000

Дитченко Татьяна Ивановна – аспирантка. Научный руководитель В. М. Юрин.

Кудряшов Анатолий Петрович – кандидат биологических наук, доцент.

Юрин Владимир Михайлович – доктор биологических наук, профессор.

