

## Использование политенных хромосом слюнных желёз хируномид (Diptera, Chironomidae) для оценки загрязнения водных экосистем

### The use of salivary gland chromosomes of Chironomids (Diptera, Chironomidae) for assessing the pollution of aquatic ecosystems

Н.А. Петрова\*, П.В. Михайлова\*\*  
N.A. Petrova\*, P.V. Michailova\*\*

\* Зоологический институт РАН, Университетская наб. 1, Санкт-Петербург 199034 Россия. E-mail: chironom@zin.ru.

\* Zoological Institute RAS, Universitetskaya Nab. 1, Saint Petersburg 199034 Russia.

\*\* Институт биоразнообразия и экологических исследований БАН, София 1000 Болгария. E-mail: pmichailova@yahoo.com.

\*\* Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, BAS, Sofia 1000 Bulgaria.

**Ключевые слова:** Chironomidae, политенные хромосомы, хромосомные перестройки, функциональные нарушения, тяжёлые металлы, радиация.

**Key words:** Chironomidae, polytene chromosomes, chromosome aberrations, structural and functional alterations, heavy metals, radiation.

**Резюме.** Обсуждается роль личинок хируномид в оценке степени загрязнения различных водных экосистем. Показано, что хируномиды чувствительны к любым загрязнениям окружающей среды, в том числе к загрязнениям тяжёлыми металлами, радионуклидами и др. В политенных хромосомах личинок хируномид появляются разнообразные структурные перестройки: наследственные хромосомные аберрации и множество соматических аберраций. Особенно высока чувствительность маленькой хромосомы G, которая превращается в «помпоподобную» хромосому — хороший биомаркер загрязнения тяжёлыми металлами. Предлагается использовать два индекса экологической оценки: соматический индекс для оценки реакции генома и цитогенетический индекс для оценки степени загрязнения водоёма. Как правило, аберрации локализируются на участках хромосом, богатых мобильными элементами или высоко повторяющимися последовательностями ДНК.

Вместе со структурными аберрациями, тяжёлые металлы вызывают изменения в транскрипционной активности важных районов хромосом: ядрышка (ЯО) и колец Бальбиани (BR). В условиях стресса функциональная активность в этих районах снижается или полностью подавляется. Широкий спектр структурных и функциональных изменений в геноме хируномид также наблюдается в экспериментальных условиях после воздействия хрома (Cr), свинца (Pb), алюминия (Al) и других металлов. Рассматривается влияние радиационного загрязнения у ряда видов хируномид в Чернобыльской зоне. Появились новые хромосомные аберрации: инверсии, дупликации, добавочные хромосомы, увеличение контактов между теломерами разных хромосом. Значительно снижена транскрипционная активность ядрышка (ЯО) и BR. Все результаты, представленные в обзоре, демонстрируют надёжность цитогенетического подхода при анализе влияния факторов антропогенного загрязнения окружающей среды. Соматические аберрации и изменения транскрипционной активности важных участков хро-

мосом могут быть успешно использованы в качестве биомаркеров для оценки состояния водных экосистем.

**Abstract.** The role of chironomid larvae in assessing the degree of pollution of various aquatic ecosystems is discussed. It was shown that chironomids are sensitive to different forms of environmental pollution, including heavy metals and radionuclides. Various structural rearrangements appear in the polytene chromosomes of chironomid larvae collected from polluted water bodies, namely different inherited chromosomal aberrations and many somatic aberrations. The sensitivity of the small G chromosome is especially high, which turns into a «pom-pom-like» chromosome, a good biomarker for heavy metal contamination. The use of two indices for environmental assessment are proposed: the somatic index to assess the genome response and the cytogenetic index to assess the degree of pollution of the reservoir. As a rule, aberrations are localized in regions of chromosomes rich in mobile elements or highly repetitive DNA sequences. Together with structural aberrations, heavy metals cause changes in the transcriptional activity of important regions of chromosomes: the nucleolus (NOR) and Balbiani rings (BRs). Under stressful conditions, functional activity in these regions is reduced or completely suppressed. A wide range of structural and functional changes in the genome of chironomids is also demonstrated in experimental conditions after exposure to chromium (Cr), lead (Pb), aluminum (Al) and other metals. The influence of the radiation in a number of chironomid species in the Chernobyl zone is considered. Many new chromosome aberrations were discovered (inversions, duplications, additional chromosomes, contacts between telomeres of different chromosomes). The transcriptional activity of the nucleolus (NOR) and BRs decreased. The results presented in the review demonstrate the significance of the cytogenetic approach for analyzing the influence of factors of anthropogenic environmental pollution. Somatic aberrations and changes in the transcriptional activity of important chromosome regions can be successfully used as biomarkers to assess the state of aquatic ecosystems.

Хирономиды обладают политенными хромосомами с чёткой и характерной дисковой структурой. Показано, что они чувствительны к любым загрязнениям окружающей среды, в том числе тяжёлыми металлами, радионуклидами, некоторыми промышленными загрязнениями и др. В политенных хромосомах возникают разнообразные структурные перестройки. Некоторые виды имеют наследственные структурно-хромосомные изменения, которые представлены с большой частотой. Они играют основную роль при адаптации вида. У других видов появляется множество соматических aberrаций, которые встречаются у части клеток с небольшими частотами. Особенно важно подчеркнуть высокую чувствительность маленькой хромосомы G в геноме, которая превращается в «помпоподобную» хромосому [Michailova et al., 1998]. Эта хромосома является хорошим показателем начинающегося загрязнения водоёма тяжёлыми металлами.

Благодаря многочисленным экспериментам и гибридизации *in situ* клонами ДНК и мобильных элементов, показано, что aberrации проявляются неслучайно в геноме, они локализуются на участках хромосом, богатых мобильными элементами и высоко повторяющимися последовательностями ДНК [Bovero et al., 2002; Michailova et al., 2009, 2012]. Наряду со структурными aberrациями, тяжёлые металлы вызывают изменения в транскрипционной активности важных районов хромосом: ядрышка (ЯО) и колец Бальбиани (BR). В условиях стресса функциональная активность ядрышкового организатора (ЯО) и BR снижается или полностью подавляется. Тяжёлые металлы вызывают как общие, так и специфические реакции у хирономид. Например, ионы Pb индуцируют появление новых пучков, ионы Cd превращают нормальную дисковую структуру в зернистую с набухшими теломерами, ионы Al вызывают нарушение конъюгации гомологичных хромосом и т.д. [Michailova et al., 2001a, b, 2003].

Подробно рассмотрено влияние радиационного загрязнения у ряда видов хирономид в Чернобыльской зоне после аварии 26 апреля 1986 года. У трёх видов: двух из рода *Chironomus* (*Ch. plumosus*, *Ch. balatonicus*) и одного из рода *Glyptotendipes* (*G. glaucus*) появились новые структурные aberrации: инверсии, дупликации, добавочные хромосомы. Наблюдалось увеличение частоты контактов между теломерами хромосом. Значительно снизилась транскрипционная активность таких структур как ЯО и BR [Petrova, 2013]. Все результаты, представленные в обзоре, демонстрируют надёжность цитогенетического подхода при анализе влияния факторов антропогенного загрязнения окружающей среды. Соматические aberrации и изменения транскрипционной активности важных клеточных структур могут успешно использоваться в качестве биомаркеров для оценки состояния водных экосистем.

Для оценки состояния окружающей среды применяются разные физические и химические подходы, но самым важным является биологический подход. Осо-

бенно эффективными для этой цели являются виды семейства Chironomidae, широко распространённой группы двукрылых насекомых. Личинки, составляющие до 50 % макрозообентоса водоёмов являются одним из самых важных элементов для оценки водных экосистем. Использование модельных видов хирономид позволяет лучше оценить экологическое загрязнение водной среды на индивидуальном и популяционном уровнях, а также на уровне сообществ. Личинки хирономид встречаются повсеместно и занимают ведущее место в водоёмах разных типов. Они играют важную роль в самоочищении водоёмов. Личинки живут на дне, в иле, где часто накапливаются продукты загрязнений. Они не только подвергаются постоянным воздействиям загрязнителя, но в значительной степени его аккумулируют.

Биологический подход для оценки степени загрязнения водоёмов предусматривает использование системы индикаторных таксонов или данных о соотношении относительной численности личинок разных подсемейств хирономид [Toderash, 1984; Balushkina, 1987]. С другой стороны, многие авторы [Makrushin, 1974; Saether, 1979] считают, что при использовании хирономид как биоиндикаторов более точно выделять не отдельные виды, а целые сообщества, характеризующие степень эвтрофности озёр.

Однако, в гидробиологических работах, при характеристике степени загрязнения того или иного водоёма, как правило, точное видовое определение не используется, а внимание исследователей привлекают крупные таксономические единицы, подсемейства, роды, «группы видов». Такой общий подход к проблеме не всегда даёт необходимые результаты. Сегодня для прогноза состояния водных экосистем используются цитогенетический, биохимический, молекулярный и морфологический подходы. Трудность заключается в том, что определение видов по личинке в большинстве случаев затруднено из-за большого морфологического сходства личинок одного рода. Часто под одним личиночным морфотипом скрываются до 10 и более видов. Чтобы использовать хирономид в качестве биоиндикаторов, необходимо точно знать их видовой состав в исследуемом водоёме.

Хирономиды особенно подходят для цитогенетического анализа, так как в некоторых тканях личинок (слюнные железы, мальпигиевые сосуды, эпителий пищеварительного тракта и др.) имеются политенные хромосомы, которые успешно используются при цитотестировании. Самыми удобными для этой цели являются политенные хромосомы слюнных желёз. Эти хромосомы позволяют проследить любые антропогенные воздействия, вызывающие хромосомные перестройки и изменчивость генома. Они важны также для решения таксономических проблем в семействе.

В современной таксономии Chironomidae успешно используются цитогенетические и морфологические особенности личинок [Michailova, 1989; Petrova, 1990; Kiknadze et al., 1991, 1996, 2016].

Интерфазные (политенные) хромосомы по размеру в 100 раз больше, чем обычные митотические, они являются результатом многократной репликации хромомем, которые не расходятся, а, благодаря полной соматической конъюгации материнского и отцовского гомологов, остаются в клетках слюнных желёз. Они характеризуются индивидуальной дисковой структурой и маркерами, специфичными для каждого вида [Michailova, 1989; Petrova, 1990; Kiknadze et al., 2016]. Цитогенетический анализ позволяет изучать как естественный, так и индуцированный мутагенез особи и популяции в целом. Сегодня его считают одним из наиболее важных методов биомониторинга для оценки антропогенного влияния на экосистемы [Michailova et al., 2012].

Политенные хромосомы чувствительны к естественным изменениям окружающей среды: при изменении температуры и солёности воды они сильно набухают и приобретают зернистую структуру. В экспериментальной или естественно изменённой среде обитания в кариофонде вида спонтанно возникают наследственные структурно-хромосомные aberrации, выявляется необычно высокий уровень инверсионного полиморфизма [Petrova, 2013; Michailova et al., 2015]. У видов *Chironomus* Mg., *Glyptotendipes* Kieffer, *Polypedilum* Kieffer и др. возникают, так называемые, наследственные полиморфные системы, характеризующиеся заменой стандартных последовательностей дисков на инверсионно-гомозиготные через гетерозиготности. Например, стандартная последовательность в плече A1.1 у *Ch. plumosus* превращается в другую гомозиготную последовательность A2.2 [Michailova, 1989; Petrova, Michailova, 1996].

Многолетние цитогенетические исследования видов рода *Chironomus* показали, что часто в популяциях появляются соматические aberrации, которые возникают у части клеток с низкими частотами. Сегодня на основе этих aberrаций предложены два индекса, соматический и цитогенетический, которые указывают на чувствительность генома и на степень загрязнения окружающей среды [Sella et al., 2004; Ilkova et al., 2014]. У широко распространённого *Ch. riparius* Mg. в результате таких соматических изменений, появляется «букет» уникальных последовательностей с низкими частотами встречаемости [Michailova et al., 2012; Ilkova et al., 2014].

Для того, чтобы проследить изменчивость политенных хромосом, необходимо сделать хорошие хромосомные препараты из слюнных желёз и изучить их изменчивость под влиянием загрязнения среды. Для этого нужно знать точно стадию, фазу и пол личинки.

## Объекты цитотестирования

Хиرونмиды родов *Chironomus* (*Ch. riparius* Meigen и *Ch. piger* Strenzke) и *Glyptotendipes* (*G. glaucus* Mg., *G. pallens* Michailova, *G. barbipes* Staeger) и *G. salinus* Michailova) используются ис-

следователями как модельные виды. Первые два вида успешно разводятся в лаборатории, а виды *Glyptotendipes* разводятся только после принудительного скрещивания по специальной методике, разработанной Фишером [Fischer, 1969] и усовершенствованной Михайловой [Michailova, 1985].

В жизненном цикле хиرونмид самая длительная стадия личинки IV возраста. Высокая чувствительность к любым загрязнениям водной среды и способность аккумулировать загрязнители выделяют хиرونмид среди других насекомых, и даёт им значительное преимущество перед всеми другими водными организмами в качестве биоиндикаторов.

Оплодотворённая самка откладывает яйца в массе слизи, которую легко можно найти в природе. *Ch. plumosus* откладывает яйца у уреза воды в хорошо прогреваемых местах с благоприятным кислородным режимом; *Ch. riparius* и *Ch. piger* — на водные растения или на поверхность воды на мелководье. У большинства видов рода *Chironomus* кладка имеет вид длинной ленты. Одна кладка у разных видов может содержать от 600 до 900 яиц. Для создания лабораторной культуры необходимо собрать кладку из чистого водоёма, о котором известно, что его параметры, характеризующие уровень загрязнения, находятся в пределах допустимого. Подробности для приготовления лабораторной культуры можно найти в работе Михайловой [Michailova, 1985]. Для проведения эксперимента с разными загрязнителями, например, различными солями тяжёлых металлов, необходимо составить предварительный план эксперимента и подготовить растворы нужных концентраций соответствующих загрязнителей. При хроническом воздействии в растворе с определённой концентрацией загрязнителя необходимо помещать личинок сразу после отрождения. Параллельно с экспериментом в отдельном контейнере необходимо проводить контрольный опыт. Перед окукливанием часть личинок IV возраста фиксируется для цитогенетического анализа: 3 части 96 % этанола и 1 часть ледяной уксусной кислоты (3:1). Оставшиеся личинки могут использоваться для продолжения эксперимента.

Для цитологического тестирования важно уметь определять IV возраст личинки, 6–7 фазу физиологической зрелости внутри этой стадии и пол личинки [Il'inskaya, 1982]. Именно в этот период развития в политенных хромосомах наблюдается чёткая дисковая структура и проявляются все маркеры хромосом. Продолжительность IV-го возраста составляет более половины всего жизненного цикла (от 15 и более дней). В 6–7 и более поздних фазах развития происходит формирование некоторых кукольных и имагинальных органов, созревают половые продукты у самцов и протекают ранние этапы оогенеза у самок, накапливаются энергетические ресурсы, обеспечивающие метаморфоз и созревание яиц.

Методика определения как стадий и фаз, так и пола особи несложна. В IV возрасте выделяют 9 фаз

физиологической зрелости личинок, особенно хорошо они видны у *Ch. riparius*. Определение возраста и фаз развития можно проводить по морфологии имагинальных дисков, которые расположены на I–III грудных сегментах и VII–IX брюшных сегментах личинки, соответственно [Wülker, Götz, 1968]. По специфическим морфологическим признакам имагинальных дисков в брюшных сегментах можно определять пол личинок. Определение пола проводится под биноклем при хорошем освещении и правильной ориентировке личинки: на боку — при рассмотрении грудных имагинальных дисков и на спине — при рассмотрении зачатков гениталий на брюшных сегментах. Есть несколько практических советов для использования этой методики. Начинать просмотр имагинальных дисков удобнее со II грудного сегмента, т.к., по сравнению с другими сегментами, здесь первыми появляются имагинальные диски. Затем надо переходить к изучению морфологии дисков на I грудном сегменте. По морфологии дисков можно точно определить VII–IX фазы развития. После этого личинку, лежащую на боку, переворачивают на спину и рассматривают имагинальные диски гениталий. Для быстроты и удобства определения стадии, фазы и пола личинки наблюдаемую морфологию имагинальных дисков лучше сопоставить с описанием и рисунками, сделанными для двух видов: *Ch. riparius* [Wülker, Götz, 1968] и *Ch. plumosus* [Il'inskaya, 1982].

Для цитогенетического анализа применяется быстрый метод приготовления давленных ацето-орсеиновых препаратов [Keyl, 1962; Michailova, 1989; Petrova, 1990, 2013; Kiknadze et al., 1991, 1996]. Параллельно с цитогенетическими препаратами необходимо готовить препарат внешней морфологии личинки, чтобы «связать» морфологию личинки с кариотипом и определить род и вид личинки.

Чтобы правильно анализировать политенные хромосомы, необходимо знать следующие основные особенности, разработанные на примере модельного вида *Ch. riparius* как наиболее часто используемого в экспериментах. Вид имеет  $2n = 8$  (рис. 1). Сочетание плеч хромосом: AB, CD, EF, G (цитокм-плекс «thummi») [Keyl, 1962]. Хромосомы AB, CD — метацентрические, EF — субметацентрическая и самая маленькая G — телоцентрическая. Гомологи хромосом плотно конъюгируют. У подавляющего большинства видов в каждой хромосоме имеется заметный гетерохроматиновый диск, выполняющий роль центромерного района, один (или несколько) ЯО, 3 (или больше) BR. Каждое плечо хромосомы имеет свой цитогенетический маркер, по которому его можно легко узнать на препарате. Вид должен иметь хорошо сделанную стандартную хромосомную карту, как, например, у *Ch. riparius* [Hägele, 1970; Kiknadze et al., 1991]. На карте каждая хромосома разделена на секции и подсекции. На ней можно отметить любые изменения в структуре политенной хромосомы и функциональной активности в том числе под влиянием разных антропогенных факто-

ров. У модельного вида *Ch. riparius* плечо G представляет собой самую короткую хромосому в кариотипе, где локализованы три BR (BRa, BRb, BRc) и один ЯО. Район BRa активен только в четырёх клетках специальной доли слюнной железы.

### Цитотестирование политенных хромосом под влиянием антропогенного загрязнения

Личинки хирономид, как известно, имеют важное функциональное значение в водных экосистемах. Многие гидробионты, в том числе и хирономиды, способны накапливать тяжёлые металлы и другие вещества благодаря большой проницаемости их кутикулы. В водоёмах Молдавии у личинок *Ch. plumosus* обнаружены: железо (18,5 мкг/мг золы), алюминий (9,2), медь (3,7), марганец (2,43), титан (1,23) и серебро (0,01), а также следы молибдена, никеля, ванадия и кобальта; отсутствуют висмут, олово и свинец [Toderash, 1984].

Цитогенетический мониторинг *Ch. riparius*, *Ch. piger* и *Ch. plumosus* из водоёмов с концентрациями тяжёлых металлов Zn, Pb, Cu, Co, Fe, Ni и др., превышающими норму, был проведён в Болгарии [Todorova et al., 2000], Италии [Michailova et al., 2000], России [Vinogradova, Petrova, 2004], Польше [Szarek-Gwiazda et al., 2013], Англии [Michailova et al., 2015, 2016] и Турции [Duran et al., 2012]. В результате этих исследований установлено, что под влиянием тяжёлых металлов у этих видов появляется значительная хромосомная изменчивость. Эта изменчивость встречается у части клеток особи и играет основную роль в адаптации вида. Для оценки загрязнения и его влияния на геном вида, Селла с коллегами [Sella et al., 2004] предложили использовать соматический индекс (S), который вычисляется путём деления общего числа соматических инверсий, наблюдаемых в популяциях, на количество личинок в выборке. Эти изменения встречаются у части клеток особи. Позже Илкова с коллегами [Ilkova et al., 2014] предложили цитогенетический индекс для оценки степени загрязнения окружающей среды.

Долгое время *Ch. riparius* считался мономорфным видом. Однако, в загрязнённых водоёмах у этого модельного вида обнаружены редкие и уникальные соматические гетерозиготные пара- и перичентрические инверсии, делеции, дефишенсы, перестройки в центромерном районе и деконденсация центромерного гетерохроматина (рис. 2а, б, в). Отмечено значительное повышение частоты контактов между теломерами разных хромосом (рис. 3). Особенно интересна абберация, связанная с локальной амплификацией отдельных дисков. Цитофотометрия показала, что в хромосоме EF *Ch. riparius* рядом с центромерой возникают диски с двух- и трёхкратным увеличением количества ДНК (рис. 2 в) по сравнению со стандартом [Michailova, Ilkova, 2013].



Рис. 1. Политенные хромосомы (AB, CD, EF, G) *Chironomus riparius* ( $2n = 8$ ) [по Michailova, 1989]. A, B, C, D, E, F, G — плечи хромосом; стрелками указаны центромерные районы; BR — кольцо Бальбиани; NOR — ядрышко. Масштаб 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 1. Polytene chromosomes (AB, CD, EF, G) of *Chironomus riparius* ( $2n = 8$ ) [Michailova, 1989]. A, B, C, D, E, F, G — chromosome arms; centromeric regions are marked by arrows; BR — Balbiani ring; NOR — nucleolus. Scale 100  $\mu\text{m}$ .

Очень чувствительна к антропогенному загрязнению в геноме *Ch. riparius* хромосома G (рис. 4a). В ней локализованы важные в функциональном отношении структуры BR и ЯО, которые представляют собой наиболее транскрипционно-активные участки генома. BR содержат гены, которые синтезируют

гигантские полипептиды, необходимые для построения домика и плетения ловчих сетей. От этой важной жизненной функции зависит выживание и развитие личинки, а также численность вида. ЯО содержит гены, в которых происходит синтез рибосомальной РНК. На цитогенетическом уровне в политенных хро-

мосомах иногда появляются новые специфические пuffs, характеризующиеся высокой транскрипционной активностью и морфологически сходные с BR. Также нужно отметить, что после воздействия некоторых металлов, например, ионов Cr у *G. pallens*, возникает реакция теплового шока «heat shock reaction» и усиливается синтез его белков (HSP70) [Todorova et al., 2000]. Показано, что эти белки играют роль защитного механизма в условиях стресса. В хромосоме G у *Ch. riparius* наиболее часто возникают гетеро- и гомозиготные делеции. Когда делеция затрагивает одно BR (например, BRc), хромосома набухает и превращается в «помпоноподобную» (рис. 4 б) [Michailova et al., 1998; Michailova, Ilkova, 2013]. Когда же делеция затрагивает и другие BR с близлежащими к нему дисками, хромосома превращается в бесформенное тело (рис. 4 в).

Обнаруженная структурно-хромосомная изменчивость у *Ch. riparius* затрагивает почти каждую особь, однако делеции характеризуются низкой частотой. Часто наблюдается нарушение конъюгации гомологов хромосомы G (рис. 5а, б, в).

Геном каждого вида реагирует на загрязнения как на структурном, так и функциональном уровнях. Появляется множество новых специфических пuffs, указывающих на повышенный синтез белков, необходимых для существования вида в экстремальных условиях. Центромерный и теломерный гетерохроматин часто переходит в деконденсированное состояние. Высказано предположение, что в экстремальных условиях происходит ингибирование синтеза белков, принимающих участие в конденсации гетерохроматина [Michailova et al., 2012].

В стрессовых условиях активность BR и ЯО может уменьшаться и даже совсем подавляться. На рис. 6 можно видеть понижение активности BRc и BRb, понижение активности ЯО (рис. 6), гетерозиготную делецию среднего участка и общую деконденсацию хромосомы.

Полученные наблюдения необходимо сравнить с функциональной активностью хромосом стандартного кариотипа. Беерман [Beermann, 1971] впервые предложил обозначения для разной степени активности BR и ЯО. Согласно этому автору, самая высокая активность обозначается двумя плюсами (++), пониженная активностью одним плюсом (+), а слабая или её отсутствие знаком минус (-). Когда активность подавлена (-), на месте BR и ЯО хорошо виден интеркалярный гетерохроматин. Изменение активности от высокой до полного подавления в BR и уменьшение активности ЯО были прослежены после воздействия ионов некоторых тяжёлых металлов в разных концентрациях [Michailova et al., 2012]. Чувствительными к загрязнению среды оказались и другие виды *Chironomus* (*Ch. piger*, *Ch. plumosus*, *Ch. balatonicus*, *Ch. bernensis*) [Michailova et al., 2015, 2016], а также виды *Glyptotendipes* (*G. glaucus*, *G. barbipes*, *G. salinus*) [Michailova et al., 2002], широко распространённые в разных водоёмах, характе-

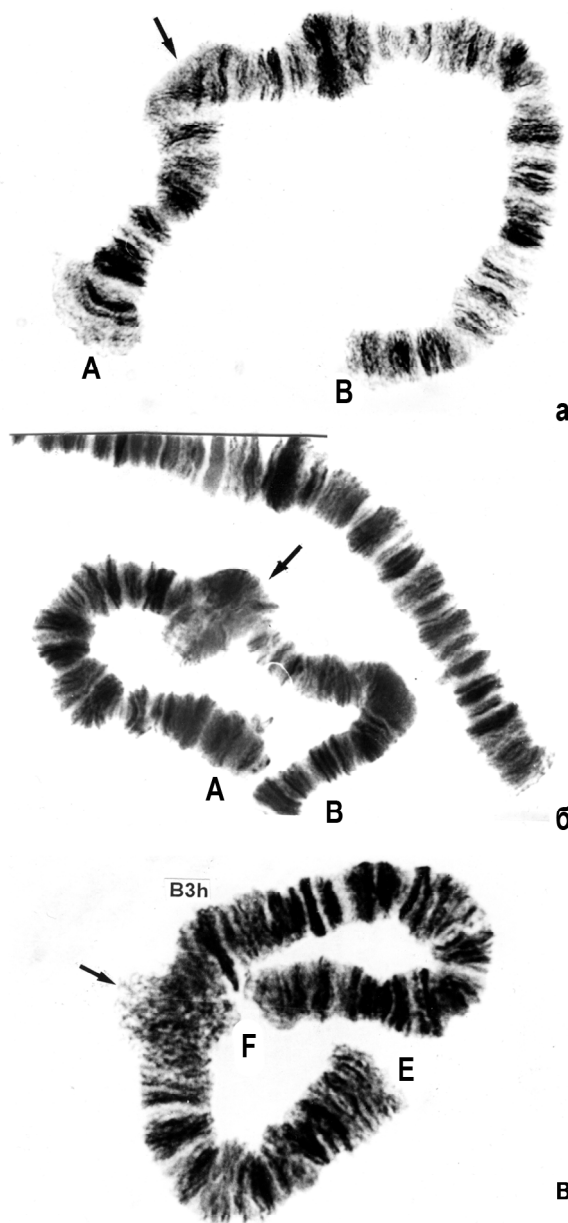


Рис. 2. Соматические aberrации хромосом у *Chironomus riparius* а — парацентрическая гетерозиготная инверсия в плече А; б — перичентрическая гетерозиготная инверсия в районе центромеры хромосомы АВ; в — деконденсация центромерного гетерохроматина хромосомы EF и амплификация диска B3h в плече F. Масштаб 100  $\mu$ m.

Fig. 2. Somatic aberrations in the chromosomes of *Chironomus riparius* а — paracentric heterozygous inversion in the A arm; б — pericentric heterozygous inversion in the centromeric region of the AB chromosome; в — decondensation of centromeric heterochromatin in the EF chromosome and amplification of the B3h band in the F arm. Scale 100  $\mu$ m.

ризующихся антропогенным загрязнением [Michailova et al., 2012].

Возможно, подобная структурно-функциональная изменчивость генома у личинок связана с перемещением мобильных элементов, стимулирующих возник-

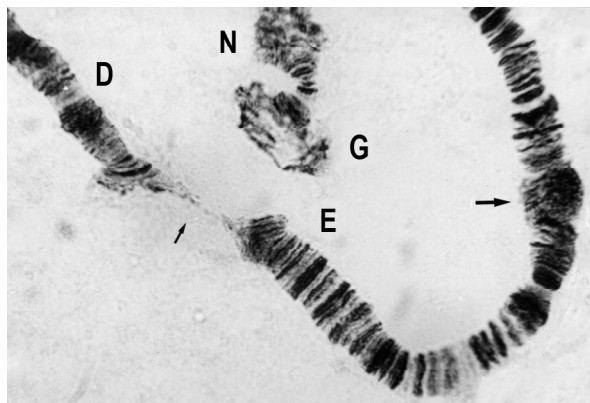


Рис. 3. Эктопические теломерные контакты между плечами E и D *Chironomus riparius* из загрязнённого тяжёлыми металлами природного водоёма.

Fig. 3. Ectopic telomere pairing of the E and D arms of *Chironomus riparius* collected from the water bodies polluted by heavy metals.

новение хромосомных перестроек [McClintock, 1968; King, 1993]. Оказалось, что появление на хромосомах некоторых «горячих» точек (мест разрывов) не случайно, а связано с гетерохроматиновыми участками политенных хромосом, где локализуются высокоповторяющиеся последовательности ДНК [Bovero et al., 2002; Michailova et al., 2009]. Геном состоит из двух компонентов: облигатного (ОК) и факультативного (ФК) [Golubovskii, 2000]. Облигатный компонент — это совокупность всех генов, локализованных в хромосомах; факультативный — совокупность последовательностей ДНК, количество и топография которых характеризуются межклеточной и межиндивидуальной вариабельностью. Среди элементов ФК выделяются фракция сателитной ДНК, мобильные генетические элементы, рассеянные по геному, и эндогенные вирусы. Два компонента (ОК и ФК) всегда взаимодействуют, что хорошо можно проследить в условиях антропогенного загрязнения. Процесс амплификации дисков объясняется переходом составляющих ОК в ФК. Умножение копий генов обеспечивает устойчивость к неблагоприятным факторам среды и играет важную роль в адаптации вида. Есть и обратная связь: изменение топографии (локализации) элементов ФК (например, мобильных элементов) индуцируется абиотическими факторами среды в случаях разного типа загрязнений. Мобильные элементы активируются, что приводит к изменению облигатной части генома (ОК), выражающемуся в структурно-функциональной реорганизации генома, а это, в свою очередь, способствует приспособлению вида к новым стрессовым условиям существования. Нужно также отметить, что под воздействием разных стрессовых условий появляется т.н. эпигенетическая изменчивость, связанная с взаимодействием гена и его продукта. Появление новых специфических пuffed можно объяснить нарушением этого взаимодействия. Иногда продукт структурного гена способен инактивировать продукт гена-регулятора, который, в свою

очередь, репрессирует этот же структурный ген [Golubovskii, 2000].

### Цитотестирование в эксперименте с тяжёлыми металлами

Поскольку в природе сосуществуют разные типы загрязнений (органические, тяжёлыми металлами, радионуклидами и т.д.), разграничить их действие на организм невозможно. Поэтому появилась необходимость проведения лабораторных экспериментов, при которых можно проследить эффект воздействия на модельные объекты каждого из факторов загрязнения. Нужно отметить, что в условиях эксперимента можно менять концентрацию и время воздействия стрессового агента при постоянстве остальных условий (температуры, pH, долготы дня, наличия света, пищи и др.). Таким образом, можно получить достоверные данные на протяжении нескольких поколений. Кроме того, попытаться выявить эффект кратковременного и длительного воздействия этих факторов. Особенно подходящими для лабораторных экспериментов являются виды-двойники *Ch. riparius* и *Ch. piger*.

Большинство ионов металлов имеют жизненно важное значение для нормального функционирования живой клетки, они являются составной частью многих гормонов, ферментов, витаминов и играют важную роль в осуществлении некоторых биохимических процессов в организме. Многие хирономиды способны накапливать тяжёлые металлы благодаря большой проницаемости их кутикулы.

Ионы хрома необходимы для метаболизма многих веществ в организме, например сахара [Losi et al., 1994]. Если этот ион, попадая в клетку, находится там продолжительное время, воздействуя на клетку в высоких концентрациях, то он производит токсический эффект. В действительности, токсичен шестивалентный хром, который в природе чрезвычайно нестабилен и легко переходит в трёхвалентное состояние. В этом состоянии хром встречается в воде и в илах водоёмов. Показано, что трёхвалентный хром почти не абсорбируется живыми организмами, так как он не способен проникать через клеточную мембрану. Его генотоксическое действие изучалось путём прямого воздействия на ядро клетки [De Flora et al., 1990].

В клетках пищеварительного тракта личинок хирономид и некоторых других двукрылых насекомых, например, малярийных комаров, обнаружен специфический процесс эндоцитоза, который позволяет трёхвалентному хрому проникать в клетки этих насекомых [Wigglesworth, 1959]. Личинки хирономид являются подходящим объектом для изучения генотоксичности некоторых металлов, в том числе трёхвалентного хрома. Показано, что при кратковременном воздействии некоторых химических агентов усиливается синтез эволюционно консервативных белков, т.н. HSP (heat shock proteins). Они выступают в качестве адаптивного механизма, который позволя-

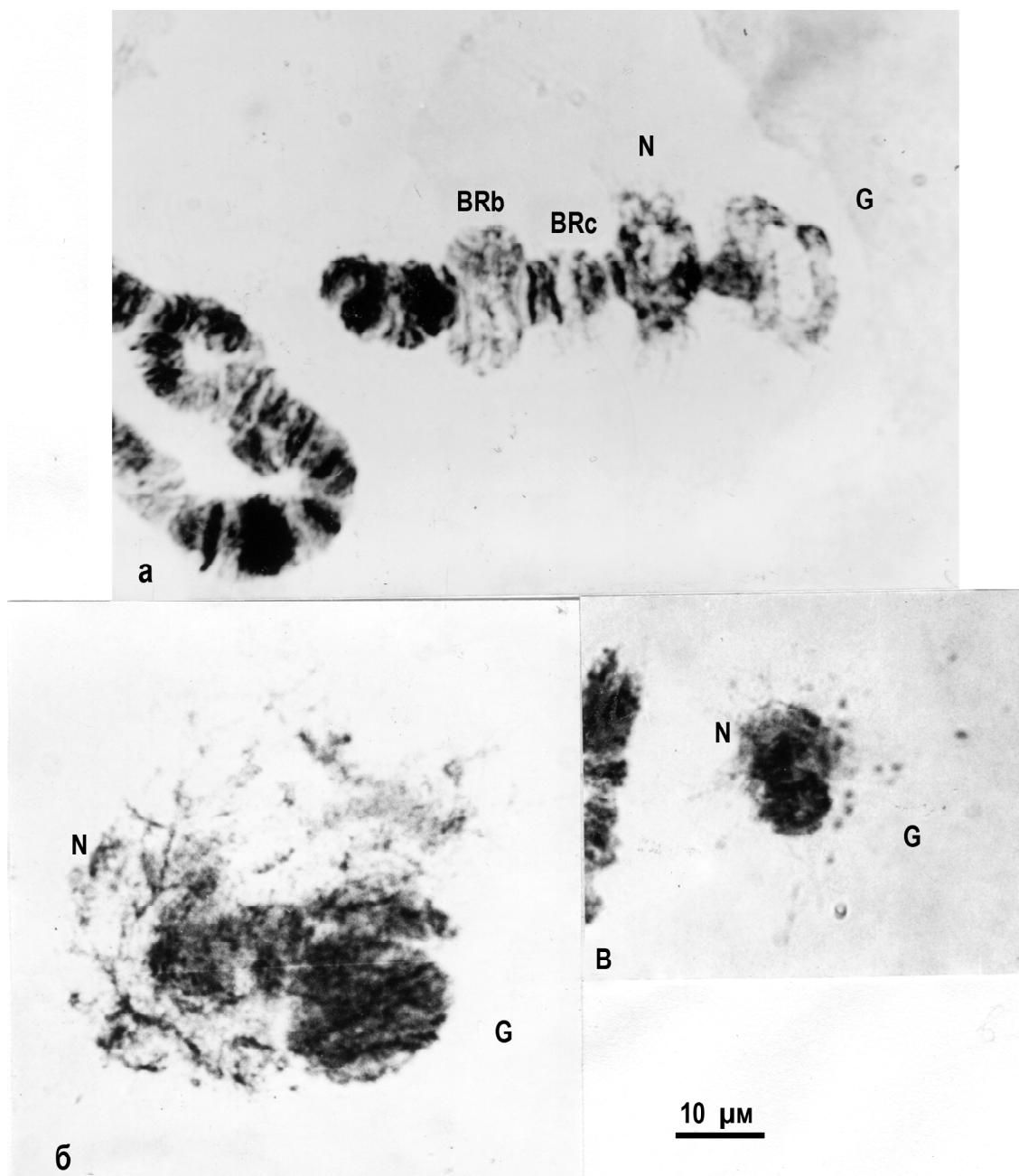


Рис. 4. Хромосома G *Chironomus riparius* Mg с разной степенью активности BRs и NOR: а — активность  $BRc < BRb$ ; высокая активность теломерного гетерохроматина; б — «помпон» в результате гомозиготной делеции BRc с прилежащим к нему участком хромосомы; в — крупная гомозиготная делеция  $BRc + BRb$  + прилежащие участки хромосомы превратили хромосому G в конденсированное тело.

Fig. 4. Chromosome G of *Chironomus riparius* Mg with different activity of BRs and NOR: а — activity  $BRc < BRb$ ; high activity of telomeric heterochromatin; б — «pompon» structure as a result of homozygous deletion BRc with adjacent chromosome region; в — great homozygous deletion  $BRc + BRb$  + adjacent chromosome regions turn G chromosome into condensed body

ет клетки и организму в целом выживать в условиях стресса. На цитогенетическом уровне это выражается в появлении новых специфических пуффов, характеризующихся высокой транскрипционной активностью [Baretino et al., 1988]. Установлено, что они сохраняются после воздействия ещё какое-то время, даже тогда, когда в клетке начинается процесс восстановления. Также чувствительными при

кратковременном воздействии оказались и BR: активность BRc уменьшается по сравнению с активностью BRb.

В лабораторных условиях были выполнены эксперименты с ионами хрома, алюминия и свинца при воздействии на *Ch. riparius* в 6–7 фазе. Использовались тяжёлые металлы, обнаруженные в природе. Во всех экспериментах был установлен широкий



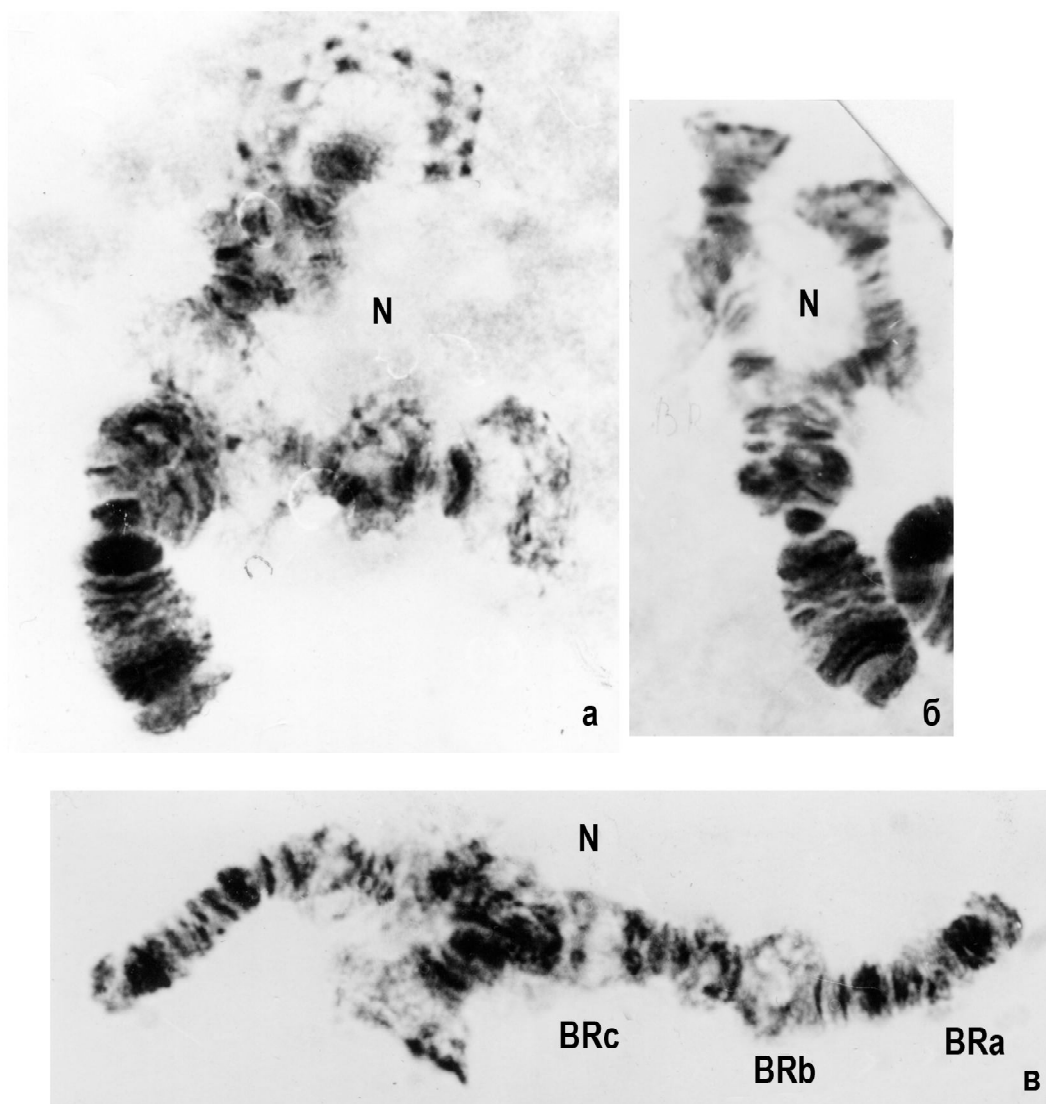


Рис. 5. Разная степень нарушения конъюгации между гомологами хромосомы G у *Chironomus riparius*.  
Fig. 5. Different degrees of conjugation disorder between homologues of chromosome G of *Chironomus riparius*.

спектр соматических структурных хромосомных aberrаций и снижения активности ЯО и BR. Эта реакция генома указывает на генотоксический эффект ионов тяжёлых металлов [Michailova et al., 2001a,b, 2003].

### Цитотестирование под влиянием облучения

Воздействие радиационного загрязнения на хромосомы широко распространённых видов *Ch. plumosus*, *Ch. balatonicus* и *G. glaucus* в зоне Чернобыльской аварии было прослежено нами на протяжении нескольких лет [Petrova, 2013]. Каждый вид по-своему приспособился к воздействию радионуклидов. В эксперименте, при кратковременном облучении самой чувствительной оказалась эмбри-

ональная стадия развития хирономид [Keyl, 1962]. В зависимости от дозы облучения с разной частотой появляются структурно-функциональные изменения хромосом; при хроническом облучении малыми дозами, хромосомные aberrации могут сохраняться в нескольких поколениях [Gunderina, Aimanova, 1998].

У *Ch. plumosus* в природных популяциях обнаружены 6 новых гетерозигонных инверсий; самыми полиморфными оказались плечи А и В [Petrova, Michailova, 1996; Petrova, 2013]. Следует обратить внимание на появление у двух личинок дополнительного NOR на теломере плеча А. Подобное явление неизвестно ни для одной популяции *Ch. plumosus* в Палеарктике. Чернобыльская популяция *Ch. balatonicus* изучалась на протяжении пяти лет после аварии (1986–1991). Самыми полиморфными

оказались плечи В, С, D. Отмечены нетипичные перестройки (гаплоидные разрывы хромосом, гетерозиготные нехватки, добавочный теломерный гетерохроматин, функциональная гетерозиготная активность теломер, появление добавочных В-хромосом (21,0 %)); такого высокого количества особей с В-хромосомами в популяциях хирономид Палеарктики у этого вида ранее не встречалось [Petrova, 2013]. По многим aberrациям обнаружен мозаицизм. Отмечено увеличение частоты контактов между теломерами разных хромосом. Обнаружено, что многие диски теряют отчётливую морфологию и приобретают зернистую нечёткую структуру. Кроме того, черномыльская популяция характеризовалась дупликацией центромерного гетерохроматина (у 55,0 % проанализированных особей). Отмечены функциональные изменения хромосом.

*G. glaucus* изучен из четырёх черномыльских популяций [Petrova, 2013]. Уровень гетерозиготности популяций невысок, на одну особь приходилось 0,65 инверсий; в целом, инверсии отмечены у 56,5 % особей. В популяции «Рыжий лес» на второй год наблюдений *G. glaucus* исчез из пруда. Вероятно, здесь находился плотный слой радиоактивного ила и сильно загрязнённая пища. Структурные перестройки (инверсии) появились в плечах А, В и D. Чаше наблюдались функциональные изменения хромосом. У личинок в черномыльских популяциях в плечах А, В, D, Е и F наблюдалось увеличение размеров отдельных дисков по сравнению со стандартным кариотипом. Появился новый пуфф, отсутствующий в стандартных популяциях. Полная неспаренность гомологов IV хромосомы отмечена у 75 % личинок, ЯО и BR характеризовались либо неполной активностью, либо они находились в гетерозиготном состоянии.

На основе результатов, полученных после воздействия разными загрязнителями на виды семейства Chironomidae, можно делать прогнозы о состоянии водных экосистем, о дальнейшей судьбе популяций в условиях антропогенных загрязнений. Эти результаты показывают надёжность цитогенетического подхода для оценки влияния антропогенных факторов на окружающую среду.

## Благодарности

Работа выполнена в рамках гостемы № АААА-А19-119020790106-0 и при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биоразнообразие природных систем и биологические ресурсы России», (подпрограмма «Генофонды живой природы и их сохранение»).

Авторы благодарят проф., д-ра В.Г. Кузнецову за редактирование рукописи, а Н.С. Хабазову за помощь в оформлении работы.

## Литература

Balushkina E.V. 1987. Funktsional'noe znachenie lichinok khironomid kontinental'nykh vodoyomov. L.: Nauka. 180 p. [In Russian].

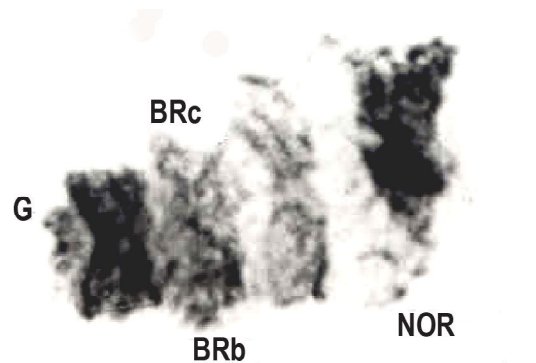


Рис. 6. Активность BRc < BRb в хромосоме G *Chironomus riparius* в F1 и F2 после воздействия Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

Fig. 6. Activity BRc < BRb in the G chromosome of *Chironomus riparius* in F1 and F2 after treatment with Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

- Beermann W. 1971. Effect of L-amanitine on puffing and internucleolar RNA synthesis in *Chironomus* salivary glands // *Chromosoma*. Vol.34. P.152–164.
- Bovero S., Hankeln T., Michailova P., Schmidt E., Sella G. 2002. Nonrandom chromosomal distribution of spontaneous breakpoints and satellite DNA clusters in two geographically distant populations of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) // *Genetica* (Hague). Vol.115. No.3. P.273–281.
- De Flora S., Bagnasco M., Serra D., Zancchi P. 1990. Genotoxicity of chromium compounds. A review // *Mutation Research/ Reviews in Genetic Toxicology*. Vol.238. No.2. P.99–172.
- Duran M., Michailova P., Sari A., Ilkova J., Sen A., Karadurmus E. 2012. Assessment of the sediment toxicity in Bulgarian and Turkish Rivers using the biomarkers in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) // *Acta Zoologica Bulgarica*. Suppl.4. P.167–173.
- Fischer J. 1969. Zur Fortpflanzungsbiologie von *Chironomus nuditarsis* // *Revue Suisse de Zoologie*. Vol.76. P.23–55.
- Golubovskii M.D. 2000. The Century of genetics: Evolution of ideas and concepts. St. Petersburg: Borey Art. 262 p. [In Russian].
- Gunderina L.I., Aimanova K.G. 1998. Genetic consequences of exposure to  $\gamma$ -radiation in *Chironomus thummi*: Aberrations of polytene chromosomes // *Russian Journal of Genetics*. Vol.34. P.273–280.
- Hägele K. 1970. DNA-Replikation muster der Speicheldrüsen Chromosomen von Chironomiden // *Chromosoma*. Vol.31. No.1. P.91–138.
- Il'inskaya N.B. 1982. Metodika opredeleniya vntrivozrastnykh stadii razvitiya i pola u lichinok khironomid // Akhrorov F. (Ed.): *Metodicheskoe posobie po izucheniyu khironomid*. Dushanbe: Donish. P.30–43. [In Russian].
- Ilkova J., Michailova P., Thomas A., White K. 2014. Genome instability of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) from polluted water basins in Bulgaria // *Ecologia Balkanica*. Vol.5. P.1–8.
- Kiknadze I.I., Shilova A.I., Kerkis I.E., Shobanov N.A., Zelentsov N.I., Grebenyuk L.P., Istomina A.G., Prasolov V.A. 1991. Kariotipy i morfologiya lichinok triba Chironomini. Atlas. Novosibirsk: Nauka. 115 p. [In Russian].
- Kiknadze I.I., Istomina A.G., Gunderina L.I., Salova T.A., Aimanova K.G., Savvinov D.D. 1996. Kariofondy khironomid kriolitozony Yakutii: triba Chironomini. Novosibirsk: Nauka. 166 p. [In Russian].
- Keyl H. 1962. Chromosomen evolution bei *Chironomus*. Chromosomenumbauten und phylogenetische Beziehungen der Arten // *Chromosoma*. Vol.13. P.496–541.

- Kiknadze I.I., Istomina A., Goligina V., Gunderina L. 2016. Karyotypes of Palearctic and Holarctic species of the genus *Chironomus*. Novosibirsk: Geo. 490 p.
- King M. 1993. Species evolution the role of chromosome change. Cambridge. University press. 336 p.
- Losi M.E., Amrhein C., Frankenberger W.T. 1994. Environmental biochemistry of chromium // Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Vol.136. P.92–121.
- Makrushin A.V. 1974. Biologicheskii analiz kachestva vod // Vinberg G.G. (Ed.): Trudy Vsesoyuznogo gidrobiologicheskogo obshchestva. Leningrad. 60 p. [In Russian].
- Mc Clintock B. 1968. Genetic systems regulating gene expression during development // Developmental Biology. Supplement. Vol.1. P.84–112.
- Michailova P. 1985. Method of breeding the species from family Chironomidae, Diptera in experimental conditions // Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences. Vol.38. P.1179–1181.
- Michailova P. 1989. The polytene chromosomes and their significance to the systematics of the family Diptera // Acta Zoologica Fennica. No.186. 107 p.
- Michailova P., Petrova N., Sella G., Ramella L., Bovero S. 1998. Structure and functional alterations in chromosome G of *Chironomus riparius* Mg. from a heavy metal polluted area near Turin, Italy // Environmental Pollution (USA). Vol.103. P.127–134.
- Michailova P., Ilkova J. 2013. Polytene chromosomes of Chironomidae family (Diptera) and their significance for a biomonitoring // Michailova P., Grozeva S. (Eds): Genome biomarker test system for environmental risk assessment. Sofia–Moscow, Pensoft. 137 p. [In Bulgarian].
- Michailova P., Petrova N., Bovero S., Ramella L., Sella G. 2000. Effect of environmental pollution on the chromosomal variability of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera, Chironomidae) larvae from two Piedmont stations // Cenetica. Vol.108. P.171–180.
- Michailova P., Petrova N., Sella G., Bovero S., Ramella L., Regoli F., Zelano V. 2001a. Genotoxic effects of chromium on polytene chromosomes of *Chironomus riparius* Meigen 1804 (Diptera, Chironomidae) // Caryologia. Firenze. Vol.54. No.1. P.59–71.
- Michailova P., Ilkova J., Petrova N., White K. 2001b. Rearrangements in the salivary gland chromosomes of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) following exposure to lead // Caryologia. Firenze. Vol.54. No.4. P.349–363.
- Michailova P., Todorova K., White K. 2002. The effect of lead on the salivary gland chromosomes of *Glyptotendipes salinus* Michailova (Chironomidae, Diptera) // Biologia — Section Cellular and Molecular Biology (Bratislava). Vol.57. No.3. P.359–367.
- Michailova P., Ilkova J., White K. 2003. Functional and structural rearrangements of salivary gland polytene chromosomes of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) in response of freshly neutralised aluminium // Environmental Pollution (USA). Vol.123. P.193–207.
- Michailova P., Ilkova J., Hankeln T., Schmidt E., Selvaggi A., Zampicini G., Sella G. 2009. Somatic breakpoints, distribution of repetitive DNA and non-LTR retrotransposones insertion sites in the chromosomes of *Chironomus piger* Strenzke (Diptera, Chironomidae) // Genetica (Hague). Vol.135. P.137–148.
- Michailova P., Sella G., Petrova N. 2012. Chironomids (Diptera) and their salivary gland chromosomes as indicators of trace metal genotoxicology // Italian Journal of Zoology. Vol.79. P.218–230.
- Michailova P., Ilkova J., Dean A., White K. 2015. Cytogenetic index and functional genome alterations in *Chironomus piger* Strenzke (Diptera, Chironomidae) in the assessment of sediment pollution: A case study of Bulgarian and UK rivers // Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 111. P. 220–227.
- Michailova P., Ilkova J., White K. 2016. Implications of Genome alterations in *Chironomus bernensis* Klotzli (Diptera) for assessment of trace metal pollution in two Bulgarian rivers // River Research and Applications. Vol.32. P.914–924.
- Petrova N.A. 1990. Characteristics of the karyotypes of the midges (Diptera, Chironomidae) of the world fauna. II. Subfamily Chironominae // Entomologicheskoe Obozrenie (Entomological Review). Vol.69. No.1. P.139–214. [In Russian].
- Petrova N.A. 2013. Reorganization of polytene chromosomes of chironomid larvae (Diptera, Chironomidae) as a response to mutagenic pollution of environment (Chernobyl ecocatastrophe). St.-Petersburg: Zoological Institute RAS. 98 p. [In Russian].
- Petrova N., Michailova P. 1996. Cytogenetic monitoring of *Chironomus balatonicus* (Diptera, Chironomidae) from the Chernobyl region // International Journal of Dipterological Research. Vol.7. No.2. P.79–86.
- Saether O.A. 1979. Chironomid communities of water quality indicators // Holarctic Ecology. Vol.2. P.65–74.
- Sella G., Bovero S., Ginepro M., Michailova P., Petrova N., Robotti C., Zelano V. 2004. Inherited and somatic variability in Palearctic populations of *Chironomus riparius* Meigen 1804 (Diptera, Chironomidae) // Genome. Vol.47. P.322–344.
- Szarek-Gwiazda E., Michailova P., Ilkova J., Kownacki A., Ciszewski D., Aleksander-Kwaterczak U. 2013. The effect of long-term contamination by heavy metals on community and genome alterations of Chironomidae (Diptera) in a stream with mine drainage water (southern Poland) // Oceanological and Hydrobiological Studies. Vol.42. No.4. P.460–469.
- Toderash I.K. 1984. Funktsional'noe znachenie khironomid v ekosistemakh vodoyomov Moldavii. Kishinev: Shtiintsa. 171 p. [In Russian].
- Todorova J., Mitkova A., Bakalova A., Dolapchiev L., Michailova P. 2000. The effect of Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> on two model species of the family Chironomidae, Diptera - heat shock response and heat shock proteins 70 // Biologia — Section Cellular and Molecular Biology (Bratislava). Vol.55. No.6. P.709–716.
- Vinogradova E.B., Petrova N.A. 2004. The first finding of synanthropic population of *Chironomus riparius* Mg. 1804 (Diptera, Chironomidae) in flooded basements in St. Petersburg and some of its biological and karyological peculiarities // Entomologicheskoe Obozrenie (Entomological Review). Vol.83. No.2. P.334–348. [In Russian].
- Wigglesworth V.B. 1959. The principles of insect physiology. London: Methuen. 200 p.
- Wülker W., Götz G. 1968. Die Verwendung der Imaginalscheiben zur Bestimmung des Entwicklungszustandes von *Chironomus*-Larven (Diptera) // Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere. Bd.62. P.363–388.