

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
ПОПУЛЯЦИИ *CHIRONOMUS RIPARIUS* L. (CHIRONOMIDAE, DIPTERA)  
В РЫБОВОДНОМ ПРУДУ В ПОС. БОРОК ЯРОСЛАВСКОЙ ОБЛ.**

© Н. А. Петрова, С. В. Жиров

Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург

В рыбоводном пруду средней полосы России (пос. Борок, Ярославской обл.) в кариотипе *Chironomus riparius* обнаружены три наследственные инверсии в плечах IA (A3d—B1a), IID (C5a—C6a) и IIIF (B3b—4d/e), увеличение гетерохроматина в дисках плеча IIIF (B3h, B3h + B3c—C1a) и возникновение пuffs в плечах IIС, IID и IIIЕ. Показано, что некоторые точки разрывов инверсий совпадают с сайтами локализации сателлитной ДНК семейства Alu и Hinf. Отмечены также изменения функциональной активности ядрышкового организатора и колец Бальбиани.

**Ключевые слова:** *Chironomus riparius*, полиморфизм, изменчивость ядрышка и колец Бальбиани.

**Принятые сокращения:** BRc/BRb — кольцо Бальбиани с/кольцо Бальбиани b, N — ядрышко.

*Chironomus riparius* — эвритопный вид, распространенный во всех типах пресноводных водоемов. Он играет важную роль в процессах самоочищения водоемов и переработки детрита в пищевых цепях (Макрушин, 1974; Балушкина, 1987). Его повсеместное распространение, массовость и доступность при сборах явились предпосылкой активного и разнообразного изучения. Кроме того, это один из немногих видов хирономид, который не только обитает в водоемах разной степени трофности, но и может легко разводиться в лабораторных условиях, его культура легко поддерживается в течение многих лет. На этом объекте было показано, что политенные хромосомы хирономид более чувствительны к загрязнению тяжелыми металлами, чем внешняя морфология личинки (Michailova et al., 1996, 1998, 2001a, 2001b). Были установлены генотоксичные вредные воздействия таких металлов, как Cr, Pb, Al и Cu, на политенные хромосомы *Ch. riparius*. Это выражалось в большей частоте наследственных и соматических нарушений хромосом по сравнению с контрольными личинками. Pb, например, вызывал возникновение специфичной активности хромосом — так называемых пuffs (Michailova et al., 2001a), которые отсутствовали как в контроле, так и у личинок, подвергаемых воздействию Al, Cu или Cr. Эти металлы изучали как возможную причину хромосомных нарушений, которые могут служить чувствительными маркерами токсичных загрязнений донных осадков тяжелыми металлами (Bisthoven, Ollevier, 1998). Были обнаружены структурные перестройки по инверсиям, нехваткам (делециям или дефишнсам), по увеличению гетерохроматиновых дисков, деконденсации центромерного гетерохроматина и др. (Michailova et al., 1996, 1998, 2001a, 2001b). Перестройки встречались как наследственные, так и соматические. Были получены функциональные отклонения в работе как ядрышка, так и колец Бальбиани (Michailova et al., 1996, 1998, 2001a, 2001b; Петрова и др., 2004). В результате го-

мозиготной делеции, включающей в себя BRc и BRb и прилегающий к ним срединный участок хромосомы IVG, она превращалась в «помпоноподобную структуру» (Michailova et al., 1996; Петрова и др., 2004). Параллельно обнаружили нарушения ротового аппарата у личинок *C. riparius* — антенн, премандибул, ментума, мандибул и др. (Michailova et al., 1996, 1998, 2001a, 2001b; Томилина и др., 2003).

Нами были исследованы личинки из водоема, находящегося на территории Института биологии внутренних вод РАН и предназначенного для разведения и кормления рыбы. Задача нашего исследования — изучить цитогенетическую характеристику популяции *Ch. riparius*, обитающей в рыбоводном пруду, и сравнить полученные данные с данными по другим популяциям, обитающим в водоемах, загрязненных тяжелыми металлами.

### Материал и методика

Личинки *Ch. riparius* были собраны непосредственно из водоема и зафиксированы стандартным способом (3 части 96%-ного спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты). Материал хранили в холодильнике. Проанализировали 20 (14 ♂ : 6 ♀) личинок: из каждой личинки были приготовлены энтомологические препараты, подтверждающие их видовую принадлежность. Для кариотипирования использовали личинок 4-й стадии с хорошо развитыми грудными сегментами. Анализ политенных хромосом проводили на препаратах, полученных хромосомам проводили на препаратах, полученных ацетоорсениновым методом. Часть временных препаратов переведена в постоянные.

В работе использованы обычные хромосомные карты (Hagelé, 1970; Кикнадзе и др., 1991). Системы колец Бальбиани и ядрышка рассмотрены соответственно номенклатуре, предложенной Кикнадзе (1976, 1978).

Идентификацию степени активности ядрышка и кольца Бальбиани проводили в соответствии с номенклатурой, предложенной Берманом (Beermann, 1971). Различали три степени активности N, BRb и BRc: нормальную (++) , среднюю (+) и слабую или совсем депрессированную (−). Обозначения всех встреченных вариантов функциональной активности N и отношений разной степени активности BRc/BRb и их расшифровка приведены в подписях к рисункам. Следует отметить, что из трех BRs наше внимание было обращено исключительно на изменения активности BRc и BRb, так как BRa было активно только в четырех клетках специальной доли слюнной железы; эти данные мы не учитывали. Частоты встречаемости изменений функциональной активности N и BRc/BRb рассчитаны как отношение числа клеток с функциональными изменениями к общему числу проанализированных клеток. Для этих целей в исследованной популяции проанализировано 297 клеток. Вид идентифицирован авторами по морфологии и кариотипу.

## Результаты и обсуждение

Кариотип *Ch. riparius* имеет  $2n = 8$ . Комбинация хромосомных плеч в кариотипе — AB, CD, EF и G (thumbi-комплекс) (рис. 1). Центромерные районы четко обозначены в виде гетерохроматиновых утолщений (на

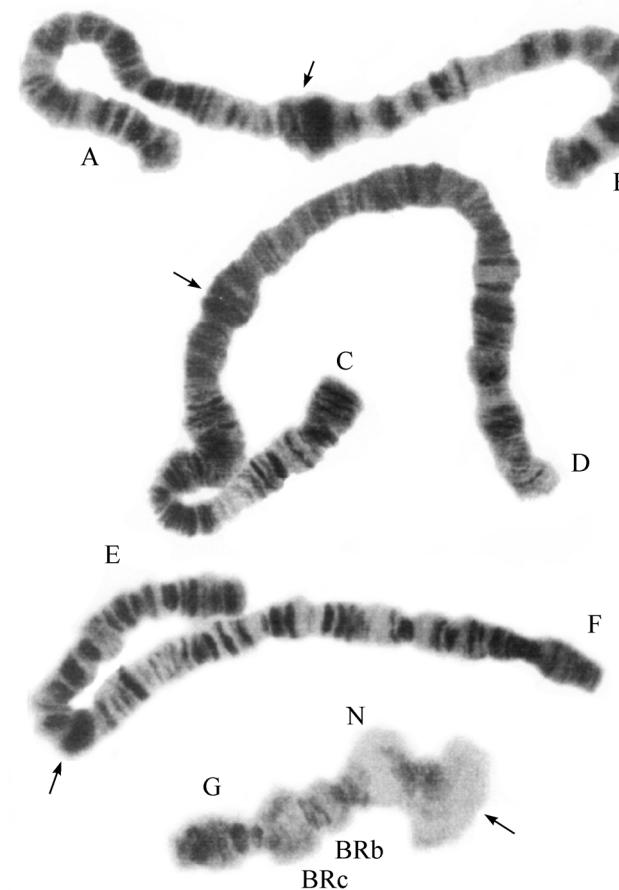


Рис. 1. Политенные хромосомы *Chironomus riparius* ( $2n = 8$ ). A—G — плечи хромосом, N — ядрышковый организатор, BR — кольцо Бальбиани. Стрелками указаны центромерные районы.

рис. 1, указаны стрелками). Активные локусы N, BRc и BRb локализованы в хромосоме IVG.

Изменчивость политетных хромосом. В проанализированной популяции обнаружены три гетерозиготные инверсии. Все инверсии наследственные и находятся в разных плечах — A (A3d—B1a), D (C5a—C6a) и F (B3b—4d/e). Инверсии короткие, парацентрические. Частота их встречаемости очень низка. Уровень инверсионной гетерозиготности популяции равен 15 %, среднее число инверсий на особь — 0.15.

Наблюдалась вариабельность функциональной активности отдельных участков хромосом. В исследованной популяции активность N от особи к особи проявлялась в трех разных состояниях — в максимальном (++) , среднем (+) и гетерозиготном (+−) (рис. 2). Наиболее часто встречалось N в максимальном состоянии (68 %), в этом случае оба гомолога несли одинаковую максимальную нагрузку. При среднем значении оба гомолога несли пониженную нагрузку, таких клеток было 29.3 %, а всего 2.7 % клеток с гетерозиготным N (рис. 2).

Функциональная активность BRc/BRb проявлялась в девяти разных состояниях (рис. 3). BRc/BRb колеблется от максимальной (34.3—11.7 % клеток) до минимальной (0.6—3.0 %), включая средние значения (9.4—4.7 %). Наиболее высокую значимость имеют клетки со средней активностью BRc/BRb (++ — 34.3 %), затем при гетерозиготном значении BRc/BRb (+++ — 24.2 %), и только на третьем месте стоят клетки, у которых размер отношения колец Бальбиани максимальный (++/++ — 11.7 %) (рис. 3).

Наблюдалось увеличение гетерохроматина по сравнению с нормой в плече F в дисках B3h и B3h + B3c—C1a. Это изменение не наследственное, оно коснулось только 52 клеток в популяции. Амплификацию дисков можно разделить на три группы. В первой группе находятся 45 клеток (15.0 %), у которых в хромосомах III диск B3h значительно увеличен в размерах. Ко второй группе принадлежат 15 клеток (5 %), имеющие незначительное увеличение участка B3h, при этом в четырех ядрах этот диск был в гетерозиготном состоянии. И в третью группу попадают 37 клеток (12.3 %), у которых хромосомы имеют сильно измененный в размерах участок, состоящий из целого блока дисков B3h + B3c—C1a.

Кроме того, были обнаружены соматические пuffs, которые обычно у вида неактивны: в плече C — теломерный A1d (0.01 %) и около центромеры C2j (0.01 %), в плече D — около центромеры C4cb (0.03 %) и в плече E — интеркалярный в участке A5c (0.03 %).

Таким образом, в исследованной популяции *Ch. riparius* ( $2n = 8$ ) обнаружены три типа инверсий, выделены три группы особей, различающиеся по количеству facultативного гетерохроматина в плече F, а также обнаружена изменчивость функциональной активности NOR, BR и отдельных пuffs. С одной стороны, принимая во внимание число хромосом ( $2n = 8$ ) и структуру кариотипа, можно говорить, что популяция из пос. Борок относится к виду *Ch. riparius*; с другой стороны, проанализированная популяция имеет ряд существенных отличий от других популяций. Так, например, в природной популяции из подвала одного из жилых домов Санкт-Петербурга обнаружено 14 типов наследственных и 2 соматические гетерозиготные инверсии, в популяции из Болгарии, наоборот, преобладали 29 соматических гетерозиготных пара- и перицентрических инверсий и 1 наследственная инверсия (Петрова и др., 2004). Популяция из пос. Борок

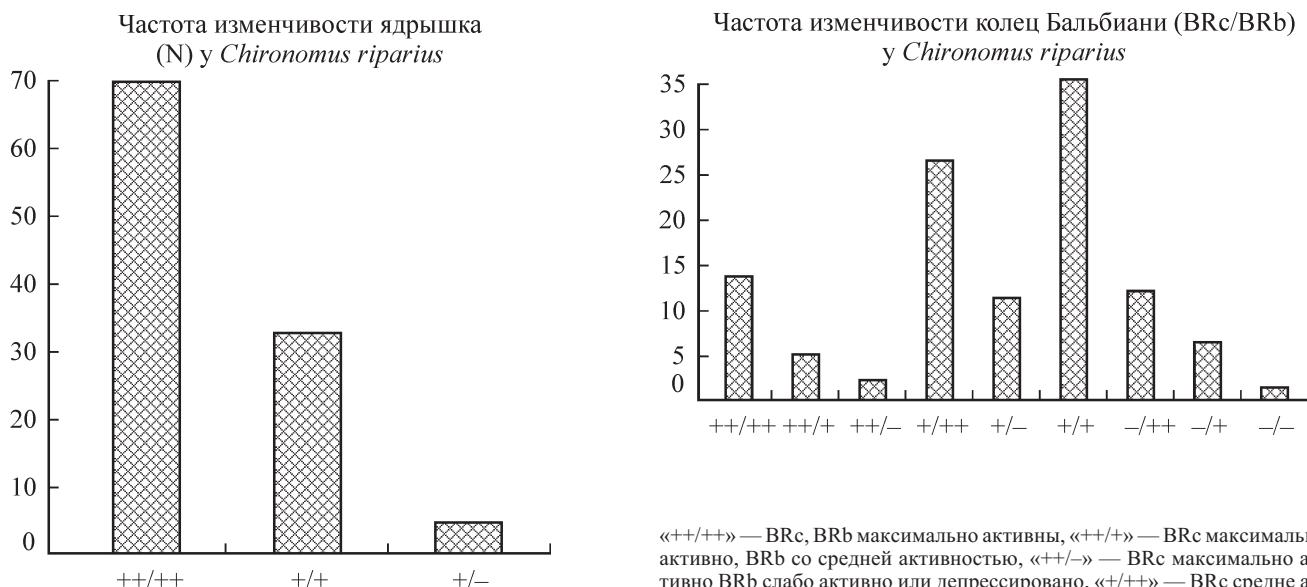


Рис. 2. Активность (в %) ядрышкового организатора *Chironomus riparius*.

$\langle\langle++/\rangle\rangle$  — максимальная активность в обоих гомологах,  $\langle\langle+/+\rangle\rangle$  — средняя активность в обоих гомологах,  $\langle\langle+/-\rangle\rangle$  — средняя активность у одного гомолога, слабая или отсутствующая у другого.

имеет всего три наследственные инверсии, соматических инверсий не обнаружено. Исследованная популяция, скорее всего, характеризуется нормальными условиями обитания, поэтому обнаружено небольшое количество аберраций. Мы предполагаем, что во всех вышеуказанных популяциях инверсии, вероятно, играют адаптивную роль. По литературным данным, вид таким образом приспособливается к разнообразным условиям существования, и в каждом биотопе значительную роль играют определенные инверсии (Ильинская и др., 1996).

В плече F в районе B3b—B4d/c обнаружены высокоповторяющиеся последовательности сателлитной ДНК, так называемые элементы Alu и Hinf (Bovero et al., 2002). Именно в этом участке исследованного вида в плече F произошла и зафиксирована инверсия B3b—B4d/c. Это указывает на то, что некоторые высокоповторяющиеся элементы ДНК могут играть важную роль в возникновении хромосомных аберраций.

В настоящее время изучено около двух десятков популяций *Ch. riparius*. В популяции этого вида не было обнаружено полиморфизма по прицентромерному гетерохроматину. В то же время это явление обычно для популяций модельного вида *Ch. plumosus* (Кикнадзе, Сирин, 1991; Ильинская, 1993). Возможно, *Ch. riparius* располагает более стабильным кариотипом, чем *Ch. plumosus*.

В исследованной популяции преобладает максимальная активность ядрышка (68 %), средняя активность (29.3 %) встречалась в 2.5 раза реже. Поскольку личинки обитают в чистом пруду, мы праве думать, что ядрышко в 70 % случае функционирует в пределах нормы.

Основной пик активности BRc/BRb приходится на среднюю (+/+) активность, она равна 34.3 %. В болгарской популяции наблюдалась средняя активность более чем у 50 % проанализированных клеток (Петрова и др., 2004). В популяции из пос. Борок отмечена группа клеток, у которых BRc/BRb гетерозиготно (+/++); BRc нормально (24.2 %), а BRb максимально активно. И только у 11.7 % клеток BRc/BRb максимально активны. В том слу-

$\langle\langle++/\rangle\rangle$  — BRc, BRb максимально активны,  $\langle\langle+/+\rangle\rangle$  — BRc максимально активно, BRb со средней активностью,  $\langle\langle+/-\rangle\rangle$  — BRc максимально активно BRb слабо активно или депрессировано,  $\langle\langle+/\rangle\rangle$  — BRc средне активно, BRb максимально активно;  $\langle\langle-/+\rangle\rangle$  — BRc средне активно или депрессировано;  $\langle\langle+/-\rangle\rangle$  — BRc, BRb со средней активностью;  $\langle\langle-/+-\rangle\rangle$  — BRc слабо активно или депрессировано, BRb максимально активно;  $\langle\langle-/-\rangle\rangle$  — BRc, BRb слабо активны или депрессированы.

чае, когда BRb максимально активно (46.0 %) или средне активно (52.0 %), мы, как правило, наблюдали BRc слабо функционирующими или совсем неактивным (14.8 %). В некоторых случаях зависимость была обратной, средняя активность BRc коррелировала с отсутствием активности BRb (9.4 %). Вероятно, в пруду имеются какие-нибудь растворенные вещества, и *Ch. riparius*, чувствительный ко всякого рода загрязнениям, отвечает на их присутствие средней активностью колец Бальбиани.

У *Ch. riparius* обнаружена амплификация отдельных дисков и группы дисков в хромосоме III. Это нередкое явление у данного вида. В любой популяции обязательно происходит увеличение диска или группы дисков в ответ на малейшее загрязнение (Michailova et al., 1996, 1998, 2001a, 2001b). В исследованной популяции увеличение гетерохроматиновых дисков происходит неравномерно, а клетки можно разделить на три группы: очень крупный диск B3h, промежуточный, менее крупный, включая гетерозиготный диск B3h, и группа дисков B3h + B3c—C1a. Такая же картина обнаружена в итальянских, болгарских и русских популяциях (Michailova et al., 2001a, 2001b; Петрова и др., 2004). Это подтверждает высказанную ранее гипотезу о том, что причиной этого феномена может быть неравный соматический кроссинговер или локальная соматическая дупликация (Sella et al., 2002).

У *Ch. riparius* в плечах C, D и E были выявлены новые теломерные, околоцентромерные и внутрихромосомные пуффы, не обнаруженные в норме. Из литературных данных известно, что при воздействии некоторых химических веществ усиливается синтез эволюционно консервативных белков, так называемых HSP (heat shock proteins) (Barettino et al., 1988). Они выступают как защитный механизм, чтобы клетка и организм в целом выжили в неблагополучных условиях. На цитологическом уровне это выражается в появлении новых специфических пуффов, характеризующихся высокой транскрипционной активностью и морфологически сходных с BR (Barettino et al., 1988). Возможно, и здесь начинает функционировать подобная система.

В заключение хочется подчеркнуть, что геном *Ch. riparius* обладает высокой чувствительностью к экологическим условиям обитания и может использоваться как биоиндикатор загрязнения вод и донных отложений. Об этом можно судить по степени активности BRc/BRb, амплификации дисков и возникновении новых пuffs. Эта система реагирует даже на незначительные загрязнения, в то время как остальные значимые признаки кариотипа остаются в пределах нормы.

Выражаем благодарность Л. П. Гребенюк за предоставление материала для цитогенетического исследования и Н. С. Хабазовой за помощь в оформлении рукописи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48387) и программы президиума РАН «Динамика генофондов животных, растений и человека».

#### Список литературы

- Балушкина Е. В. 1987. Функциональное значение личинок хирономид континентальных водоемов. Л.: Наука. 180 с.
- Ильинская Н. Б. 1993. Полиморфизм прицентромерных гетерохроматических районов политетенных хромосом слюнных желез личинок природной популяции хирономуса *Chironomus plumosus*. Цитология. 36 (11/12) : 79—85.
- Ильинская Н. Б., Петрова Н. А., Матена И. 1999. Зависимость уровня инверсионного полиморфизма от типа водоема, сезона и года наблюдений у мотыля *Chironomus plumosus* L. (Diptera, Chironomidae). Генетика. 35 (8) : 1061—1070.
- Кикнадзе И. И. 1976. Сравнительная характеристика пuffинга в хромосомах слюнных желез *Chironomus thummi* в личиночном развитии и при метаморфозе. I. Пuffинг в хромосоме IV. Цитология. 18 (11) : 1322—1329.
- Кикнадзе И. И. 1978. Сравнительное изучение картины пuffинга в хромосомах слюнных желез *Chrinomus thummi* в личиночном развитии и при метаморфозе. II. Картина пuffинга в хромосомах I, II, III. Цитология. 20 (5) : 514—521.
- Кикнадзе И. И., Сирин М. Т. 1991. Полиморфизм прицентромерного гетерохроматина у комара-хирономуса *Chironomus riparius*. Цитология. 33 (3) : 60—67.
- Кикнадзе И. И., Шилова А. И., Керкис И. Е., Шобанов Н. А., Зеленцов Н. И., Гребенюк Л. П., Истомина А. Г., Просолов В. А. 1991. Кариотипы и морфология личинок трибы Chironomini. Атлас. Новосибирск: Наука. 115 с.
- Макрушин А. В. 1974. Биологический анализ качества вод / Под ред. Г. Г. Винберга. Ч. 1. Л.: Изд-во АН СССР. Зоол. ин-т. Всесоюз. гидробиол. о-во. 60 с.
- Петрова Н., Михайлова П., Илкова Ю. 2004. Сравнительно-цитогенетическая изменчивость политетенных хромосом слюнных желез *Chironomus riparius* Mg., 1804 (Diptera, Chironomidae) из двух загрязненных биотопов Болгарии и России. Генетика. 40 (1) : 49—58.
- Томилина И. И., Михайлова Л. В., Гребенюк Л. П., Рыбина Г. Е., Симаков Ю. Г. 2003. Влияние нефтепродуктов на личинок комаров рода *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). Биол. внутр. вод. 2 : 100—106.
- Barettino D., Morcillo G., Diez J. 1988. Induction of the heat shock response by carbon dioxide in *Chironomus thummi*. Cell Differ. 23 : 23—36.
- Beermann W. 1971. Effect of L-amanitine on puffing and intra-nucleolar RNA synthesis in *Chironomus* salivary glands. Chromosoma. 34 : 152—164.
- Bisthoven L. J., Ollevier D. V. 1998. Experimental induction of morphological deformities in *Chironomus riparius*. Larvae by exposure to copper and lead. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 35 : 245—256.
- Bovero S., Hankeln Th., 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). Generica. 115 : 273—281.
- Hagele K. 1970. DNA-replikationsmuster der speicheldrusen Chromosomen von chironomiden. Chromosoma. 31 : 91—138.
- Michailova P., Ilkova J., Petrova N., Wite K. 2001a. Rearrangements in the salivary gland chromosomes *Chironomus riparius* Mg (Diptera, Chironomidae) following exposure to lead. Caryologia. 54 : 349—363.
- Michailova P., Petrova N., Ramella L., Sella G., Zelano F. 1996. Cytogenetic characteristics of a population of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera, Chironomidae) from polluted Po river station. Genetica. 98 : 161—178.
- Michailova P., Petrova N., Sella G., Bovero S., Ramella L., Regoli Z., Zelano V. 2001b. Genotoxic effects of chromium on polytene chromosomes of *Chironomus riparius* Meigen, 1804 (Diptera, Chironomidae). Caryologia. 54 : 59—71.
- Michailova P., Petrova N., Sella G., Ramella L., Bovero S. 1998. Structural functional rearrangements in chromosome G in *Chironomus riparius* Meigen (Diptera, Chironomidae) collected from a heavy metal polluted area near Turin, Italy. Environ. Poll. 103 : 127—135.
- Sella G., Robotti S., Michailova P., Ramella L. 2001. Repetitive DNA size variation in three sections of the chromosome EF in a population of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) from Piedmont (Italy). Caryologia. 54 : 155—160.

Поступила 4 IV 2007

#### GYTOGENETICS OF CHIRONOMUS RIPARIUS L. FROM THE FISHPOND IN BOROK VILLAGE (DIPTERA, CHIRONOMIDAE)

N. A. Petrova, S. V. Zhirov

Zoological Institute RAS, St. Petersburg

We have found three inherited inversions in *Chironomus riparius* populations from the Borok fishpond, namely: (A3d—B1a) in the arm A (C5a—C6a) in the arm D and (B3b—4d/e) in the arm F. Increase of heterochromatin in some bands of chromosome F (B3h, B3h + B3c—C1a) and puffs appearance in the arms C, D and E have been observed. We saw also changes in functional activity of nucleolar organizer (N) and Balbiani rings (BRc/BRb). It has been found that some of inversion breakpoints coincide with the Alu and Hinf satellite DNA localization sites.

**Key words:** *Chironomus riparius*, polymorphism, variability of nucleolus, Balbiani rings.