

Структурно-функциональные изменения политенных хромосом *Chironomus riparius* из водоемов Италии, загрязненных тяжелыми металлами

Н. А. ПЕТРОВА¹, П. В. МИХАЙЛОВА², Г. СЕЛЛА³, Л. РАМЕЛЛА³,
С. БОВЕРО³, В. ЗЕЛАНО³, Ф. РЕГОЛИ⁴

Зоологический институт РАН, С.-Петербург, Россия,

Институт зоологии БАН, София, Болгария,

Туринский университет, Турин, Италия,

Пизанский университет, Пиза, Италия

АННОТАЦИЯ

Изучены политенные хромосомы *Chironomus riparius* из водоемов Северной Италии, загрязненных тяжелыми металлами (Cd, Cu, Zn, Pb, Cr, Mn, Fe). Обнаружен высокий уровень структурных изменений хромосом: гетерозиготные пара- и перицентрические инверсии, делеции, дефишенсы, гетерозиготность по дискам, включая центромерные, увеличение толщины некоторых интеркалярных дисков, асинхронизм гомологов. Кроме этого, наблюдалась значительная функциональная изменчивость пuffedов, колец Бальбиани, ядрышка (гетерозиготность, экс- и депрессия), а также появление нетипичных пuffedов и псевдопuffedов. Отмечено появление соматических мозаиков по пара- и перицентрическим инверсиям, дефишенсам и гетерозиготным дискам и кольцам Бальбиани. Появление “помпоноподобной” хромосомы YUG предлагается рассматривать в качестве цитогенетического маркера стрессовой ситуации в окружающей среде.

Загрязнение континентальных водоемов, как результат промышленной, бытовой и сельскохозяйственной деятельности человека, увеличивается из года в год и становится одной из наиболее серьезных проблем не только для всего человечества, но для всего сообщества на Земле [1, 2]. Необходимо проводить мониторинг состояния окружающей среды с использованием разных биологических тест-систем. В качестве таких систем можно использовать разнообразные виды водных беспозвоночных, в частности распространенные и массовые виды хирономид, которые доступны для сборов и исследований. Путем многолетнего и разностороннего изучения таких видов можно выявить не только разные морфологические деформации тела и головных структур у видов-индикато-

ров, но и изменчивость в структуре и функционировании политенных хромосом особи в ответ на различные загрязнения окружающей среды. Неблагоприятные условия окружающей среды, такие как загрязнение тяжелыми металлами, вызывают разные структурные перестройки в политенных хромосомах личинок хирономид или индуцируют изменения в транскрипционной активности пuffedов, колец Бальбиани (BR) и ядрышек. У хирономид в кольцах Бальбиани находятся гены, кодирующие синтез тканеспецифических секреторных белков [3–6]. В хромосомах нормально развивающихся личинок наблюдается несколько взаимозаменяющихся пuffedов, индуцируемых гормоном экдиозоном, контролирующим развитие и линьку насекомых [7]. При стрессовых условиях обита-

ния в хромосомах появляются новые пуффы, изменяется активность колец Бальбиани, поскольку они особенно чувствительны к необычным ситуациям в окружающей среде [3, 8, 9]. Именно в стрессовых условиях система колец Бальбиани может либо совсем не работать и даже исчезнуть, либо проявить высокий уровень экспрессии [4, 8, 10, 11].

Chironomus riparius хорошо изучен в разных аспектах. В настоящее время он широко используется как тест-объект при исследовании влияния токсичных химических веществ на организм [12–14]. Цитогенетическое изучение природных популяций этого вида в течение нескольких лет позволяет выяснить не только тип изменений, возникающих в политенных хромосомах, но и проследить их судьбу на протяжении нескольких десятков поколений. Более того, такие исследования позволяют выяснить, насколько эти изменения хромосом связаны с экологией и представляют одну из ступеней адаптивного механизма популяций к внешней среде или они могут рассматриваться как "пусковой механизм антропогенной эволюции" в связи с микродифференциацией популяции.

Целью настоящей работы является изучение влияния тяжелых металлов (Cd, Cu, Zn, Pb, Cr, Mn, Fe) на политенные хромосомы *C. riparius*. Личинки этого вида собраны в водоемах Северной Италии. В статье приводятся данные о концентрации металлов в водоемах, о структурных перестройках политенных хромосом и функциональных изменениях отдельных локусов хромосом. Особое внимание обращается на явление соматического мутагенеза, обнаруженного в исследованных выборках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Кладки яиц *C. riparius* собраны в реке По, ст. Монкальери, в окрестностях Турина в ноябре 1994 г. В лаборатории куколки и имаго выведены по методике Михайловой [15]. Вид определен по имаго и кариотипу политенных хромосом из клеток слюнных желез личинки [16, 17]. Для цитогенетических исследований фиксировали личинок 4-й стадии (7–8-я фаза). Проанализировано 56 особей (38 самок, 9 самцов, у 9 особей пол не определен). Второй сбор был сделан недалеко от первого в р. Банна,

ст. Сантена в июне 1995 г. Личинок фиксировали на месте сбора жидкостью Кларка (3 части 96° спирта: 1 часть ледяной уксусной кислоты). Исследовано 57 личинок (22 самки, 29 самцов, у 6 особей пол не определен). Исследовали только личинок 4-й стадии. Анализ политенных хромосом проводили на препаратах, полученных ацетоорсеиновым методом. Часть временных препаратов переведена в постоянные.

Использованы хромосомные карты Hagele [16] и Кикнадзе с соавторами [17]. Система пуффов и колец Бальбиани рассмотрена соответственно номенклатуре, предложенной Кикнадзе [18, 19]. Отмечали три уровня активности BR: максимальную (++), среднюю (+) и слабую или совсем отсутствующую (–) (по [20]). Для этой цели исследовали 383 клетки. Для подсчета эктопических контактов между хромосомами исследовано 250 клеток. Обнаруженные в выборках инверсии оказались либо наследственными, они присутствовали во всех клетках особи (см. табл. 2), либо соматическими, они возникали у части клеток слюнной железы (см. табл. 3). Число клеток с такими инверсиями колебалось от 1 до 13 у одной личинки. Частоты встречаемости особей с инверсиями рассчитаны от общего числа просмотренных личинок. Нами предложено последовательное обозначение инверсий в каждом плече хромосом набора, начатое Беляниной и Полукановой [21]. Полученные данные частично опубликованы [22, 23].

Сделан анализ содержания тяжелых металлов в донных отложениях исследованных водоемов и в личинках из ст. Сантена (см. табл. 1). В качестве контроля использовано оз. Праростино из Северной Италии. Концентрация тяжелых металлов (Zn, Cr, Mn, Fe, Cd, Cu, Pb) в озере оказалась ниже допустимой границы [24], что и предопределило выбор.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрация Cr в донных отложениях ст. Сантена летом 1995 г. по сравнению с контролем превышает в 5,3 раза, Cu и Cd – почти в 2 раза, Pb – в 0,73 раза концентрацию тех же металлов в Праростино (табл. 1). Концентрация Zn, наоборот, в 0,91 раза оказалась ниже, чем в контрольном водоеме. Если же сравним

концентрацию металлов в личинках, то увидим, что последние из Сантена содержат Pb (в 1,7 раза), Zn (в 1,8 раза), Cr (6,1 раза) больше, а Cu (в 2 раза), Mn (в 3,3 раза) и Cd (в 6 раз) меньше, чем в контроле (см. табл. 1). В Монкальери осенью 1994 г. концентрация Cr, Cu и Cd превышала допустимую норму этих металлов в водоемах. Пестициды в донных отложениях не обнаружены.

Cironomus riparius имеет $2n = 8$, комбинация плеч АВ, CD, EF и G. Центромерные районы гетерохроматизированы и хорошо морфологически выражены. Плечо G имеет три BR: BRa, BRb, BRc и ядрышковый организатор (N). В обеих выборках не оказалось ни одной личинки со стандартным кариотипом. Обнаружены различные хромосомные перестройки: гетерозиготные пара- и перичентрические инверсии, делеции, дефишенсы, хромосомные фрагменты, гетерозиготность по дискам, в том числе центромерным. Также обнаружены особи, мозаичные по инверсиям, дефишенсы, гетерозиготным дискам и пуффам. Наблюдали значительные отклонения от стандарта и в функциональной активности хромосом.

Плечо А. Выборка из Монкальери

Высокая функциональная активность отмечена в следующих сайтах: A1a,j, B2ac, B3ab, B4ac, C2gh. Более того, центромерный район очень часто напоминает пуфф (12,5 % особей). Иногда он бывает в гетерозиготном состоянии. При этом феномен проявляется не во всех клет-

ках. В одной клетке около плеча А обнаружен хромосомный фрагмент, подобно обнаруженным у того же вида после облучения [25]. Инверсии в этом плече не найдены. Теломера плеча А часто (53 %) участвовала в эктопических контактах с теломерами других хромосом.

Выборка из Сантена

Высокая функциональная активность отмечена в тех же участках, что и в Монкальери: B2c, B3, B4a-g, C2fg, включая теломеру A1ab. Гетерозиготные диски появлялись в участках A1e,g, B2b,d,f,h, B4d,f,h, C2e. Центромерный район иногда приобретал морфологию пуффа. Отмечено 5 соматических гетерозиготных инверсий, одна из них перичентрическая (см. табл. 3).

Плечо В. Выборка из Монкальери

Плечо характеризуется высокой функциональной активностью, с образованием пуффов в секциях E2f, E3h, F4hi-j, G1h-l, G2b-d, G3a, G3op. По сравнению со стандартом [16, 17] теломера часто проявляется в виде фибрилл или гранул. Гетерозиготность по дискам отмечена в следующих районах: D3d, F4fg и G1g. Обнаружено 4 наследственные инверсии, из них gir B1.11 встречалась чаще других (табл. 2). Теломера В в 51 % учитываемых клеток участвовала в эктопических контактах с теломерами других хромосом.

Т а б л и ц а 1
Содержание (Mg/ml) тяжелых металлов в грунтах разных водоемов и личинках, обитающих в этих грунтах

Водоем	Число (N) проб	Cr	Cu	Mn	Cd	Zn	Pb	Fe
<i>Осень, 1994</i>								
Праростино, контроль, грунт	–	21,03 ± 1,6	8,27 ± 1,4	–	0,06 ± 0,02	82,6 ± 12,9	3,03 ± 0,5	–
Монкальери, грунт	–	150,1 ± 16,0	23,2 ± 3,0	–	0,11 ± 0,02	98,8 ± 15,0	3,3 ± 1,0	–
<i>Лето, 1995</i>								
Праростино, контроль, грунт	4	22,45 ± 1,6	8,45 ± 0,74	359,5 ± 12,66	0,055	123,37 ± 57,5	2,62 ± 0,496	4,1
Праростино, контроль, личинки (20 mg)	4	5,67 ± 1,65	39,97 ± 5,68	70,36 ± 13,79	1,8	94,37 ± 41,72	4,7	5450,9
Сантена, грунт	3	112,7	19,27	416	0,10	75,5	4,13	15000
Сантена, личинки	1	35,7	21,15	20,08	0,34	173,5	7,95	–

Выборка из Сантена

Пуффирование отмечено в участках: F4h-l, G1e, h-k, G2b-k, включая теломеру G3ор. Гетерозиготные диски: E2d, g, l, n, F2a-e; асинапсис наблюдался в участке: F2e-F2k. Обнаружено 4, иные по сравнению с Монкальери, наследственные гетерозиготные инверсии (см. табл. 2) и 3 соматические с невысокой частотой (табл. 3).

Плечо С. Выборка из Монкальери

Наблюдается значительная функциональная активность в секциях A1a, A2d, A3ab, B3i, B4f, B5e, i, которые морфологически напоминали пуффы разных размеров. Теломера иногда приобретает вид гранулярной структуры.

Т а б л и ц а 2

Локализация и типы наследственных гетерозиготных инверсий хромосом I, II и III в природной популяции *Chironomus riparius* из ст. Монкальери и ст. Сантена

Обозначение инверсий	Границы инверсий	Частоты встречаемости	
		Монкальери	Сантена
B1.8	E1c-E2c	1,78	–
B1.9	E1c-E3f	1,78	–
B1.10	E2l-E3e	–	5,7
B1.11	F2f-F3e	10,7	–
B1.12	F2i-F4d	–	1,9
B1.13	F3c-F3h	–	1,9
B1.14	F4a-F4f	3,56	–
B1.15	F4d-G1d	–	9,5
C1.5	B4a-B4n	3,56	–
C1.6	B5a-C2l	–	3,8
C1.7	B5a-C1d	–	5,7
D1.5	C6a-C6e	1,78	–
D1.6	E1k-E2d	1,78	–
E1.6	A3d-B1r	–	3,8
E1.7	B1c-B1o	–	13,3
F1.5	B3a-B4d	–	3,8
F1.6	B3c-B3h	–	9,5
F1.7	B3d-C1a	–	1,9
F1.8	B3i-B3o	5,34	–
F1.9	B3j-C1e	–	1,9
F1.10	B4d-C3d	–	9,5
F1.11	C2a-C3d	–	3,8
F1.12	C2a-C4f	–	3,8
F1.13	C3d-C4d	–	1,9

Гетерозиготное состояние дисков в секции B5р сочеталось с наличием гетерозиготной инверсии gir C1.5 в этом плече. Последняя найдена только у двух особей (см. табл. 2). Центромерный гетерохроматин часто проявлялся в гетерозиготном состоянии. Теломера плеча С участвовала в эктопических контактах (38 %) с теломерами других хромосом набора.

Выборка из Сантена

Функциональная активность отмечена в участках A1a-c, A3e, B4m-s, включая районы теломеры и центромеры. Гетерозиготные диски появлялись в участках B3-4, C3a-e, включая центромеру (см. рисунок). Отмечены также гетерозиготная дефиценсия теломерного диска, асинапсис в участке B3-B4 и 4 гетерозиготные инверсии (см. табл. 2, 3), 2 из которых с соматическим проявлением.

Плечо D. Выборка из Монкальери

Наблюдалась высокая функциональная активность в участках C4ab, C5ab, D2a, d, f, D4ab, E2f, E3b, E4b, F1g и F2no. Как и в хромосоме АВ, центромерный район часто находился в деконденсированном состоянии. У 8,92 % особей он был особенно активен, приобретая вид хорошего пуффа. Гетерозиготность дисков в секциях C4e, D3a и D3e характеризуется мозаичным проявлением. Обнаружены две гетерозиготные инверсии (см. табл. 2) и одна с мозаичным проявлением (см. табл. 3). Теломера плеча D реже предыдущих теломер (36 %) участвовала в эктопических контактах с теломерами других хромосом.

Выборка из Сантена

Функциональная активность наблюдалась в C4c,f и E2c. Гетерозиготность по дискам C4e, C5gh, C6a-e проявлялась не во всех клетках особи. Асинапсис отмечен в участке C5g-C6i. Обнаружены только соматические гетеротипные инверсии (см. табл. 3).

Плечо E. Выборка из Монкальери

Наблюдается высокая функциональная активность в секциях A1a,e, A2f,j, A3ab, A4b, A5c, B2a-d. Диски в секции A2a-c часто находи-

лись в гетерозиготном состоянии. Две особи характеризовались асинопсисом в секциях А2-3, А3-В2b. Гетерохроматин центромеры часто проявлялся в виде пуффа или находился в гетерозиготном состоянии. У одной особи наблюдали дефиценсы мозаичного проявления. Теломера плеча Е в 23 % клеток участвовала в эктопических контактах с теломерами других хромосом.

Выборка из Сантена

Высокая функциональная активность отмечена в участках А2-3, А4а-d, А5а-с, асинопсис – в участках А2g-l и В1-2. Гетерозиготное состояние центромерного гетерохроматина и дисков В1h,l,m,g характеризовалось соматическим проявлением. Две наследственные (см. рисунок, б, табл. 2) и 5 соматических (см. табл. 3) гетерозиготных инверсий локализованы у основания плеча, возле центромеры, среди последних, три – перичентрические (см. табл. 3).

Плечо F Выборка из Монкальери

Функциональная активность в этом плече проявлялась в разной степени деспирализации дисков в секциях В4е, С1а-d, С2de, С3ab, С4fg, D1а,c,f. Иногда теломера приобретала вид фибрилл или гранул. Центромерный район у 10,7 % особей напоминал пуфф. Диски в секциях В3h, В4b,d,f, С1а, С2а, С2f, С4а,e значительно толще по сравнению со стандартными [16, 17]. Очень интересно проявление диска в секции В3h. Он может быть стандартным, тонким гомозиготным, а может быть явно амплифицированным в гетерозиготном (см. рисунок, з) или гомозиготном состояниях. В этом плече встретилась только одна наследственная гетерозиготная инверсия (см. табл. 2). Теломера F в 53 % клеток принимала участие в эктопических контактах.

Выборка из Сантена

Наблюдали высокую функциональную активность в участках С4b,d, D1h-h, D2bc, включая теломеру D3g. Гетерозиготные диски отмечены в участках В4d, С1а-d, С3b, С4h. Именно в этой выборке наблюдалась вспышка разнообразных гетерозиготных инверсий, локализованных в проксимальной части плеча. Обнару-

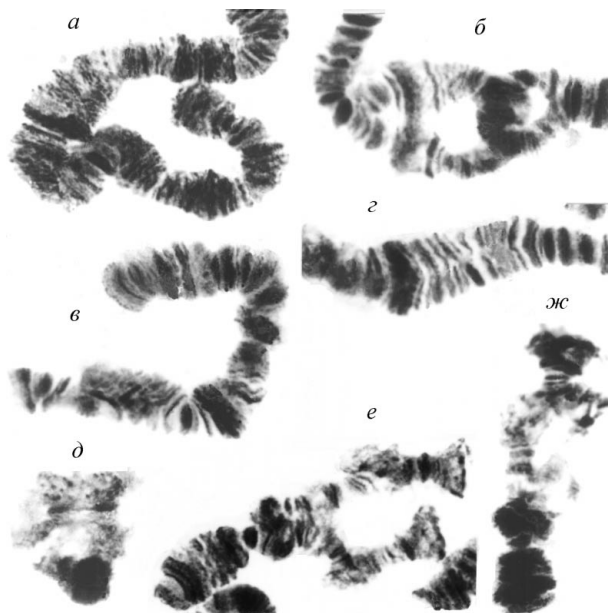
жено 8 наследственных (см. рисунок, в, табл. 2) и 4 соматических (см. рисунок, з, табл. 3) гетерозиготных инверсий. Все они, как правило, редкие.

Плечо G. Выборка из Монкальери

Применение дифференциальной С-окраски хромосом показало, что в хромосоме G особенно сильно окрашивался диск в секции E2e. Поскольку этот метод окраски указывает на локализацию конститутивного центромерного гетерохроматина, можно считать этот диск центромерным, а хромосому G *C. riparius* – акроцентрической [26, 27].

Т а б л и ц а 3
Соматические гетерозиготные инверсии
(их локализация и частота встречаемости)
у *Chironomus riparius*

Плечо хромосомы	Локализация инверсий	Частоты встречаемости	
		Монкальери	Сантена
А	B1g-B2g	–	1,9
	B4f-C2f	–	3,8
	C2a-C2i	–	1,9
	C2a-C3g	–	3,8
	D1d-D3h (перич.)	–	3,8
В	E1a-E2o		3,8
	E2f-F3c		1,9
	E2m-F1h		3,8
С	B2b-B4l		3,8
	B3c-C1h		1,9
D	D4g-E1f	12,5	–
	C4e-C5f	–	1,9
	C4f-C6d	–	1,9
	C5a-C6a	–	3,8
	C6a-D2g	–	1,9
E	A2i-B2a	–	1,9
	B1b-B4g (перич.)	–	5,7
	B1o-B3a (перич.)	–	1,9
	B1b-B3o (перич.)	–	1,9
	B2f-B2o	–	1,9
F	B2q-C1a	–	1,9
	B3a-B3o	–	1,9
	B3d-B3i	–	3,8
	C2a-C3d	–	3,8



Особенности политенных хромосом *Chironomus riparius* из популяции Сантена.
a – хромосома CD: гетерозиготное состояние центромерного диска, деспирализация отдельных участков; *б* – наследственная гетерозиготная инверсия E1.6 (A3d-B1r); *в* – наследственная гетерозиготная инверсия F1.5 (B3a-B4d); *г* – соматическая гетерозиготная инверсия F плеча (B3a-B3o), гетерозиготный диск B3h; *д* – "помпоноподобная" хромосома G; *е* – асинапсис участка D-E хромосомы G, депрессия BRb; *ж* – асинапсис участка C-D хромосомы G, разная активность ядрышкового организатора, делеция участка Cd-Dc.

В стандартном кариотипе гомологи хромосомы G спарены. Однако в изученной популяции часто наблюдали частичный или полный асинапсис гомологов. Стандартное плечо G характеризуется четкой дисковой структурой с хорошо работающим ядрышком, BRc и BRb. BRa, как правило, не работает. Стандартное состояние теломеры-центромеры E2e иногда меняется, она приобретает вид либо темного, хорошо окрашенного "кноб", либо проявляется в сильно деспирализованном состоянии, либо находится в гетерозиготном состоянии. Мы наблюдали дефишенсы теломеры в мозаичном проявлении, мозаичную гетерозиготность BRb, BRc и ядрышкового организатора. В результате делеций секций, содержащих одно или несколько BR, хромосома приобретала морфологию "помпоноподобной" хромосомы. Теломера E2e в 28 % случаев участвовала в эктопических контактах с другими хромосомами.

Выборка из Сантена

В этой выборке хромосома G оказалась настолько лабильной, что данные по ее изменчивости будут опубликованы отдельно [23]. Система колец Бальбиани, расположенная в этой хромосоме, использована как модель для исследования ответной реакции генома (организма) на загрязнение биотопа тяжелыми металлами.

Ни одна особь в популяции Сантена не имела стандартной G-хромосомы. Наблюдались различные типы структурных и функциональных изменений этой хромосомы. Частоты встречаемости инверсий приведены в табл. 4. Инверсия gir G1.4 (14 %) захватывает ядрышкового организатора. Другая инверсия gir G5.5 особенная: она и гомозиготная, и перицентрическая одновременно.

Кроме того, установлено 10 типов гомозиготных делеций и 2 дефишенсы (см. табл. 4), при возникновении некоторых из них хромосома приобретает форму "помпона" (рисунок, *д*).

Для большинства особей система колец Бальбиани типична и соответствует стандарту, когда BRc > BRb, а BRa совсем не работает (за исключением 4 клеток в специальной доле железы). Из табл. 5 видно, что большинство клеток характеризуется высокоактивным BRc

Т а б л и ц а 4
Хромосомные перестройки, их локализация и частота встречаемости в хромосоме G *C. riparius* из популяции Сантена

Перестройка	Локализация	Частота	"Помпоноподобная" структура
Г./з. инв. G1.4	Da-Df	14,0	-
Гомо/з. инв. G5.5	Da-Ee	4,6	-
Гомо/з. дел.	A1b-A2c	2,3	-
То же	A1cd-A2bc+BRc и диски после NOR	11,4	+
»	A1b-A2abc-(BRb)-(BRc)-CDe-E1a-c	4,6	+
»	A2abc(BRa)	2,3	-
»	BRb	6,8	-
»	Bc-Cc	2,3	-
»	Cc(BRc)+E1ab	4,6	+
»	Cc(BRc)-Ce	2,3	+
»	Bb(BRb)-Cc(BRc)	4,6	+
»	Ca-Cc(BRc)	2,3	+
Г/з. деф.	E2e	4,6	-
То же	A1a	6,8	-

П р и м е ч а н и е. Г/з. – гетерозиготная, гомо/з. – гомозиготная, инв. – инверсия, дел. – делеция, деф. – дефишенсы.

Таблица 5

Частота встречаемости клеток с разной степенью активности колец Бальбиани (BRa, BRb, BRc), пуффа Dc, ядрышка (N) и теломерно-центромерного района (пуфф-E2de) в хромосоме G *Chironomus riparius* из популяции Сантана

Сайт	++/++	++/+	++/-	+/+	+/-	-/-
N	81,20	2,08	0,78	12,79	1,30	1,82
Dc	4,17	-	1,04	2,08	15,14	77,54
BRc	70,49	15,39	0,78	15,40	1,56	4,17
BRb	15,66	0,26	0,78	48,04	2,61	32,63
BRa	7,30	-	0,26	4,43	0,52	87,46
E2de	35,24	2,61	2,34	25,58	4,17	30,02

Примечание. ++ максимальная активность; + средняя активность; - слабая или совсем отсутствующая.

(++/++) и слабоактивным BRb (+/+), который может и не работать (-/-) (см. рисунок, e). BRc чаще всего активен у обоих гомологов (70,40 %) (см. табл. 5), но может находиться и в гетерозиготном состоянии (15,39 %), редко может быть депрессирован (4,17 %) или совсем потерян. Различия в активности обнаружены также и у BRb: от очень высокой (15,66 %) до средней (48,04 %) и даже слабой или полностью отсутствующей (32,63 %). В последнем случае в этом локусе хорошо видны диски, которые иногда формируют большой гетерохроматиновый блок (см. рисунок, e). Очень высокая активность обоих BR наблюдалась только в 13,22 % клеток (табл. 6). В тех же клетках, где отмечалась разная активность обоих BR, появлялся индуцированный пуфф Dc. В 4,17 % клеток он был в активном гомозиготном состоянии, реже (2,08 %) в среднеактивном гомозиготном состоянии, обычное же его состояние – гетерозиготное (15,14 %). В 77,54 % клеток он отсутствовал. Этот пуфф описан и изучен И. И. Кикнадзе и Т. М. Пановой [28].

В некоторых клетках мы наблюдали обратную зависимость активности BRc и BRb (см. табл. 5, 6). В этом случае BRc подавлен, а BRb становится активным (0,55 %) (см. табл. 6). Обнаружено некоторое количество клеток (2,47 %), в которых депрессированы оба кольца Бальбиани.

Контрастное проявление центромерного гетерохроматина оказалось характерной чертой

выборки из Сантаны (см. табл. 5). В теломерно-центромерной области хромосомы G в 35,24 % клеток возникал новый BR, в 4,17 % он был в гетерозиготном состоянии (см. табл. 5). Очень часто сам теломерный диск приобретал гранулярную структуру. Более того, наблюдалась различная активность ядрышкового организатора: от очень высокой у обоих гомологов (81,20 %) или средней (12,79 %) до полной депрессии этого локуса (1,82 %) (см. рисунок, ж, табл. 5). BRa активен у обычной личинки только в 4 клетках специальной доли каждой слюнной железы. Пуффинговая активность BRa в изученной популяции не слишком изменчива (см. табл. 5).

Диски в секциях A1a,bc, A2fdc,Dc, Df, E1c, E2a часто были намного толще соответствующих дисков в стандартном кариотипе *C. riparius* [16, 17]. Гетерозиготность по дискам обнаружена в секции E1c-E2a. Между теломерами G и A, C, D, E, F эктопические контакты наблюдались чаще (0,9 %), чем между хромосомой G и центромерами AB и EF (0,55 %).

Как было отмечено, у стандарта гомологи хромосомы G плотно спарены. В популяции из Сантана мы наблюдали несколько случаев асинапсиса между отдельными участками гомологов (см. рисунок, д, е, ж). Частота асинапсиса возрастала от А участка к Е участку. Обнаружена положительная корреляция между активностью колец Бальбиани и частотой возникновения асинапсиса в областях колец Бальбиани и ядрышка.

Таблица 6

Частота встречаемости клеток с разным соотношением активности BRc/BRb в хромосоме G у *Chironomus riparius* из популяции Сантана

++/++	++/+	++/-	+/++	+/+	+/-	-/++	-/+	-/-
13,22	35,26	25,60	1,92	6,61	13,49	0,55	0,82	2,47

Примечание. Значения те же, что в табл. 5.

Соматический мозаицизм

В популяции из Монкальери обнаружена 1, а в Сантена 23 гетерозиготные инверсии, которые присутствовали в одних клетках и отсутствовали в других клетках слюнной железы (см. табл. 3). Как правило, инверсию имели от 1 до 13 (максимум 1/3 часть клеток железы), а остальные 2/3 клеток характеризовались стандартной последовательностью дисков. Таким образом, нами обнаружено чрезвычайно редкое явление в природе – соматический мутагенез. В плече А обнаружено 5 соматических инверсий, одна из них перичентрическая, в плече В – 3, в С – 2, в D и E – по 5 (три в плече E перичентрические), в F – 4 инверсии. В хромосоме АВ они локализируются, как правило, в середине каждого из плеч, а в плечах D и F – ближе к центромерным районам. Отмечены и другие перестройки мозаичного типа: дефишенсы, делеции, гетерозиготность по дискам.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В двух исследованных выборках из Северной Италии обнаружен целый веер спонтанных хромосомных перестроек, таких как гетерозиготные пара- и перичентрические инверсии, делеции, дефишенсы, гетерозиготность по интеркалярным и центромерным дискам, увеличение толщины интеркалярных дисков, появление соматических мозаиков по пара- и перичентрическим инверсиям, дефишенсы и по гетерозиготности дисков и колец Бальбиани. Кроме того, отмечена значительная функциональная изменчивость пуффов, колец Бальбиани и ядрышка (гетерозиготность, депрессия, экспрессия, появление новых пуффов).

Перичентрические инверсии отмечены в хромосомах АВ, EF и G. Все инверсии, как правило, короткие и простые, с низкой частотой встречаемости. В популяциях из России (Новосибирская и Саратовская обл.) также обнаружены в основном короткие и простые гетерозиготные инверсии [21, 29]. Согласно кадастру инверсий *C. riparius*, составленному Беляниной и Полуконовой [21], до настоящего исследования было известно 25 инверсий, из них 4 перичентрические.

В плечах А, В, D, E и F часто наблюдалось увеличение размеров некоторых дисков по сравнению со стандартным карิโอотипом [16, 17], на-

пример в плече D: D2d,f, D3a,e, C4e, в плече F: В3h, В4b,d. Проявление одного и того же диска варьировало: он мог быть в гомозиготном стандартном состоянии, либо в гетерозиготном, когда диски у гомологов различались по толщине, либо в амплифицированном гомозиготном состоянии [22]. Это явление отмечалось и в других популяциях *C. riparius* [29, 30]. Очевидно, увеличение толщины происходит в результате экстрарепликации ДНК только в специфических дисках. Различия по количеству ДНК в плече F (диск В3h) описаны Кейлом [31]. Подобные диски мы нашли в выборке из Монкальери у более чем 85 % проанализированных особей. Учитывая такой большой процент этого явления, можно предположить, что оно связано с антропогенным воздействием на изученную популяцию. Более того, некоторые толстые диски (например, E2kl в плече В и В3h в плече F) появлялись одновременно со специфическими гетерозиготными инверсиями. Кейл также наблюдал у *C. riparius* амплификацию диска, находящегося рядом с точкой разрыва после воздействия X-лучами [25]. Наши данные подтверждают предположение, высказанное этим автором [27], что спонтанные разрывы хромосом могут быть причиной локального увеличения количества ДНК. Позже было показано [26], что разрывы хромосом, индуцированные FUDR, происходят, как правило, в дисках с высоким содержанием ДНК.

Недавние исследования показали, что мобильные элементы (МЭ) также вовлекаются в хромосомные перестройки у *Diptera* [32]. Установлена корреляция между включениями МЭ рCthC1.2HR и переходом дисков в состояние пуффа [33]. МЭ, содержащие clа-повторы, найдены в более чем 200 эухроматических сайтах хромосом *C. riparius*, хотя большинство из них и находится в центромерных районах [34]. Именно в центромерах мы наблюдали явление деконденсации. Таким образом, МЭ могли влиять на функциональную активность центромерных дисков. МЭ (рCthC1.2HR) были найдены в сайтах F4h-j, G3ор в хромосоме АВ; A2d, F2по в хромосоме CD; A2j, C1b-d – в хромосоме EF, где мы наблюдали пуффинговую активность. Более того, эти МЭ находятся в участках, где возникали некоторые гетерозиготные инверсии, например *rip* F1.12. Локализация отдельных широких и толстых дисков также совпа-

дает с районами, содержащими pCthC1.2HR, например в хромосоме АВ: D1b, в хромосоме EF: A3c, A5e, A5g, C1a, C2a,b,f. Итак, из приведенных данных [32–34] очевидно, что возможная корреляция между распределением МЭ и локализацией сайтов хромосомных модификаций существует.

В хромосомах АВ, CD, EF и G центромерный гетерохроматин иногда приобретал вид пуффа. Цитологически он очень похож на псевдопуффинг, описанный Keyl [35], где не было обнаружено синтеза ни ДНК, ни РНК. В псевдопуффах, возникших в центромерном гетерохроматине у *C. riparius*, Кикнадзе и Валеева [36, 37] тоже не обнаружили транскрипционной активности. Принимая во внимание этот факт, мы не можем исключить возможности того, что псевдопуффинг центромерных районов хромосом в нашем материале мог возникнуть в результате структурной модификации центромерного гетерохроматина после воздействия некоторых факторов внешней среды, тормозящих синтез тех белков, которые участвуют в конденсации хроматина.

Впервые для вида [22] нами отмечена высокая частота эктопических контактов теломер разных хромосомных плеч. Мы учитывали только такие контакты, при которых теломеры были либо тандемно сконъюгированы, либо соединены четкими хроматиновыми тяжами. Известно, что негомологичные диски конъюгируют вследствие того, что содержат одинаковые последовательности ДНК [38]. Возможно, путем эктопических контактов облегчается перенос МЭ с одной хромосомы на другую, влияя таким образом на активность всего генома. Эти данные подтверждают предположение, высказанное ранее [39], что функциональная активность гетерохроматина увеличивается под влиянием различных факторов антропогенного воздействия. Наконец, хотелось бы остановиться на обсуждении так называемых "слабых точек" хромосом, которые описаны у хирономид [40]. Наличие таких точек (В плечо: F2fg, F3f-h, F4d; С плечо: B5c; D плечо: D4g и F плечо: B4g), в которых возникают частые разрывы хромосом, предполагает возможность недорепликации ДНК в этой области во время политенизации. Именно стрессовые условия среды обитания могли бы вызвать подобную недорепликацию в период формирования хромосом

слонных желез. Однако, по данным Barr и Ellison [38], участки, богатые аденином и тиминном, также могут недореплицироваться в политенных хромосомах.

В период метаморфоза у *C. riparius* обнаружено 336 пуффов [18, 19]. В результате активации этих пуффов синтезируются полипептиды, необходимые для жизнедеятельности личинки. В популяции из Монкальери на стадии предкуколки в хромосоме АВ мы обнаружили следующие пуффы: A1a, B2a, B2c, B4ab, G1h-l, G2b-d, G3o-p, которые соответствовали описанным ранее [19]. Однако следует подчеркнуть, что пуфф в участке B4b был значительно крупнее и активнее, чем на это указывает Кикнадзе [19], с другой стороны, мы не нашли одного типичного пуффа F3d на этой стадии, который видела Кикнадзе [19]. В хромосоме CD присутствовало много дополнительных активных сайтов (участки В, С, D), которые не были обнаружены на этой стадии Кикнадзе [19]. В хромосоме EF (стадия предкуколки) только 8 пуффов: A1e, A2f, A2j, A3ab, A4b, A5c, C3ab, D1f – соответствовали пуффам, описанным ранее [19]. Однако в Монкальери в участках В и С хромосомы EF больше активных участков по сравнению с картиной пуффов по Кикнадзе [19]. Эти результаты показывают, что агенты, загрязняющие среду, в частности тяжелые металлы, которые находятся в донных отложениях, вызывают как активацию некоторых сайтов хромосом (например, в хромосомах CD, EF), так и репрессию других (например, в хромосоме АВ). Наши данные подтверждают высказывание Kroeger [41], что появление пуффов и их модификаций в размерах и активности можно рассматривать как самый первый ответный сигнал организма на действие факторов внешней среды. Действительно, у *Chironomus* факт возникновения пуффов и активации синтеза полипептидов в ответ на действие тепловым шоком хорошо известен [42]. Такие полипептиды участвуют в формировании адаптивного механизма, который позволяет клеткам пережить неблагоприятные условия среды [43]. В экспериментах по воздействию на активность колец Бальбиани [20, 44] использованы другие вещества: сахар, антибиотики, аминокислоты, разнообразные соли.

Размер ВRc относительно стабилен, начиная с 4-й возрастной стадии личинки до стадии предкуколки [8, 11]. В противоположность ВRc, раз-

мер BRb зависит от возраста личинки: оно очень активно у совсем молодой личинки и на стадии предкуколки и слабоактивно или депрессировано у личинки среднего возраста [8, 11]. Однако обработка галактозой вызывает характерные изменения в "пуффинговой активности": либо BRc становится менее активным по сравнению с BRb, либо оно депрессируется без одновременной активации BRb [9]. Подобный эффект обнаружен у *C.ninevah* после воздействия некоторыми тяжелыми металлами, например медью [44]. В изученной популяции мы наблюдаем подобные картины по регуляции активности колец Бальбиани у *C.riparius*. В Сантене эта система оказалась высокочувствительной к загрязнению. Отмечены клетки, в которых BRc и BRb одновременно депрессированы, или BRc слабоактивен или полностью депрессирован, в то время как BRb – активен. Таким образом, антропогенное загрязнение, в частности повышенная концентрация тяжелых металлов в водоеме Сантена, могут вызывать изменения в активности колец Бальбиани у *C.riparius*, подобные тем, которые описаны ранее [3, 9]. Активация BRb и репрессия BRc указывают на то, что механизм транскрипции колец Бальбиани может реагировать аналогичным образом на различные стрессовые ситуации в окружающей среде.

В изученной популяции в хромосоме G появились новые пуффы: Dc и E2de. Эти пуффы возникали в клетках с разной степенью активности BRc – от высокой до нулевой. Таким образом, 4 сайта (BRb, BRc, Dc, E2de), скорее всего, кодируют различные белки секрета, от которых зависит возможность адаптации функции слюнных желез к изменениям окружающей среды.

В то же время пуффирование района E2de, связанное с активацией теломерной области, может быть связано со структурной модификацией гетерохроматина в этих участках, что, в свою очередь, вызвано значительным антропогенным загрязнением биотопа Сантена. На активацию теломерной области A1a до сих пор не указывалось. В наших лабораторных экспериментах по воздействию хрома на *C.riparius* мы наблюдали подобную реакцию [45].

Еще одной цитогенетической характеристикой популяции можно считать появление "помпоподобной" хромосомы G. Такие же хромо-

сомы мы наблюдали у личинок *C.riparius* при воздействии тремя различными концентрациями Cr в лабораторных экспериментах [45]. Морфология такой хромосомы G подобна той, которую описал Жимулев [46] для других Diptera. Однако особенностью таких хромосом *C.riparius* из итальянской популяции является то, что они возникли вследствие потери большого количества генетического материала, с активацией оставшейся части. Мы полагаем, что наличие таких хромосом в популяции можно рассматривать как надежный цитологический маркер стрессовой ситуации в окружающей среде [22].

Наконец, необходимо отметить очень интересное, хотя и достаточно редкое у хирономид, явление соматического мутагенеза, обнаруженное в обеих изученных выборках. В Монкальери нами отмечены соматические мутанты по дефишенси, гетерозиготности дисков и колец Бальбиани, а в популяции Сантена – по разнообразным гетерозиготным инверсиям. До сих пор у хирономид не было известно такой высокой частоты встречаемости соматических мозаиков [29, 47, 48].

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, как геном *C.riparius* чутко и разнообразно реагирует на повышенную концентрацию тяжелых металлов в биотопе. Эти данные подтверждают, что *C.riparius* – экологически пластичный вид и может быть использован в качестве цитологического тест-объекта на наличие генотоксических веществ, загрязняющих водные системы континентальных водоемов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (96-04-49038), итальянских CNR N A194.00447.04. и MURST, болгарского гранта по науке, образованию и технологии № 432, а также двустороннего договора о сотрудничестве между Институтом зоологии Болгарской АН и Зоологическим институтом Российской АН (1996–1998).

ЛИТЕРАТУРА

1. E. Goldsmith, R. Allen, M. Allaby et. al., *Ecologist*, 1972, **2**: 1, 1–43.
2. А. С. Северцов, *Журн. общ. биологии*, 1990, **51**: 5, 579–584.
3. W. Beermann, *Chromosoma*, 1973, 41, 297–326.
4. L. Diez, M. Santa Cruz, A. Villanueva et P. Aller, *Ibid.*, 1980, 81, 263–269.

5. G. Morcillo, M. Santa Cruz, L. Diez, *Ibid.*, 1981, 83, 341–352.
6. И. И. Кикнадзе, А. Г. Блинов, Н. Н. Колесников, Структурно-функциональная организация генома, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1989.
7. M. Lezzi, G. Richards, Salivary glands. Ecdyson. From Chemistry to Mode of Action. Ed. J. Koolmann, Stuttgart – New York, Georg Thieme Verlag, 1989.
8. M. Santa Cruz, A. Villanueva, L. Diez, *Chromosoma*, 1978, 69, 93–100.
9. L. Diez, E. Cortes, J. Merimo, M. Santa Cruz, *Ibid.*, 1990, 99, 61–70.
10. S. Yagi, *Ibid.*, 1984, 89, 274–279.
11. И. И. Кикнадзе, Н. Н. Колесников, Е. И. Каракин, В. А. Кокоза и др., Организация и экспрессия генов тканеспецифической функции у Diptera, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1985.
12. C. G. Yngersoll, F. J. Dwyer, F. W. May, *Environ.-Toxicol.-Chem.*, 1990, 9: 9, 1171–1181.
13. K. A. Braner, S. W. Fisher, *J. Environ. Sci. health. Part. A*, 1993, A28: 6, 1341–1360.
14. J. F. Postma, M. C. Breckert-de-Jong, N. Staats, C. Davids, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1994, 26: 2, 143–148.
15. P. Michailova, *C. R. Acad. Bulgare. Sci.*, 1985, 38, 297–326.
16. K. Hagele, *Chromosoma*, 1970, 31, 91–138.
17. И. И. Кикнадзе, А. И. Шилова, И. Е. Керкис и др., Кариотипы и морфология личинок трибы Chironomini. Атлас, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1991.
18. И. И. Кикнадзе, *Цитология*, 1976, 18: 11, 1322–1329.
19. И. И. Кикнадзе, Там же, 1978, 20: 5, 514–521.
20. W. Veermann, *Chromosoma*, 1971, 34, 152–326.
21. С. И. Белянина, Н. В. Полуконова, Кариосистематика беспозвоночных животных, вып. 3, М., Изд. Бот. сада Моск. ун-та, 1996, 10–12.
22. P. V. Michailova, N. A. Petrova, L. Ramella et al., *Genetica*, 1996, 98, 161–178.
23. P. V. Michailova, N. A. Petrova, G. Sella et al., *Environmental pollution*, 1998, 103, 127–134.
24. U. Forstner, W. Salomons, *Environ. Techn. Lettres*, 1980, 1, 494–517.
25. H. Keyl, *Chromosoma*, 1958, 9, 441–483.
26. K. Hagele, *Ibid.*, 1971, 33, 297–318.
27. P. V. Michailova, L. Ramella, G. Sella and S. Bovero, *Cytobios*, 1997, 90, 139–151.
28. И. И. Кикнадзе, Т. М. Панова, *Цитология*, 1972, 14: 9, 1084–1091.
29. И. И. Кикнадзе, Л. И. Гундерина, М. А. Филиппова, Е. И. Серая, *Генетика*, 1988, 24, 1795–1805.
30. H. Keyl, *Experientia*, 1965, 31, 191–193.
31. H. Keyl, *Chromosoma*, 1957, 8, 739–756.
32. M. Collins, G. Rubin, *Nature*, 1984, 308, 323–327.
33. И. И. Кикнадзе, Н. Н. Колесников, Т. М. Панова и др., *Генетика*, 1987, 24, 1795–1805.
34. E. Schmidt, *J. Mol. Biol.*, 1984, 179, 1–15.
35. H. Keyl, *Exp. Cell. Res.*, 1963, 30, 245–247.
36. И. И. Кикнадзе, Ф. С. Валеева, *Цитология*, 1983, 25: 9, 1024–1048.
37. Ф. С. Валеева, Связывание актиномицина D и эффекты различных его концентраций на транскрипцию и морфологию политенных хромосом: Дис. ... канд. биол. наук, Новосибирск, 1991.
38. H. Barr, J. Ellison, *Chromosoma*, 1972, 39, 53–61.
39. P. Michailova, N. Petrova, *Cytobios*, 1994, 79, 15–29.
40. H. Keyl, G. Werthy, *Naturwissen*, 1959, 14, 453–454.
41. H. Kroeger, *Chromosoma*, 1964, 15, 36–70.
42. P. Baretino, G. Morcillo, J. Diez, *Cell. Diff.*, 1988, 23, 27–36.
43. S. Lindquist, *Ann. Rev. Biochem.*, 1986, 55, 1151–1191.
44. J. Aziz, N. Akrawi, G. Nasson, *Env. Pollution*, 1991, 69, 125–130.
45. P. Michailova, N. Petrova, G. Sella et al., *Mutation Research* (in press).
46. И. Ф. Жимулев, Политенные хромосомы: морфология и структура, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1992.
47. Н. Б. Ильинская, *Цитология*, 1977, 19: 1, 45–49.
48. N. A. Petrova, P. V. Michailova, *Int. J. Dipterol. Res.*, 1996, 7: 2, 79–86.

Structure-Functional Alterations of Polytene Chromosomes of *Chironomus Riparius* from Some Heavy Metal-Polluted Water Bodies of Italy

N. A. PETROVA, P. V. MIKHAILOVA, G. SELLA,
L. RAMELLA, S. BOVERO, V. ZELANO, F. REGOLI

Influence of heavy metals (Cd, Cu, Zn, Pb, Cr, Mn, Fe) on polytene chromosomes of *C. riparius* from some water bodies of North Italy was studied. A high level of chromosome structure variability represented by heterozygous para- and pericentric inversions, deletions, deficiencies, heterozygosity of bands including centromeric ones, increase of thickness of some intercalary bands, asynapsis of homologs was found. Besides, there was a considerable functional variability of puffs, Balbiani rings and nucleoli (heterozygosity, depression etc.), and atypical puffs and pseudopuffs were observed. Somatic mosaics with respect to para- and pericentric inversions, deficiency and heterozygosity of bands and Balbiani rings were found. It is proposed to assume that the occurrence of pompon-like IVG chromosome as a cytogenetic marker of stressful environmental conditions.