

## ДЕЙСТВИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ

УДК 595. 771:575.22

### Цитологическая идентификация видов хирономид из водоемов бывшего Семипалатинского испытательного полигона

К. Г. АЙМАНОВА\*, И. И. КИКНАДЗЕ\*, Е. Н. АНДРЕЕВА\*, А. Т. СЕЙСЕБАЕВ\*\*

\*Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10

\*\*Институт радиационной безопасности и экологии  
Национальный ядерный центр Республики Казахстан, Курчатов

#### АННОТАЦИЯ

Идентифицирован состав видов хирономид из водоемов на территории бывшего Семипалатинского испытательного полигона (СИП). Установлена сильная обедненность видового состава во всех трех исследованных водоемах. В массе обнаружены только *Camptochironomus setivalva* Shilova и *Glyptotendipes salinus* Michailova. Анализ кариотипов и хромосомного полиморфизма показал, что оба вида практически мономорфны. Исследованные виды хирономид будут использованы в качестве "модельных" при дальнейшем мониторинге водоемов, подвергшихся радионуклидному загрязнению на территории СИП.

#### ВВЕДЕНИЕ

До последнего времени деятельность Семипалатинского испытательного полигона (СИП) оставалась закрытой. В связи с этим научные исследования по оценке состояния природной среды с учетом анализа влияния источников антропогенного воздействия и значимости вклада радиационного фактора не проводились.

Радиоэкологическая обстановка на территории бывшего СИП достаточно сложная. Это обусловлено длительным проведением ядерных испытаний. За 40 лет (1949–1989) на территории СИП проведено 466 ядерных взрывов, в том числе 30 наземных, 88 – воздушных и 348 – подземных.

Территорию полигона можно рассматривать в качестве природной радиобиоэкологической лаборатории, где имеется возможность определить закономерности хронического действия радиации на разных уровнях – организма, популяции и экосистемы, а также изучить процессы адаптации живых организмов и экосистем в целом.

Уникальность СИП и необходимость длительного изучения последствий ядерных испытаний для объектов живой природы требует разработки системы мониторинга, включающей различные организмы на различных уровнях – от молекулярно-генетического до популяционного и биоценологического.

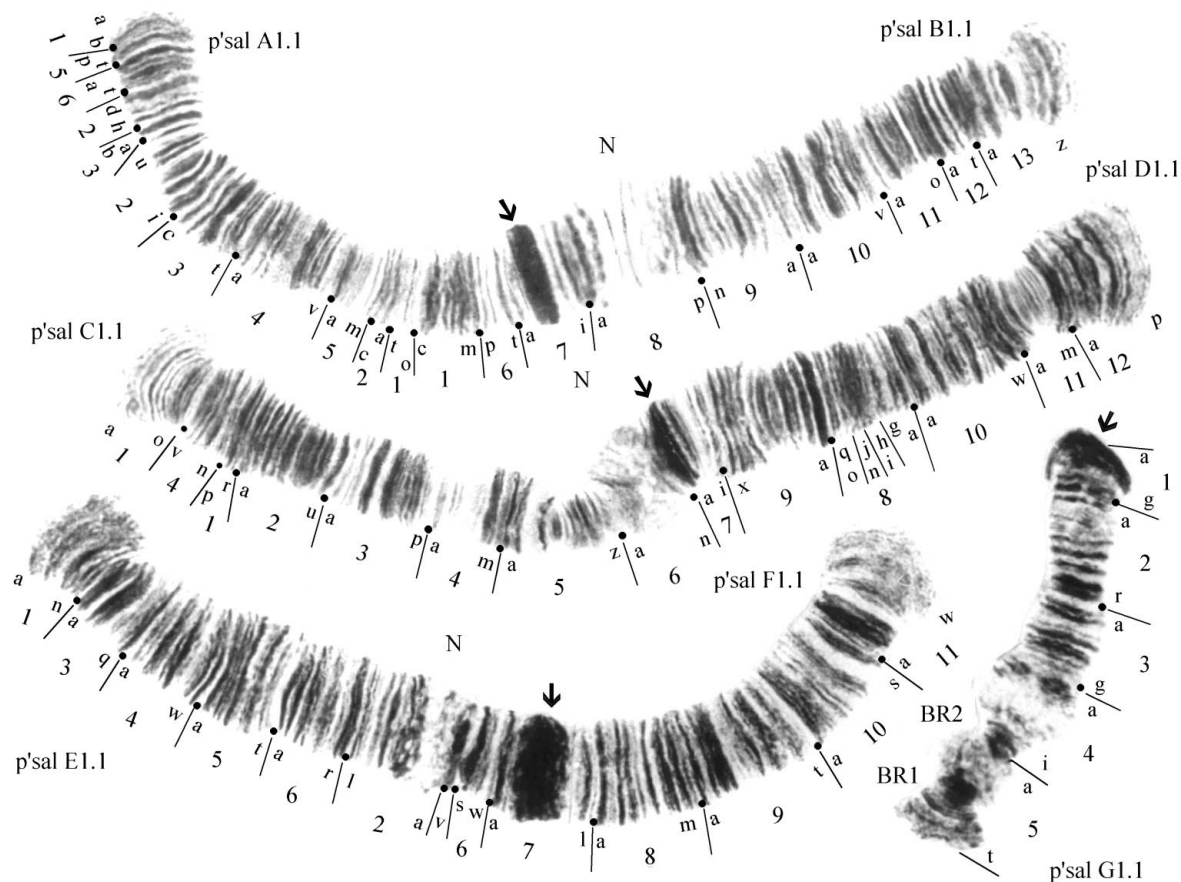


Рис. 1. Кариотип *Glyptotendipes salinus*.

Цифры под хромосомами обозначают номера районов. В каждом районе указаны начальные и конечные буквы, согласно карте Мартина и Портера (Martin, Porter, 1973). N – ядрышко, BR – кольца Бальбиани. Центромеры обозначены стрелками.

Хирономиды – одно из многочисленных и процветающих семейств насекомых. Их личинки доминируют по биомассе и численности в водоемах, являются существенным компонентом биоценозов, обеспечивая самоочищение водоемов и входя в состав пищевых цепей промысловых рыб и водоплавающих птиц [1, 2].

Хирономиды имеют ряд преимуществ перед другими водными организмами при изучении антропогенных загрязнений водоемов. Личинки хирономид постоянно обитают в донных отложениях, накапливающих радионуклиды и тяжелые металлы. Они обладают способностью концентрировать в своей гемолимфе радионуклиды и различные химические вещества. Наличие у личинок хирономид в большинстве своих тканей клеток с политенными хромосомами позволяет проводить цитогенетический анализ и оценивать последствия воздействий радиации на хромосомном уровне.

В данной работе приводятся первые данные кариологического анализа популяций хирономид, обитающих в водоемах на территории СИП.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследовали личинок хирономид последнего 4-го возраста, собранных в мае 1997 и 1998 гг. из водоемов на территории бывшего СИП: озера Шаган, Атомного, искусственного водоема на месте угольного карьера "Кара-жыра". Оз. Шаган – естественное, с солоноватой водой, средняя глубина 15–20 м, оз. Атомное – искусственное, образованное в результате ядерного взрыва в районе слияния рек Шаган и Ашису. Площадь водной поверхности Атомного озера 3,5 км<sup>2</sup>, средняя глубина 20–22 м. Расстояние между двумя водоемами около 3 км. Распространение радиоактивных продуктов в оз. Атомном крайне неоднородно. Донные от-

ложения в местах отбора проб содержат (Кц/кг) только Sr-90 –  $1,5 \cdot 10^{-8}$ ,  $4,9 \cdot 10^{-10}$ ,  $8,8 \cdot 10^{-8}$  и Cs-137 –  $1,6 \cdot 10^{-7}$ ,  $3,4 \cdot 10^{-8}$ ,  $3,1 \cdot 10^{-9}$  [3]. Глубина сборов около 0,3–1,5 м. Личинки фиксировали в смеси 96 % этанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). Давленные препараты политенных хромосом слюнных желез приготавливали по обычной методике [4]. Картирование хромосом проводилось по двум системам [4, 5]. При обозначении последовательности дисков использовали сокращенное название вида и номер последовательности. Поскольку хирономиды имеют голарктическое распространение, при обозначении последовательностей использовали символы p' – для палеарктических, n' – для неарктических и h' – для голарктических последовательностей [6, 7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенный кариологический анализ хирономид из водоемов на территории СИП выявил наличие двух видов из сем. Chironomidae:

1. Genus *Glyptotendipes* – *G. salinus*.
2. Genus (subgenus) *Camptochironomus* – *C. setivalva*.

### *Glyptotendipes salinus*

Исследовали кариотипы личинок 4-го возраста *G. salinus* из двух популяций из оз. Шаган (52) и Атомного озера (50).

Кариотип *G. salinus* содержит  $2n = 8$  (рис. 1). Сочетание хромосомных плеч – АВ, CD, EF, G. Три крупные хромосомы – субмета (мета)центрики, четвертая (короткая) хромосома – телоцентрик. Кариотип *G. salinus* имеет две особенности, четко отличающие его от кариотипа других видов, – крупные плотные центромерные районы и присутствие ядрышковых организаторов (N) во всех трех крупных хромосомах. Колец Бальбиани два, оба они локализованы в плече G (см. рис. 1).

При кариологическом анализе инверсионные последовательности дисков обозначались согласно Кейлу (1962) и Вулкеру (1980) [4, 8]. При картировании в качестве стандарта использовали политенные хромосомы близкого вида *G. barbipes* [9, 10]. Для палеарктических последовательностей использовали дополнительный символ "p", например, p'sal D1, p'sal A2.

Рисунок дисков политенных хромосом *G. salinus* определен во всех хромосомных плечах, в сравнении с рисунком дисков *G. barbipes*. Кариотипы этих двух видов хорошо различаются по рисунку дисков в плечах А, С, D и Е. Наиболее важным кариотипическим маркером *G. salinus* служит сложная инверсия в плече А. Высокополиморфным является плечо С, в плече G обнаружена одна инверсия, остальные плечи мономорфны. В дальнейшем при описании последовательностей дисков инвертированные участки будут подчеркнуты (см. рис. 1).

В плече А у *G. salinus* обнаружена одна последовательность дисков

p'salA1 1ab 5n-t 6a-n 2d-h 3ba 2u-i 3c-t 4a-v 5a-m 2cba 1t-n  
1c-m 6c-m 7a-s.

В плече В у *G. salinus* выявлена одна последовательность дисков (см. рис. 1)

p'salB1 13z-a 12t-a 11o-a 10v-a 9n-a 8p-a 7s-a

В плече С у *G. salinus* найдено 4 инверсионных последовательности (рис. 1, 2)

p'salC1 1a-o 4v-n 1p-r 2a-n 3a-p 4a-m 5a-z 6a-n 7a-i

p'salC2 1a-o 5k-a 4m-a 3p-a 2n-a 1r-p 4n-v 5l-z 6a-n 7a-i

p'salC3 1a-o 5k-a 4m-a 3p-a 2n-a 4u-n 1p-r 4v 5l-z 6a-n 7a-i

p'salC4 1a-o 4e-m 5a-k 1o-e 4d-a 3p-a 2n-a 1r-p 4n-v 5l-z 6a-n 7a-i

Последовательность дисков p'salC2 отличается простой инверсией от p'salC1, а последовательность p'salC3 и p'salC4 – простыми инверсиями от p'salC2. Найдены гомозиготы p'sal C1.1 и p'salC2.2 и гетерозиготы p'salC1.2, p'salC2.3 и p'salC2.4. Все инверсии единичны.

В плече D у *G. salinus* найдена одна последовательность дисков (см. рис. 1)

P'salD1 12p-a 11m-a 10w-a 8a-g 8i-h 8k-j 8o-q 9a-x 7i-a

В плече Е у *G. salinus* выявлена одна последовательность дисков (см. рис. 1)

p'salE1 1a-u 3a-q 4a-w 5a-t 6a-r 2l-a 1v 6s-w 7a-l

В плече F у *G. salinus* выявлена одна последовательности дисков (см. рис. 1)

p'salF1 11w-a 10s-a 9t-a 8m-a 7l-a

В плече G у *G. salinus* выявлено две последовательности дисков

p'salG1 5t-a 4i-a 3q-a 2r-a 1g-a

p'salG2 5t-a 4i 2b-r 3a-g 4a-h 2a 1g-a

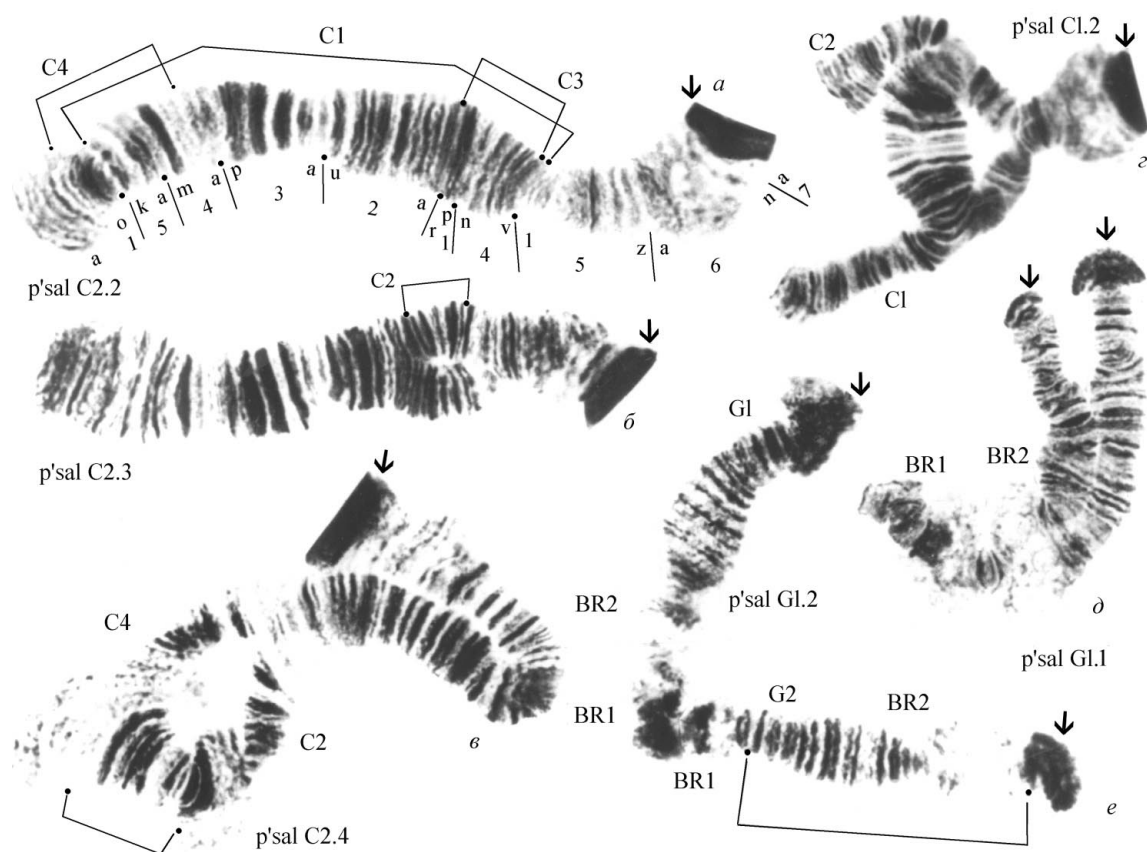


Рис. 2. Хромосомный полиморфизм *Glyptotendipes salinus*.

Гомозиготная инверсия: *a* – p'salC2.2; гетерозиготные инверсии: *b* – p'salC2.3, *c* – p'salC2.4; *z* – p'sal C1.2; *e* – p'salG1.2; *d* – гетерозигота по размеру блока центромерного гетерохроматина.

В популяциях К-С1 и КС2 найдены гетерозиготы p'salG1.2

Для *G. salinus* из данных водоемов оказался характерным полиморфизм по размеру центромерного гетерохроматина у гомологов.

Таким образом, нами впервые проведен анализ структуры кариотипа и хромосомного полиморфизма *G. salinus* из двух водоемов СИП.

### ***Camptochironomus setivalva***

В литературе имеются данные только по морфологии имаго этого вида [11].

Исследованы личинки *C. setivalva* из оз. Шаган (41 особь) и искусственного водоема на месте угольного карьера (1 особь).

### **Кариотип *Camptochironomus setivalva***

Кариотип *C. setivalva* содержит  $2n = 8$ . Комбинация хромосомных плеч АВ, CF, DE, G. Центромерные районы очень крупные, что является четким отличием от остальных карио-

типов, известных для подрода. В кариотипе *C. setivalva* имеется одно ядрышко, локализованное в плече В, как и в кариотипе *C. pallidivittatus*. Два кольца Бальбиани расположены на терминальных участках хромосомы G, гомологи которой сконъюгированы по всей длине.

В системе Беермана [5] за стандарт при картировании принимается рисунок дисков *C. tentans*. Результаты этого картирования указаны на рис. 3 внизу под хромосомами. Использование системы Беермана позволяет легко определить степень дивергенции кариотипов в подрode *Camptochironomus*. В системе Кайла [4] стандартом при картировании является *C. piger*, представитель подрода *Chironomus*. Использование данного стандарта дает возможность оценить в целом степень дивергенции рисунка дисков в роде *Chironomus*. Картирование по Кайлу проведено для плеч А, Е и F.

Плечо А картировано по двум стандартам и наиболее близко к А1 *C. pallidivittatus*.



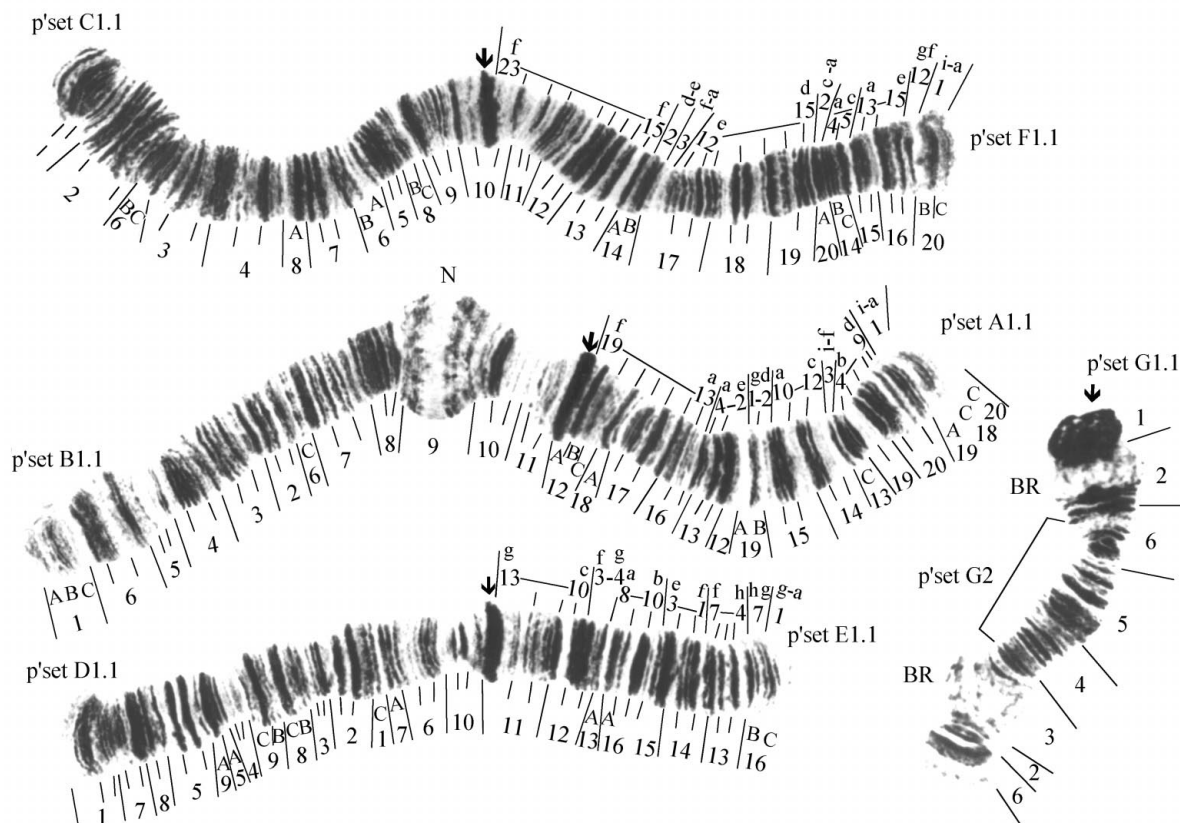


Рис. 3. Кариотип личинки *Camptochironomus setivalva*. А, В, С, D, Е, F, G – плечи хромосом, BR – кольца Бальбиани, N – ядрышко, центромеры указаны стрелками. Цифры внизу под хромосомами – обозначения участков по Беерману (1955), над хромосомами – по Кейлу (1962).

Картирование по стандарту *C. tentans* (см. рис. 3):

p'setivalva A1 (20C) 18C-19A 20C-19B(A) 13C-15C (16A)  
18BA 12C-13C 16A -18A 12C-A

h'palA1 (20C) 18C-19A 16A-12C 18AB 20C-19A 16A-18A  
12C-A

Картирование по стандарту *C. piger* (см. рис. 3):

p'setivalva A1 01a-01f 09d-04b 03f-03i 12c-10a 02d-01g  
02e-03e 04a 13a-19f K

h'pal A1 01a-02d 10a-12c 03i-02e 09d-04a 13a-19f K

Плечо В картировано только по стандарту *C. tentans*; отличается одной простой инверсией от последовательности В1 *C. tentans* (см. рис. 3):

p'setivalva B1 1A-C 6C- 2A 6C-11C

p'ten B1 1A-C - 11A-C

Плечо С картировано только по стандарту *C. tentans*; очень близко к последовательности С1 *C. tentans*, но отличается от него смещением

(shift) участка 6BC за счет включенной инверсии (см. рис. 3):

p'setivalva C1 1A -2C 6BC 3A-4C 8A-5A 8B-10C

p'ten C2 1A-4C 8A-5A 8B-10C

Плечо D картировано только по стандарту *C. tentans*; сильно отличается от плеча D у *C. tentans* и *C. pallidivittatus* (см. рис. 3)

p'setivalva D1 1A-C 7A-8B 5C-A 9A 5A-4A 9CB 8CB 3C-1C  
7A-6A 10A-C

p'pal D1 1A-5A 9A-5A 9B-10C

Плечо Е картировано по стандарту *C. tentans* и *C. piger*; имеет одну простую инверсию по сравнению с плечом Е у *C. tentans*.

Картирование по стандарту *C. tentans* (см. рис. 3):

p'setivalva E1 16CB 13A-16A 13A-11A

p'ten E1 16C-A - 11C-A

Картирование по стандарту *C. piger* (см. рис. 3):

p'setivalva E1 01a-01g 07g-07h 04h-07f 01h-03e 10b-08a  
04g-03f 10c-13g K

p'ten E1 01a-01g 07g-07h 08a-10b 03e-01h 07f-03f 10c-13gK

Плецо F картировано по двум стандартам (см. рис 3).

Картирование по стандарту *C. tentans*:

p'setivalva F1 20CB(A) 16C-14B 20A-17A 14B-11A

p'ten F1 20C-A - 11C-A

Картирование по стандарту *C. piger*:

p'ten F1 01a-01i 02a-02d 05d-12g 15e-13a 05c-02e 15f-15i  
15a-23f K

p'setivalva F1 01a-01i 12g-12f 15e-13a 05c-04a 02a-02c 05d-12e  
03f-03a 02d-02f 15f-15i 16a-23f K

Плецо G картировано по стандарту *C. tentans*; имеет простую инверсию в сравнении с плечом G *C. tentans* (см. рис 3):

p'setivalva G1 1-2B(C) 6B-2C 6BC

p'setivalva G2 1A-2C 5A-6B 2C 4C-2C 6BC

p'ten G1 1A-C - 6A-C

Кариотип *C. setivalva* оказался практически мономорфным. Из 42 исследованных личинок только одна имела гетерозиготную инверсию в плече G (G1.2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые проведен анализ структуры кариотипа и хромосомного полиморфизма *G. salinus* и *C. setivalva* в нескольких природных популяциях на территории СИП.

Характерной особенностью хромосомного полиморфизма *G. salinus* является высокий уровень гетерозиготности по размеру блока центромерного гетерохроматина в плече G. В целом для *G. salinus* характерен низкий уровень полиморфизма (выявлено всего 11 последовательностей дисков). У *G. salinus* полиморфны плечи C и G.

В анализируемых популяциях преобладала последовательность p'salC2, тогда как в популяциях Алтая и в Омской области преобладает p'salC1 [12]. Возможно, эти альтернативные последовательности имеют адаптивное значение. В загрязненных радионуклидами водоемах СИП обнаружены редкие последовательности дисков p'salC3 и p'salC4, не встречающиеся в других регионах. Эти инверсии затрагивали очень мелкие районы хромосом. Связано ли появление этих уникальных последовательностей с повышением частоты гетерозигот по

центромерному гетерохроматину в плече G с радионуклидным загрязнением, предстоит выяснить при дальнейшем цитогенетическом анализе.

*C. setivalva* четко идентифицируется по кариотипу благодаря наличию крупных блоков центромерного гетерохроматина. У других представителей подрода *Camptochironomus* – *C. tentans*, *C. dilutus* и *C. pallidivittatus* – центромерные диски не гетерохроматизированы, их идентификация затруднена.

Наличие сильно гетерохроматизированных центромерных дисков в кариотипе *C. setivalva* позволяет теперь точно определить локализацию центромеров у всех видов *Camptochironomus*, так как рисунок дисков в центромерных районах консервативен.

Кариотип *C. setivalva* относительно мономорфен по сравнению с *C. tentans*, *C. dilutus* и *C. pallidivittatus*. У *C. setivalva* обнаружено всего 7 последовательностей дисков, тогда как у *C. tentans*, *C. pallidivittatus* и *C. dilutus* – 45, 30 и 25 последовательностей соответственно. Исследованные популяции *C. setivalva* выявлены непосредственно на территории СИП. При изучении кариотипа личинок этой популяции можно было ожидать выявления отдаленных цитогенетических последствий радионуклидных загрязнений от ядерных взрывов. Мы не обнаружили существенного увеличения частот хромосомных перестроек в Семипалатинской популяции по сравнению с популяцией этого же вида из Омской области, не подвергавшейся радионуклидному загрязнению [13]. Однако у мономорфного *C. setivalva* в Семипалатинской популяции была найдена гетерозигота по инверсии, что обычно не наблюдается в норме у мономорфных видов.

В литературе имеются данные по анализу последствий радионуклидного загрязнения. Так, в работах Блейлока описано 10 уникальных последовательностей в популяции *Chironomus* sp. в реке Уайт Ок Крик, куда спускали радиоактивные отходы лаборатории, по сравнению с популяцией из "чистого" водоема [14, 15]. При изучении хирономид из водоемов Чернобыля найдено несколько новых последовательностей дисков в популяциях *C. plumosus* и *C. balatonicus*. У *C. plumosus* обнаружено увеличение частоты встречаемости В-хромо-

сом, у *C. balatonicus* они были найдены впервые [16].

Анализ кариотипов и хромосомного полиморфизма проводили у хирономид подсем. Chironominae, собранных в 1991–1993 гг. в районах локальных загрязнений радионуклидами – Алтайский край (районы, пострадавшие от ядерных испытаний на территории СИП), Челябинская область (районы, подвергшиеся загрязнению в результате Кыштымского взрыва). В качестве контрольных популяций использовали популяции из "чистых" районов Алтая, Европы, Сибири, Казахстана, Тувы и Якутии. Цитогенетический анализ *C. tentans* популяций из загрязненных радионуклидами районов показал наличие 7 новых уникальных инверсионных последовательностей дисков tenB7, tenB8, tenB9, tenB11, tenD5, tenD7, tenD8 у личинок из оз. Новенькое на Алтае и 5 новых последовательностей – у хирономид из водоемов Челябинской области [17].

Отмечено наличие гетерозиготности по центромерному гетерохроматину у 25–32 % исследованных личинок и повышенной частоты встречаемости добавочной В-хромосомы (17–33 %) у видов-близнецов группы *plumosus* (*C. plumosus*, *C. agilis* 2). У вида *C. agilis* 2, практически мономорфного по сравнению с кариотипами других видов, никаких различий в

частотах инверсионных последовательностей между популяциями "загрязненных" районов и районов сравнения найдено не было [17].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. В. Я. Панкратова, Определитель по фауне СССР, Л., Наука, Ленингр. отд-ние, 1983, вып. 102.
2. А. И. Шилова, Хирономиды Рыбинского водохранилища, Л., Наука, Ленингр. отд-ние, 1976.
3. А. Т. Сейсебаев, Отчет Ин-та радиационной безопасности и экологии НЯЦ РК, Семипалатинск, 1996.
4. H. G. Keyl, *Chromosoma*, 1962, 13, 464–514.
5. W. Beermann, *Ibid.*, 1955, 7, 198–259.
6. I. I. Kiknadze, M. G. Butler, K. G. Aimanova et al., *Can. J. Zool.*, 1996, 74, 171–191.
7. I. I. Kiknadze, M. G. Butler, K. G. Aimanova et al., *Ibid.*, 1998, 76.
8. W. Wülker, *Z. Zool. Syst. Evolut.-forsch.*, 1980, 18: 2, 112–123.
9. J. Martin, D. L. Porter, *Stud. Nat. Sci.* (Portales, New Mexico), 1973, 1: 7, 1–25.
10. И. И. Кикнадзе, Е. Н. Андреева, А. Г. Истомина, М. Дж. Батлер, *Цитология*, 1998, 10, 900–912.
11. А. И. Шилова, *Энтомолог. обозрение*, 1957, 36, 224–230.
12. Е. Н. Андреева, И. И. Кикнадзе, К. Г. Айманова, *Цитология*, 1998, 40, 972–979.
13. И. И. Кикнадзе, Н. А. Шобанов, К. Г. Айманова, Е. Н. Андреева, *Зоол. журн.*, 2000, 79, 695–703.
14. В. G. Blaylock, *Evolution*, 1965, 19, 421–429.
15. В. G. Blaylock, *Genetics*, 1966, 53, 131–136.
16. Н. А. Петрова, *Генетика*, 1991, 27: 5, 836–848.
17. И. И. Кикнадзе, А. Г. Истомина, Л. И. Гундерина и др., Сб. Исследование последствий радиационных загрязнений районов Алтайского края, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1993, 62–79.

## Cytological Identification of Chironomid Species from Water Bodies of the Semipalatinsk Nuclear Test Site

K. G. AIMANOVA, I. I. KIKNADZE, E. N. ANDREEVA, A. T. SEISEBAEV

Chironomids from water bodies of the Semipalatinsk Nuclear Test Site (SNTS) were identified. The spectrum of chironomid species in the three water bodies studied appeared to be very poor: only two species – *Camptochironomus setivalva* Shilova and *Glyptotendipes salinus* Michailova – were abundant. Karyotype and chromosomal polymorphism analysis showed that the two species were practically monomorphic. The chironomid species studied will be used as model species for further cytological monitoring of water bodies that have undergone radionuclide pollution in the territory of the SNTS.