

**ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРА ГЕНОМА  
В ОНТОГЕНЕЗЕ ДВУХ ВИДОВ ЦИКЛОПОВ ОЗЕРА БАЙКАЛ  
(CRUSTACEA: СОРЕРОДА: CYCLOPOIDA)**

© Е. А. Иванкина,<sup>1,\*</sup> А. Л. Алексеева,<sup>1</sup> В. Ф. Семешин,<sup>1</sup> Л. В. Омельянчук,<sup>1</sup>  
И. Г. Пальчикова,<sup>2</sup> Н. Г. Шевелева,<sup>3</sup> С. В. Кирильчик,<sup>3</sup> И. Ф. Жимулов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН,

<sup>2</sup> Конструкторско-технологический институт научного приборостроения СО РАН, Новосибирск,  
и <sup>3</sup> Лимнологический институт СО РАН, Иркутск;

\* электронный адрес: zotkevich@mcb.nsc.ru

Размер генома циклопов определяли с помощью статической цифровой фельгеновской цитофотометрии в клетках на ранних стадиях деления дробления (до 5-го деления) и в соматических клетках с целью изучения количественных изменений в содержании ДНК, происходящих во время диминуции хроматина. Используемая нами реализация метода цитофотометрии была апробирована на пяти различных оптических системах получения цифровых изображений для клеток крови четырех стандартных объектов. Во всех случаях наблюдали линейную зависимость полученных и известных из литературы данных по содержанию ДНК, высокую воспроизводимость результатов, что позволяет использовать эти системы в дальнейшей работе. Нами также установлено оптимальное время гидролиза ДНК как для мазков крови, так и для двух видов циклопов московской популяции, равное 30 мин в 5N HCl при  $t = 24^{\circ}\text{C}$ . Впервые обнаружена диминуция хроматина у двух эндемичных байкальских видов циклопов — *Acanthocyclops incolataenia* и *Diacyclops galbinus*, которая для *D. galbinus* составляет 95.5—96.2 %. Цитометрический анализ третьего вида — *Mesocyclops leuckarti* — не выявил очевидной диминуции хроматина.

**Ключевые слова:** циклопы, диминуция хроматина, цитофотометрия ДНК.

**Принятые сокращения:** ДХ — диминуция хроматина, CCD — Charge Coupled Device.

Диминуция хроматина (ДХ) — процесс удаления части генетического материала на ранних этапах эмбриогенеза — в отличие от гетерохроматизации или посттранскрипционного сайленсинга является наиболее кардинальным и необратимым механизмом инактивации генетического материала в геномах эукариот. Процесс ДХ описан как у группы простейших (у инфузорий), так и у беспозвоночных животных (у циклопов, аскарид, двукрылых насекомых). В ряде случаев встречается он и у хордовых животных, а именно у круглоротов (миксин) и у сумчатых животных (бандикутов). У инфузорий элиминация части хромосом связана с формированием макронуклеуса, у двукрылых насекомых — с определением пола и геномным импринтингом, а у циклопов и нематод — с дифференцировкой соматических клеток и клеток зародышевого пути (см. обзор: Гришанин и др., 2006).

Исследование ДХ у инфузорий показало, что общие программы элиминации могут встречаться и у филогенетически отдаленных классов инфузорий. Так, для процесса реорганизации генома у *Chilodonella uncinata* (класс Phyllopharyngea) характерны образование гигантских политетенных хромосом до элиминации, перестановка генов во время элиминации и в результате — образование так называемых одногенных хромосом, что также свойствен-

но и для представителей класса Spirotrichea. Расхождение этих классов по приблизительным оценкам произошло примерно 580 млн лет назад, и, по-видимому, процесс элиминации мог возникнуть независимо в этих двух классах (Katz, Kovner, 2010). В связи с этим изучение связи между филогенетическим положением вида и наличием или отсутствием процесса ДХ представляет значительный интерес.

Циклопы, как и некоторые другие ракообразные, претерпевающие ДХ, проходят сложную программу дифференцировки соматических клеток, включающую в себя избирательную элиминацию целых хромосом, разрезание додиминуционных хромосом в определенных сайтах и сшивание образовавшихся последовательностей в целую хромосому, а также удаление из клетки вырезанных хромосомных фрагментов (Гришанин и др., 2006). Впервые найденная у циклопов еще в 1894 г. (Häcker, 1894) ДХ нацитологическом уровне была детально описана для трех представителей рода *Cyclops* (Beermann, 1977). В дальнейшем удаление хроматина из ядер соматических клеток было найдено еще у 19 видов циклопов среди изученных 35 (Beermann, 1977; Emslie, 1996; Dorward, Wyngaard, 1997; Wyngaard, Rasch, 2000; Grishanin et al., 2004; Rasch, Wyngaard, 2006a, 2006b; Гришанин, 2008). Большинство видов, обладающих ДХ, было найдено среди рода *Cyclops*.

lops, и, по мнению Ульриха Эйнсли, характер диминуции хроматина у этого рода может рассматриваться как критерий для точного определения вида (Einsle, 1996).

Для того чтобы оценить распространность диминуции хроматина в природе среди представителей подотряда Cyclopoida, была разработана новая реализация метода цифровой цитофотометрии в ядрах, окрашенных по Фёльгену (Омельянчук и др., 2010). Этот метод позволяет производить измерения количества ДНК в ядрах до и после диминуции хроматина даже при небольшом количестве имеющегося биологического материала для исследований. К его преимуществам также относится проведение цитофотометрических измерений без применения специального дорогостоящего оборудования, с использованием любого микроскопа, работающего в режиме проходящего света и оборудованного цифровой камерой. В данной работе мы сосредоточили внимание на циклопах, обитающих в оз. Байкал, фауна которого представлена большим разнообразием видов. В результате наших исследований впервые было установлено наличие ДХ у двух байкальских видов циклопов — *Acantocyclops incolataenia* и *Diacyclops galbinus*.

## Материал и методика

**Сбор биологического материала.** Самок *Acantocyclops incolataenia*, *Diacyclops galbinus* и *Mesocyclops leuckarti* с яйцевыми мешками, в которых находятся эмбрионы, собирали в августе 2009—2010 гг. в прибрежной части оз. Байкал на глубине 7—10 м вблизи стационара Лимнологического института СО РАН (г. Иркутск) в пос. Большие Коты. Дополнительно особи *M. leuckarti* были собраны в небольших озерах, расположенных вблизи р. Б. Котинка (озера № 1 и 3).

**Фиксация материала и приготовление цитологических препаратов.** Отловленных самок циклопов с яйцевыми мешками фиксировали на льду в смеси этанол—уксусная кислота (3 : 1) в течение 20 мин. Далее дважды отмывали фиксатор в 96%-ном этаноле в течение 10 мин. Фиксированный материал переводили в 70%-ный этанол и хранили при 6 °C до использования.

Для проведения цитофотометрических измерений яйцевые мешки самок циклопов отмывали от этанола в дистиллированной воде дважды по 5 мин. Затем в капле 45%-ной уксусной кислоты отделяли эмбрионы друг от друга, накрывали предметным стеклом, не раздавливая эмбрион, и скальвавали его в жидким азоте. Препараты промывали в 96%-ном этаноле дважды по 10 мин. Для приготовления цитологических препаратов соматических клеток циклопов использовали плавательные конечности — ноги, клетки которых содержат диплоидное количество ДНК (Stich, 1962; Rasch, Wyngaard, 2006b).

В качестве стандартных объектов использовали ядра дифференцированных клеток крови нескольких организмов: *Gallus domesticus*, *Danio rerio*, *Homo sapiens*, *Rana arvalis*, содержание ДНК у которых составляет 1.25, 1.68~1.80, 3.5 и 4.65~7.17 pg соответственно (<http://www.genomesize.com/>). Мазки крови фиксировали в смеси этанол—уксусная кислота (3 : 1) в течение 20 мин на льду, дважды отмывали в 96%-ном этаноле и высушивали на воздухе.

Приготовленные препараты зародышевых мешков циклопов окрашивали красителями DAPI (0.5 мкг/мл) или Hoechst 33258 (0.25 мкг/мл) для определения стадии

дробления зародыша и наличия или отсутствия митотически делящихся клеток с использованием флуоресцентной микроскопии. Дальнейшая цитофотометрическая проверка не выявила существенного влияния флуоресцентного красителя на связывание фуксина с ДНК.

**Окраска по Фёльгену.** Для проведения окраски по Фёльгену использовали фуксин отечественного производства. В каждую процедуру окраски включали 30—40 цитологических препаратов, в том числе от одного (*Gallus domesticus*) до четырех контрольных объектов. Гидролиз ДНК проводили в 5N HCl в течение 30 мин при комнатной температуре (24 °C), окрашивание препаратов реактивом Шиффа (рН 2.2—2.4)—2 ч, отмыкание в сернистых водах — 40 мин (8 смен по 5 мин). Сернистые воды в каждом эксперименте готовили за 30—60 мин до их использования. Окраску препаратов проводили по стандартному протоколу (Rasch, 2004).

Для определения оптимального времени гидролиза использовали 4 временные точки — 15, 20, 30 и 60 мин. В эксперименте использовали мазки крови 3 стандартных объектов — *G. domesticus*, *D. rerio*, *H. sapiens*, а также ранние и поздние эмбрионы двух видов циклопов — *C. kolensis* и *C. insignis* (московская популяция).

**Цитофотометрия.** В работе был использован метод цитофотометрического определения содержания ДНК в ядрах, окрашенных реактивом Шиффа, с использованием цифровой микрофотографии (Омельянчук и др., 2010). Измерения проводили на четырех микроскопах: инвертированном микроскопе Axiovert-200 (Carl Zeiss, Германия), флуоресцентном микроскопе DM-4000 (Leica, Германия), световых микроскопах DIALUX 20 EB (Leitz, Германия) и AxioLab (Zeiss, Германия) в режиме проходящего света. Измерения на микроскопе Axiovert-200 проводили с использованием объектива Achromat 20× с апертурой 0.40, с помощью камеры AxioCam MRc в 8-битовом динамическом диапазоне, а также с использованием объектива A-plan 40× с апертурой 0.65 и камеры AxioCam ICm1 в 12-битовом динамическом диапазоне. Измерения на микроскопе DM-4000 проводили с использованием объектива 40× с апертурой 0.65 и камеры Leica DFC420 с 12-битовой оцифровкой интенсивности пикселя, а на микроскопе DIALUX 20 EB — с использованием объектива 40× с апертурой 0.65 и камеры CANON EOS 500D в 14-битовом динамическом диапазоне. Наконец, микроскоп AxioLab был снабжен 12-битовой камерой MRCm1, объективом 40× с апертурой 0.6. Цифровые изображения получали в монохромном режиме, используя интерференционный светофильтр с длиной волны  $551 \pm 10$  nm.

Вырезание прямоугольного имиджа, содержащего изображение ядра, проводили с помощью свободно распространяемой программы ImageJ. Численную обработку полученного имиджа проводили с помощью разработанной нами программы (в программной среде Mathcad-14, которая имеет процедуры ввода цифровых изображений) следующим образом.

1. Из интенсивности пикселей изображения ядра по пиксельно вычитали интенсивности пикселей изображения непрозрачного кусочка туши, размеры которого несколько больше изображения ядра, и получали изображение I1 (учет блика оптики и изготовление непрозрачных кусочков туши более подробно описаны в работе Омельянчук с соавторами (2010)).

2. На изображении I1 выделяли субимидж прозрачного участка, расположенного рядом с ядром и использова-

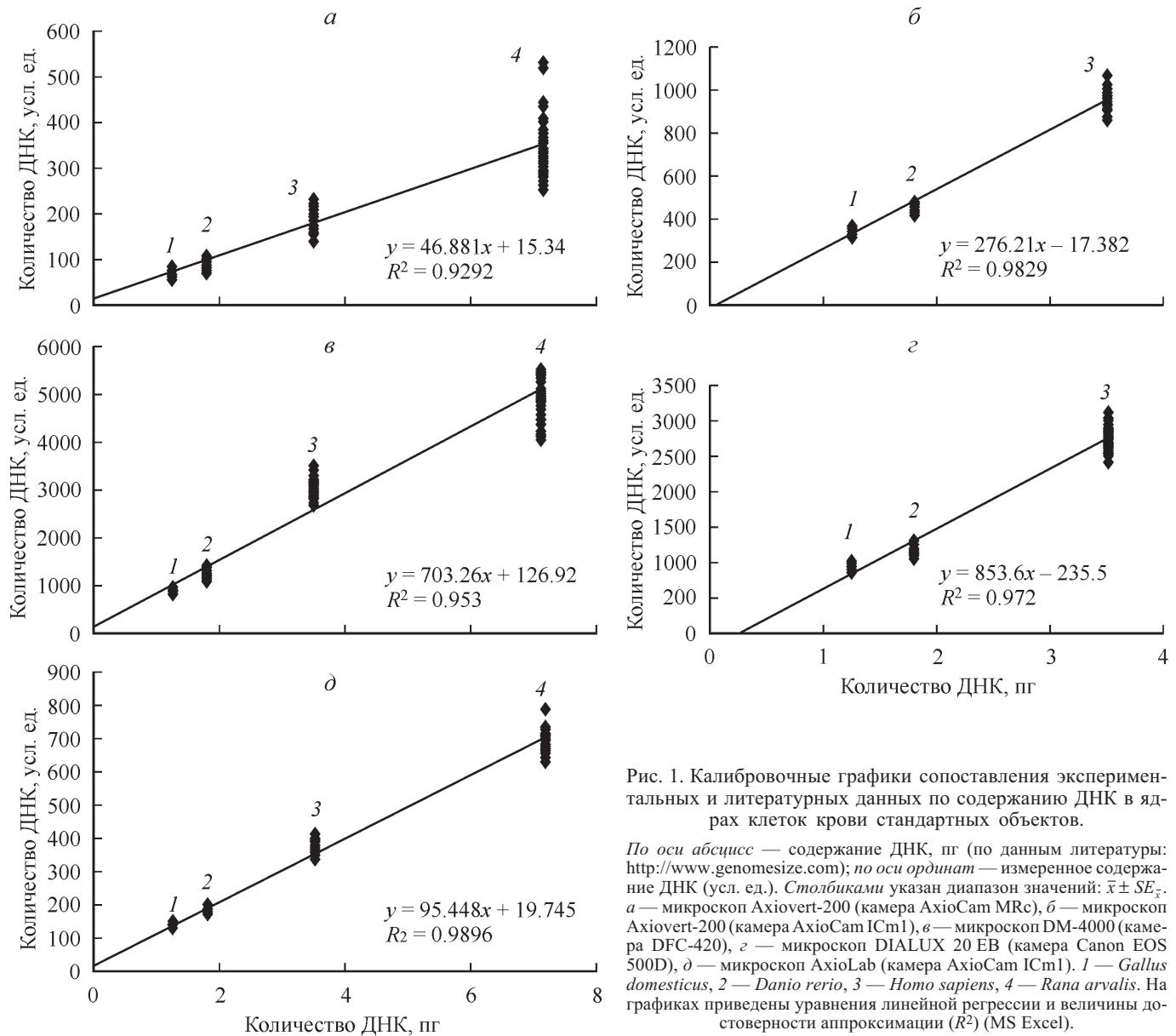


Рис. 1. Калибровочные графики сопоставления экспериментальных и литературных данных по содержанию ДНК в ядрах клеток крови стандартных объектов.

По оси абсцисс — содержание ДНК, пг (по данным литературы: <http://www.genomesize.com>); по оси ординат — измеренное содержание ДНК ( усл. ед.). Столбиками указан диапазон значений:  $\bar{x} \pm SE_{\bar{x}}$ . а — микроскоп Axiovert-200 (камера AxioCam MRc), б — микроскоп Axiovert-200 (камера AxioCam ICm1), в — микроскоп DM-4000 (камера DFC-420), г — микроскоп DIALUX 20 EB (камера Canon EOS 500D), д — микроскоп AxioLab (камера AxioCam ICm1). 1 — *Gallus domesticus*, 2 — *Danio rerio*, 3 — *Homo sapiens*, 4 — *Rana arvalis*. На графиках приведены уравнения линейной регрессии и величины достоверности аппроксимации ( $R^2$ ) (MS Excel).

ли его для определения интенсивности падающего света. Интенсивность каждого пикселя  $I_1$  нормировали на среднюю интенсивность падающего света. Полученная таким образом цифровая матрица состоит из чисел, отражающих коэффициент пропускания ( $\tau$ ) света участками ядра.

3. Согласно закону Бугера—Ламберта—Бэра, оптическую плотность для каждой элементарной сканируемой площадки вычисляли по формуле  $D = -\lg \tau$ .

4. В методе сканирования считается, что содержание ДНК в ядре пропорционально сумме оптических плотностей элементарных сканируемых площадок (Агроскин, Папаян, 1997, с. 160, формула V. 1). Исходя из этого в качестве меры содержания ДНК в ядре использовали сумму логарифмов всей матрицы коэффициентов пропускания, взятую с обратным знаком. Небольшое количество пикселей изображения  $I_1$ , у которых  $\tau < 0$  или  $\tau > 1$ , при расчете содержания ДНК игнорировали, считая это случайными флуктуациями заряда на элементах фотоматрицы. В целом развиваемый нами подход, подобно методам, ранее применяемым в фольгеновской цитометрии, не

использует специальные процедуры выделения границ ядра.

Статистическая обработка данных. Для каждой серии экспериментов были получены выборки (условные единицы) как для всех стандартных объектов, так и для ядер клеток циклопов. В каждой выборке были рассчитаны среднее значение и стандартное отклонение по этой выборке (MS Excel). Для построения калибровочных графиков по содержанию ДНК в ядрах клеток крови стандартных объектов для экспериментальных данных рассчитывали среднее значение и стандартную выборочную ошибку  $SE_{\bar{x}}$ . При сравнении пяти различных оптических систем рассчитывали коэффициенты регрессии и корреляции.

Для того чтобы оценить абсолютное содержание ДНК (в пикограммах) в ядрах клеток эмбрионов циклопов, использовали данные по содержанию ДНК в ядрах эритроцитов *Gallus domesticus*: 1С = 1.25 пг (<http://www.genomesize.com/>), так как разброс значений в выборке, полученной для этого контрольного объекта, был наименьшим.

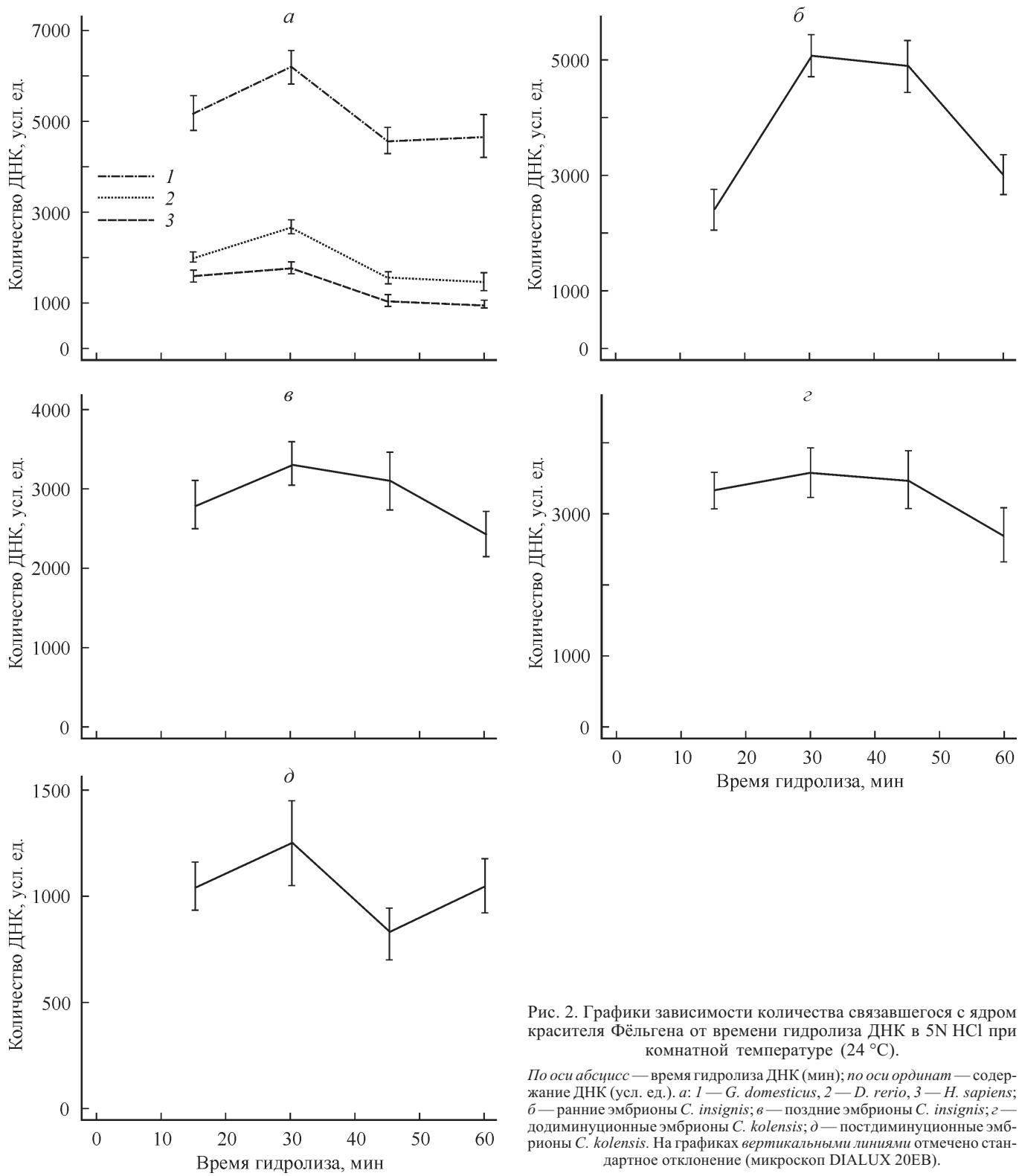


Рис. 2. Графики зависимости количества связавшегося с ядром красителя Фёльгена от времени гидролиза ДНК в 5N HCl при комнатной температуре (24 °C).

По оси абсцисс — время гидролиза ДНК (мин); по оси ординат — содержание ДНК ( усл. ед.). *a*: 1 — *G. domesticus*, 2 — *D. rerio*, 3 — *H. sapiens*; *б* — ранние эмбрионы *C. insignis*; *в* — поздние эмбрионы *C. insignis*; *г* — додоминационные эмбрионы *C. kolensis*; *д* — постдоминационные эмбрионы *C. kolensis*. На графиках вертикальными линиями отмечено стандартное отклонение (микроскоп DIALUX 20EB).

## Результаты и обсуждение

Отработка метода цифровой цитофотометрии (качество калибровочных зависимостей для различных оптических систем). Для отработки метода цитофотометрического измерения содержания ДНК в ядрах, окрашенных реактивом Шиффа,

были построены калибровочные кривые для каждой системы получения изображений. На рис. 1 приведены калибровочные графики для экспериментов, выполненных на микроскопах Axiovert-200 (рис. 1, *a*, *б*), DM-4000 (рис. 1, *в*), DIALUX 20 EB (рис. 1, *г*) и AxioLab (рис. 1, *д*). Поскольку предложенная реализация метода цифровой цитометрии имеет отличия от описанных ранее, нам было

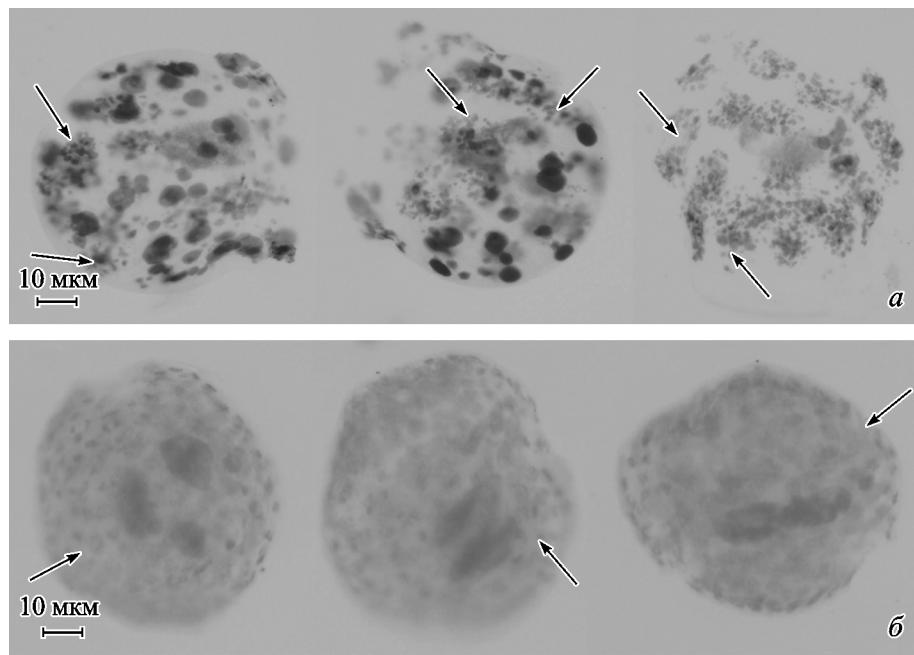


Рис. 3. Эмбрионы циклопа *A. incolotaenia* (окраска по Фёльгену).

*а* — эмбрион, находящийся на стадии прохождения диминуции хроматина; *б* — эмбрион на поздней стадии эмбрионального развития, после прохождения диминуции хроматина. Стрелками обозначены гранулы удаляемого хроматина (*а*) и ядра, прошедшие ДХ (*б*). Об. 40×.

важно понять, в какой мере полученные результаты зависят от оптики микроскопа и свойств цифровой камеры. Так, микроскоп Axiovert-200 был оснащен 8-битовой камерой (AxioCam MRc) или 12-битовой (AxioCam ICm1), микроскоп DM-4000 — 12-битовой, DIALUX 20 EB — 14-битовой (Canon EOS 500D), AxioLab — 12-битовой (AxioCam ICm1). Для отработки нашего метода мы провели 11 экспериментов с использованием четырех стандартных объектов.

Было показано, что при использовании камеры с большим динамическим диапазоном (рис. 1, *б*) экспериментальные данные по содержанию ДНК в ядрах контрольных объектов более точно совпадают с литературными. Однако использование камеры с 8-битовой дигитализацией изображения также позволяет получать данные с достаточно высокой точностью (рис. 1, *а*), и все пять систем получения цифровых изображений пригодны для использования.

Для каждого калибровочного графика были рассчитаны коэффициенты регрессии и корреляции, а также ошибка коэффициента регрессии. Оценка достоверности различий коэффициентов регрессии в экспериментах, выполненных на одном микроскопе, во всех четырех случаях не выявила существенных различий между ними. На рис. 1 приведены пять графиков для каждой системы получения цифровых изображений.

При измерении отношения величины стандартной ошибки к величине среднего содержания ДНК (условные единицы) для контрольного объекта *G. domesticus* было показано, что во всех 11 экспериментах значение коэффициента вариации находится в диапазоне от 0.003 до 0.02. В этом же интервале находятся величины отношения ошибки коэффициента регрессии к самому коэффициенту регрессии. Таким образом, относительные ошибки в определении среднего содержания ДНК для разных стандартов близки, и есть основание для использования одного из них (в нашем случае *G. domesticus*) для расчета

абсолютного содержания ДНК в других изучаемых видах. Из этого факта следует, что использованные оптические системы и химические процедуры окраски дают возможность определять содержание ДНК в ядрах в диапазоне 1—7 пг ДНК с одинаковой точностью.

**Определение оптимального времени гидролиза ДНК.** В ходе проведения процедуры окраски по Фёльгену было установлено оптимальное время гидролиза ДНК для трех стандартных объектов — *G. domesticus*, *D. rerio*, *H. sapiens*, а также двух наиболее изученных видов циклопов — *C. kolensis* и *C. insignis*, которое составляет 30 мин (рис. 2, *а*—*д*). В соответствии с полученными данными для всех исследуемых в нашей работе биологических объектов мы проводили гидролиз ДНК в течение 30 мин (для окраски по Фёльгену) в 5N HCl при комнатной температуре. Следует отметить, что в работе Раш и Вингаард (Rasch, Wyngaard, 2006а) было показано, что время гидролиза для особей циклопов, фиксированных в алкоголь-уксусном фиксаторе, не должно превышать 15—20 мин. Возможно, что увеличение оптимального времени гидролиза до 30 мин в наших экспериментах связано с первоначальной обработкой объектов, а именно с более продолжительной фиксацией особей в уксусно-кислом фиксаторе: 1—4 мин в экспериментах Раш и Вингаард (Rasch, Wyngaard, 2006а) и 20 мин в наших экспериментах.

**Анализ диминуции ДНК у циклопов.** Впервые в наших исследованиях было установлено наличие диминуции хроматина у двух байкальских видов циклопов — *Acantocyclops incolotaenia* и *Diacyclops galbinus*. На рис. 3 представлены фотографии ядер циклопов *A. incolotaenia*, находящиеся на стадии прохождения диминуции хроматина (рис. 3, *а*) и на стадии позднего эмбрионального развития (рис. 3, *б*). На рис. 3, *а* хорошо видны фёльген-положительные гранулы элиминируемой ДНК, что цитологически подтверждает наличие диминуции у этого вида. На рис. 3, *б* изображены эмбрионы *A. incolotaenia*, находящиеся на стадии позднего эмбрионального развития, на которых не видны гранулы элиминируемой ДНК, что цитологически подтверждает отсутствие диминуции у этого вида.

## Количество ДНК в клетках до и после диминуции хроматина (пг)

Вид циклопа (популяция, использованный микроскоп)	Додиминуционное развитие		Постдиминуционное развитие		Элиминируемая ДНК, %
	анафаза, 2C	метафаза, 4C	поздние эмбрионы, 2C	ноги, имаго, 2C	
<i>Diacyclops galbinus</i> , оз. Байкал (AxioLab)	16.53 $\sigma = 2.02$ n = 33	31.6 $\sigma = 3.22$ n = 19 (метафаза, 16—32 клетки) 31.76 $\sigma = 2.00$ n = 11 (профазные ядра, 4—8 клеток)	0.71 (анафаза) $\sigma = 0.15$ n = 15	0.63 $\sigma = 0.09$ n = 36	95.51—96.19
<i>Mesocyclops leuckarti</i> , озеро Байкал (AxioLab)	1.73 $\sigma = 0.13$ n = 4 (16—32 клетки)	3.62 $\sigma = 0.26$ n = 31 (профазные ядра, 16—32 клетки)	1.55 $\sigma = 0.14$ n = 73 3.32 $\sigma = 0.36$ n = 39 (64 и более клеток)	1.60 $\sigma = 0.15$ n = 50	
<i>M. leuckarti</i> , озеро № 1 (AxioLab)	1.72 $\sigma = 0.11$ n = 34 (16 клеток)	3.72 $\sigma = 0.19$ n = 5 (16 клеток)	1.51 $\sigma = 0.08$ n = 8 3.38 $\sigma = 0.11 = 3$	1.62 $\sigma = 0.07$ n = 47	
<i>M. leuckarti</i> , озеро № 3 (AxioLab)	1.74 $\sigma = 0.09$ n = 22 (4 клетки)	3.85 $\sigma = 0.24$ n = 3 (4 клетки)	1.60 $\sigma = 0.14$ n = 7 3.54 $\sigma = 0.22$ n = 4 (64—132 клетки)	1.56 $\sigma = 0.31$ n = 30	

Примечание. Даны средние значения,  $\sigma$  (стандартные отклонения) и число измерений (n).

*taenia*, находящиеся на поздней стадии эмбрионального развития, по-видимому после прохождения диминуции. В центре каждого эмбриона видны крупные, не прошедшие диминуцию ядра в количестве 2—3. Они окружены более мелкими ядрами, в которых элиминация части ДНК уже произошла.

Согласно результатам цитофотометрического анализа, у *D. galbinus* доля элиминируемой ДНК составляет около 95.5—96.2 %, в то время как размер до- и последдиминуционного генома значительно отличается и составляет  $8.27 \pm 1.01$  и  $0.36 \pm 0.08$  пг соответственно (см. таблицу).

В результате анализа содержания ДНК в зародышевых и соматических клетках *M. leuckarti* мы наблюдали заниженное на 7—10 % количество ДНК в соматических клетках по сравнению с зародышевыми (см. таблицу). Столь малый уровень различий дает основание предполагать, что ДХ у этого вида отсутствует. Тем не менее мы не можем исключить также наличие небольшой элиминации ДНК. В пользу такого допущения свидетельствует хорошая воспроизводимость результатов для циклопов, собранных в различных местах обитания (см. таблицу). В то же время содержание ДНК у этого вида в соматических клетках (2C) составляет 1.56—1.60 пг и почти в 2 раза превышает значение (0.76 пг), установленное ранее

(Wyngaard, Rasch, 2000; Rasch, Wyngaard, 2006b). Такое расхождение может быть связано с популяционными различиями циклопов, взятых для анализа: Раш и Вингаард использовали циклопов европейской популяции (Германия). Прояснение этого вопроса требует проведения дополнительного сравнительного анализа.

Полученные данные указывают на отсутствие некой «критической» массы ДНК в геноме соматических клеток, необходимой для осуществления ДХ. Так, в диплоидных постдиминуционных клетках содержание ДНК составляет 0.7 пг (*D. galbinus*), в то же время у видов с отсутствием ДХ эти значения составляют 1.6 пг у *M. leuckarti* и 6.8 пг у *C. insignis* (Семешин и др., 2011). Следует отметить, что цитометрический анализ 11 видов циклопов семейства *Mesocyclops* (Rasch, Wyngaard, 2006b) выявил значительную межвидовую вариабельность в содержании ДНК от 0.54 пг у *M. thermocyclopoides* до 3.0 пг у *M. edax* в ядрах соматических клеток (2C). ДХ наблюдалась у трех видов этого семейства (всего на предмет ДХ изучены 4 вида). Следует подчеркнуть, что количественное содержание ДНК в геноме зародышевых клеток (2C) у этих видов также находится в широких пределах: от 8.43 пг у *M. longisetus* до 15.8 пг у *M. edax* (Rasch, Wyngaard, 2006b).

Данные, полученные при измерении содержания ДНК в ядрах клеток зародышевого пути (ооциты, сперматоциты) или же ранних эмбриональных ядер, а также ядер соматических клеток, показывают, что постдиминуционные геномы соматических клеток разных видов циклопов по содержанию ДНК значительно более похожи друг на друга и на геномы видов, у которых ДХ отсутствует. Интересно отметить, что максимальный размер соматического генома среди циклопов был обнаружен у вида *C. insignis* и составляет 3.4 пг (Семешин и др., 2011). Это значение даже превышает размеры додиминуционных геномов некоторых видов — *C. strenuus*, *C. furcifer*, *C. divulsus* (Beermann, 1977; Wyngaard, 2006a).

Все эти данные наводят на мысль о том, что ДХ как механизм удаления из генома «всего лишнего» до начала развития организма позволяет быстро накопить «избыточную» ДНК в клетках зародышевого пути и индивидуален для каждого вида. Этот факт подтверждается исследованиями, посвященными изучению додиминуционной ДНК или элиминируемой части ДНК у циклопов. Так, было показано, что додиминуционный геном содержит больше повторенных последовательностей (Degtyarev et al., 2004), рибосомных генов (Загоскин и др., 2010), tandemно повторенных последовательностей от 2—9 п. н. (Drouin, 2006). Более того, в геноме зародышевых клеток *Cyclops kolensis* были найдены межмикросателлитные последовательности, полностью удаляющиеся из генома соматических клеток (Загоскин и др., 2008). Мы полагаем, что дальнейшее накопление данных по ДХ у циклопов необходимо для решения проблемы избыточности ДНК, и наши методические разработки по использованию цифровой микрофотометрии могут быть весьма полезными.

Таким образом, использованный метод измерения количества ДНК дает возможность установить наличие или отсутствие диминуции хроматина у исследуемых видов циклопов. Метод дает сходные результаты в случае использования различных оптических систем регистрации изображений (по крайней мере для тех задач, которые решались в работе). Увеличение динамического диапазона CCD-камеры позволяет уменьшить разброс полученных данных. Выполненное в работе методическое исследование процесса окраски ядер по Фельгену показало, что применяемый в наших работах уровень гидролиза ДНК является приемлемым и оптимальным для многих видов. Углубленная статистическая обработка данных показала, что по крайней мере в диапазоне 1—7 пг содержание ДНК в ядрах можно измерять с одинаковой относительной ошибкой. Проведенные измерения позволили расширить круг видов циклопов, исследованных на предмет наличия (отсутствия) диминуции хроматина, и впервые установить наличие диминуции у двух видов циклопов, обитающих в оз. Байкал.

Авторы выражают глубокую признательность начальнику биологической станции Лимнологического института А. Л. Новицкому за помощь при проведении исследований, а также сотрудникам Лимнологического института СО РАН В. И. Тетериной, А. В. Купчинскому, И. В. Ханаеву и сотрудникам Института молекулярной и клеточной биологии Г. В. Похолковой и А. В. Иванкину за неоценимую помощь в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 37 и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 09-08-00651 и 09-04-00854).

## Список литературы

- Гришанин А. К. 2008. Цитогенетическое исследование диминуции хроматина у пресноводных ракообразных — новый подход к изучению парадокса размера генома эукариот: Автoref. докт. дис.
- Гришанин А. К., Шеховцов С. В., Бойкова Т. В., Акифьев А. П., Жимулов И. Ф. 2006. Проблема диминуции хроматина на рубеже XX и XXI веков. Цитология. 48 (5) : 379—397.
- Загоскин М. В., Гришанин А. К., Королев А. Л., Паленко М. В., Муха Д. В. 2008. Характеристика межмикросателлитных последовательностей ДНК до и после диминуции хроматина у *Cyclops kolensis*. Докл. РАН. 423 (4) : 551—555.
- Загоскин М. В., Маршак Т. Л., Муха Д. В., Гришанин А. К. 2010. Диминуция хроматина регулирует число генов рРНК у веслоногих раков. Acta Naturae. 2 (4) : 58—64.
- Омельянчук Л. В., Семешин В. Ф., Алексеева А. Л., Пальчикова И. Г., Жимулов И. Ф. 2010. Интегральный метод измерения количества ДНК в клетке с использованием цифровой микроФотографии. Цитология. 52 (4) : 349—353.
- Семешин В. Ф., Омельянчук Л. В., Алексеева А. Л., Иванкина Е. А., Шевелева Н. Г., Жимулов И. Ф. 2011. Содержание ДНК в ядрах *Cyclops kolensis* и *C. insignis* (Crustacea, Copepoda). Цитология. 53 (3) : 77—81.
- Beermann S. 1977. The diminution of the heterochromatic chromosomal segments in *Cyclops* (Crustacea, Copepoda). Chromosoma. 60 : 297—344.
- Degtyarev S., Boikova T., Belyakin S., Rubtsov N., Karamysheva T., Makarevich G., Akifyev A., Zhimulev I. 2004. The molecular structure of DNA fragments eliminated during chromatin diminution in *Cyclops kolensis*. Genome Res. 14 : 2284—2287.
- Dorward H. M., Wyngaard G. A. 1997. Variability and pattern of chromatin diminution in the freshwater Cyclopidae (Crustacea: Copepoda). Arch. Hydrobiol. Suppl. 107 : 447—465.
- Drouin G. 2006. Chromatin diminution in the copepod *Mesocyclops edax*: diminution of tandemly repeated DNA families from somatic cells. Genome. 49 : 657—665.
- Einsle U. K. 1996. Copepoda: Cyclopoida. Genera *Cyclops*: *Megacyclops*, *Acanthocyclops*. In: Dumont H. J. F. (Ed.). Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world. 10. SPB Academic publishing. 83 p.
- Grishanin A. K., Dahms H. U., Akifyev A. P. 2004. Nuclear DNA remarks on Chromatin diminution in Cyclopoid Copepods. Zoological Studies. 43 : 300—303.
- Häcker V. 1894. Über generative und embryonale Mitosen, sowie über pathologische Kernteilung. Arch. mikrosk. Anat. 43 : 759—787.
- Katz L. A., Kovner A. M. 2010. Alternative processing of scrambled genes generates protein diversity in the ciliate *Chilodonella uncinata*. J. Exp. Zool. Pt B. (Mol. Develop. Evol.). 314 : 480—488.
- Rasch E. M. 2004. Feulgen-DNA cytophotometry for estimating C-values. In: Drosophila cytogenetics protocols. Methods in molecular biology. Totowa, New York: Humana Press. 247 : 163—201.
- Rasch E. M., Wyngaard G. A. 2006a. Changes in nuclear morphology associated with elevated DNA levels during gametogenesis in cyclopoid copepods with chromatin diminution. Invertebrate Bio. 125 : 56—69.
- Rasch E. M., Wyngaard G. A. 2006b. Genome sizes of cyclopoid copepods (Crustacea): evidens of evolutionary constraint. Biol. J. Linn. Soc. 87 : 625—635.
- Stich H. F. 1962. Variations of the deoxyribonucleic acid (DNA) content in embryonal cells of *Cyclops strenuus*. Exp. Cell Res. 26 : 136—143.
- Wyngaard G. A., Rasch E. M. 2000. Patterns of genome size in the copepoda. Hydrobiologia. 417 : 43—56.

Поступила 15 VIII 2012

CYTOPHOTOMETRIC DETERMINATION OF GENOME SIZE IN TWO SPECIES  
OF CYCLOPS LAKE BAIKAL (CRUSTACEA: COPEPODA: CYCLOPOINA)  
IN ONTOGENETIC DEVELOPMENT

E. A. Ivankina,<sup>1,\*</sup> A. L. Alekseeva,<sup>1</sup> V. F. Semeshin,<sup>1</sup> L. V. Omelyanchuk,<sup>1</sup>  
I. G. Palchikova,<sup>2</sup> N. G. Shevleva,<sup>3</sup> S. V. Kirilchik,<sup>3</sup> I. F. Zhimulev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk,

<sup>2</sup> Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering SB RAS, Novosibirsk,  
and <sup>3</sup> Limnological Institute SB RAS, Irkutsk;  
\* e-mail: zotkevich@mcb.nsc.ru

Genome size of Cyclops in cells at early stages of cleavage (up to the 5<sup>th</sup> division) and in somatic cells were estimated by a static digital Feulgen cytophotometry in order to study the quantitative changes in DNA content during chromatin diminution. Our realization of the cytophotometric method was approved on five different digital-imaging systems in blood cells of four vertebrate species. In all cases, we observed a direct correlation of the obtained and known from the literature data on the genome size and a high reproducibility, which allows to use these systems in future work. We also optimized the conditions for DNA hydrolysis of both blood smears, and for two species of *Cyclops* from the Moscow population, as 30 min in 5 N HCl at 24 °C. Here we first revealed chromatin diminution in two endemic Baikal species of Cyclopoida: *Acanthocyclops incolotaenia* and *Diacyclops galbinus* estimated the extent of chromatin diminution in *Diacyclops galbinus* as 95.5—96.2 %. Cytometric analysis of the third species, *Mesocyclops leuckarti*, did not reveal obvious chromatin diminution. We also optimized the conditions for DNA hydrolysis of both blood smear preparations, and for two species of copepods from the Moscow population, as 30 min in 5N HCl at 24 °C.

Key words: *Cyclops*, chromatin diminution, DNA cytophotometry.